



PAULA DE MELO CAMPOS

**Investigação de vias de sinalização tirosinoquinase em
neoplasias mieloproliferativas crônicas BCR-ABL1
negativas: interação JAK2/IRS2 e mutações em *KIT***

CAMPINAS

2015



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

Faculdade de Ciências Médicas

PAULA DE MELO CAMPOS

Investigação de vias de sinalização tirosinoquinase em neoplasias mieloproliferativas crônicas BCR-ABL1 negativas: interação JAK2/IRS2 e mutações em *KIT*

Tese apresentada à Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do título de Doutora em Ciências.

ORIENTADORA: Profa. Dra. Fabíola Traina

COORIENTADORA: Profa. Dra. Sara Teresinha Olalla Saad

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO
FINAL DA TESE DEFENDIDA PELA
ALUNA PAULA DE MELO CAMPOS, E ORIENTADA
PELA PROFA. DRA. FABÍOLA TRAINA

Profa. Dra. Fabíola Traina

CAMPINAS

2015

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca da Faculdade de Ciências Médicas
Maristella Soares dos Santos - CRB 8/8402

C157i Campos, Paula de Melo, 1983-
Investigação de vias de sinalização tirosinoquinase em neoplasias mieloproliferativas crônicas BCR-ABL1 negativas : interação JAK2/IRS2 e mutações em KIT / Paula de Melo Campos. – Campinas, SP : [s.n.], 2015.

Orientador: Fabíola Traina.

Coorientador: Sara Teresinha Olalla Saad.

Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Ciências Médicas.

1. Mutação puntual. 2. Mutação em linhagem germinativa. 3. Hematopoese. 4. Biologia molecular. I. Traina, Fabíola. II. Saad, Sara Teresinha Olalla, 1956-. III. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. IV. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: A study of tyrosine kinase signaling pathways in BCR-ABL1 negative chronic myeloproliferative neoplasms : JAK2/IRS2 interaction and KIT mutations

Palavras-chave em inglês:

Point mutation

Germ-line mutation

Hematopoiesis

Molecular biology

Área de concentração: Fisiopatologia Médica

Titulação: Doutora em Ciências

Banca examinadora:

Fabíola Traina [Orientador]

Lorena Lobo de Figueiredo Pontes

Maria de Lourdes Lopes Ferrari Chauffaille

Licio Augusto Velloso

Erich Vinicius de Paula

Data de defesa: 24-06-2015

Programa de Pós-Graduação: Fisiopatologia Médica

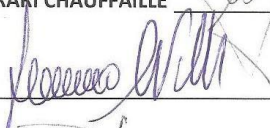
BANCA EXAMINADORA DA DEFESA DE DOUTORADO

PAULA DE MELO CAMPOS

Orientador (a) PROF(A). DR(A). FABÍOLA TRAINA

Coorientador (a) PROF(A). DR(A). SARA TERESINHA OLALLA SAAD

MEMBROS:

1. PROF(A). DR(A). FABÍOLA TRAINA 
2. PROF(A). DR(A). LORENA LOBO DE FIGUEIREDO PONTES 
3. PROF(A). DR(A). MARIA DE LOURDES LOPES FERRARI CHAUFFAILLE 
4. PROF(A).DR(A). LICIO AUGUSTO VELLOSO 
5. PROF(A).DR(A). ERICH VINICIUS DE PAULA 

Programa de Pós-Graduação em Fisiopatologia Médica da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas

Data: 24 de junho de 2015

Resumo

As neoplasias mieloproliferativas crônicas BCR-ABL1 negativas (NMP) apresentam como característica comum a ocorrência de proliferação celular exacerbada, mantendo a capacidade de diferenciação mieloide terminal. Em parcela significativa dos casos, a ativação da proliferação celular ocorre pelo aumento da atividade tirosinoquinase de proteínas específicas. Entretanto, a heterogeneidade molecular observada nos pacientes e as respostas clínicas insatisfatórias observadas em parte dos casos com os tratamentos vigentes sugerem que mecanismos adicionais, como interações proteicas não descritas e novas mutações, possam estar envolvidos na fisiopatologia destas neoplasias. Neste trabalho, objetivamos estudar as vias de ativação tirosinoquinase em policitemia vera (PV), trombocitemia essencial (TE) e mielofibrose primária (MFP) (subprojeto 1), e em mastocitose sistêmica (subprojeto 2). O foco principal do subprojeto 1 consistiu em avaliar, em NMP, a associação JAK2/IRS2, previamente descrita em células não hematológicas após estímulo, bem como o envolvimento de IRS2 em vias de proliferação celular e apoptose. Utilizamos modelos de linhagens celulares leucêmicas humanas com JAK2 mutado (JAK2^{V617F}) e JAK2 selvagem (JAK2^{WT}), submetendo-as a inibição gênica por shRNA entregue por lentivírus e ao tratamento com o inibidor seletivo de JAK1/2 ruxolitinibe. As células foram então submetidas à avaliação da viabilidade celular por MTT, e da apoptose por citometria de fluxo (anexina V/PI e caspase-3) e por imunoblotting (caspase-3 clivada). A expressão do mRNA de *IRS2* foi avaliada por PCR em tempo real em amostras de células CD34⁺ de sangue periférico de 99 pacientes com diagnóstico de PV, TE e MFP, e em 28 doadores normais. Através de imunoprecipitação e microscopia confocal, observamos a associação constitutiva entre JAK2 e IRS2 nas células JAK2^{V617F}, mas não nas células JAK2^{WT}. Em células JAK2^{V617F}, a inibição de IRS2 por lentivírus diminuiu significativamente a fosforilação de STAT5, reduziu a viabilidade celular, aumentou as taxas de apoptose, e potencializou os efeitos de ruxolitinibe. Não houve mudanças nas taxas de viabilidade celular e apoptose nas células JAK2^{WT} inibidas para IRS2. A expressão do mRNA de *IRS2* foi significativamente maior nos pacientes com TE em relação aos doadores normais, e em pacientes com NMP portadores da mutação JAK2^{V617F} em relação aos pacientes com JAK2^{WT}. Estas evidências sugerem que IRS2 possa participar das vias de sinalização celular nas NMP através de interação direta com JAK2. A inibição farmacológica de IRS2, isoladamente ou em conjunto com ruxolitinibe, é ferramenta potencial no tratamento de pacientes com PV, TE e MFP. No subprojeto 2, nosso objetivo consistiu em investigar mutações no gene *KIT* em um caso de mastocitose sistêmica familiar seguido em nosso serviço, em que mãe (caso 1) e filha (caso 2) apresentavam extensa infiltração cutânea e da medula óssea por mastócitos, bem como avaliar a sensibilidade dos mastócitos neoplásicos ao tratamento com os inibidores de tirosinoquinase imatinibe, dasatinibe e PKC412. Através de sequenciamento por Sanger, identificamos a mutação KIT^{K509I} em células de medula óssea total, CD3⁺ de sangue periférico e mucosa oral de ambas pacientes. Os pais do caso 1 apresentaram *KIT* selvagem. O tratamento *in vitro* por 4, 8 ou 12 dias de células totais de medula óssea dos casos 1 e 2 com as drogas de interesse resultou em menor viabilidade celular, avaliada por MTT, e em redução da fosforilação de P70S6K com todas as drogas testadas. Entretanto, apenas o imatinibe evidenciou resposta consistente na indução de apoptose. Foi iniciado tratamento dos casos 1 e 2 com imatinibe 400mg/dia via oral. Três meses após o início, houve normalização da pele e da medula óssea; após dois anos de seguimento, as pacientes mantêm-se em remissão. Embora rara, a mutação KIT^{K509I} deve ser pesquisada em todos os casos de mastocitose sistêmica familiar. O imatinibe pode ser considerado como droga de primeira escolha nestes casos.

Abstract

The BCR-ABL1 negative chronic myeloproliferative neoplasms (MPN) are characterized by increased cellular proliferation with preserved terminal myeloid differentiation. In most cases, the activation of cell proliferation is caused by an increased tyrosine kinase activity of specific proteins. However, patients' molecular heterogeneity and the incomplete clinical responses observed in part of the cases using the current treatments suggest that additional mechanisms, such as unknown protein interactions and new mutations, can be involved in the pathophysiology of MPN. In this study, our main goal was to investigate tyrosine kinase activation pathways in polycythemia vera (PV), essential thrombocythemia (ET) and primary myelofibrosis (PMF) (subproject 1), and in systemic mastocytosis (subproject 2). The focus of subproject 1 consisted in the investigation of JAK2/IRS2 association in MPN, already described in non-hematological cells following extrinsic stimulus, and in evaluating IRS2 function in MPN cell proliferation and apoptosis. JAK2 wild-type (JAK2^{WT}) and JAK2 mutated (JAK2^{V617F}) human leukemia cell lines were transduced with lentivirus-mediated shRNA targeting *IRS2*, and treated with vehicle (DMSO) or with the selective JAK1/2 inhibitor ruxolitinibe. Cells were then submitted to evaluation of cell viability (MTT) and apoptosis (anexin V/PI and caspase-3 by flow cytometry, and cleaved caspase-3 by immunoblotting). *IRS2* mRNA expression was evaluated by real time quantitative PCR in CD34⁺ peripheral blood cells of 99 patients with PV, ET and PMF, and in 28 healthy donors. Through immunoprecipitation/immunoblotting and confocal microscopy, we observed the constitutive JAK2/IRS2 association in JAK2^{V617F} cells, but not in JAK2^{WT} cell lines. In JAK2^{V617F}, IRS2 silencing significantly decreased phospho-STAT5, reduced cell viability, induced apoptosis, and potentiated the effects of ruxolitinibe treatment. No differences in cell viability and apoptosis ratios were observed in IRS2 silenced JAK2^{WT} cells. *IRS2* mRNA expression was significantly higher in ET patients when compared to healthy donors, and in patients harboring JAK2^{V617F} mutation in relation to JAK2^{WT}. These evidence suggest that IRS2 participate in MPN cell signaling pathways through its interaction with JAK2. IRS2 pharmacological inhibition, alone or in combination with ruxolitinibe, may be a potential tool in the treatment of PV, ET and PMF patients. In subproject 2, our main goal was to seek for *KIT* mutations in a case of systemic familial mastocytosis, followed in our outpatient clinics, in which the mother (case 1) and the daughter (case 2) had extensive skin and bone marrow infiltration by mast cells. Also, we aimed to evaluate *in vitro* sensitivity of neoplastic mast cells to the treatment with the tyrosine kinase inhibitors (TKI) imatinibe, dasatinibe and PKC412. Using Sanger sequencing analysis, we identified the KIT^{K509I} mutation in total bone marrow, peripheral blood CD3⁺ and oral mucosa cells in both patients. The parents of case 1 had wild type *KIT*. The *in vitro* treatment of total bone marrow cells of cases 1 and 2 with TKI for 4, 8 and 12 days resulted in reduced cell viability, as evaluated by MTT, and in reduced phosphorylation of P70S6K for all tested drugs. However, only imatinibe consistently induced apoptosis in both cases. Patients were started on imatinibe 400mg orally per day. Three months following imatinibe treatment, there was a complete reversion of skin and bone marrow mast cells infiltration; after two years of follow-up, cases 1 and 2 remain in complete remission of the systemic mastocytosis. Although rare, KIT^{K509I} mutation should be investigated in all cases of familial systemic mastocytosis. Imatinibe is a good first choice for the treatment of these cases.

SUMÁRIO

Dedicatória	xv
Agradecimentos	xvii
LISTA DE FIGURAS	xxiii
LISTA DE TABELAS	xxx
LISTA DE ABREVIACÕES	xxxiii
1. Introdução	1
1.1. Subprojeto 1: IRS2 e as neoplasias mieloproliferativas crônicas	2
A patogênese das neoplasias mieloproliferativas crônicas: algo além de JAK2	2
IRS2 e as vias de proliferação celular	7
1.2. Subprojeto 2: Mastocitose sistêmica familiar e as mutações em <i>KIT</i>	11
1.3. Desafios na identificação de mecanismos envolvidos na fisiopatologia das neoplasias mieloproliferativas crônicas e propostas terapêuticas	13
2. Objetivos e hipóteses	15
2.1. Subprojeto 1 - IRS2 em neoplasias mieloproliferativas crônicas	15
2.2. Subprojeto 2 - Mutações de <i>KIT</i> em mastocitose sistêmica familiar	16
3. Material e Métodos	17
3.1. Aspectos éticos da pesquisa	17
3.2. Casuística de controles normais e de pacientes com PV, TE e MFP	17
3.3. Casuística dos indivíduos provenientes da família com mastocitose sistêmica	18
3.4. Coleta e processamentos das amostras dos doadores normais e pacientes com PV, TE e MFP (subprojeto 1)	18
3.5. Coleta e processamentos das amostras dos indivíduos da família com mastocitose sistêmica (subprojeto 2)	19
3.6. Linhagens celulares	20
3.7. Inibidor de JAK1/2 e inibidores de tirosinoquinase	21
3.8. Extração de RNA e transcrição reversa	21
3.9. PCR quantitativo em tempo real (PCRq)	22
3.10. Extração de DNA, reação em cadeia da polimerase (PCR) e sequenciamento gênico	23
3.11. Pesquisa de mutações em <i>JAK2</i> e <i>CALR</i> e quantificação do alelo mutante de <i>JAK2</i> ^{V617F}	25

3.12. Extração proteica, imunoprecipitação e western blot.....	28
3.13. Microscopia confocal.....	30
3.14. Transdução de lentivírus	31
3.15. Ensaio de Methylthiazoletetrazolium (MTT).....	32
3.16. Ensaio de formação de colônias	32
3.17. Avaliação da apoptose	33
3.18. Análises estatísticas.....	34
4. Resultados Subprojeto 1 - IRS2 em neoplasias mieloproliferativas crônicas	35
4.1. IRS2 é constitutivamente associada a JAK2 em células HEL JAK2 ^{V617F} , mas não em linhagens U937 e NB4 JAK2 ^{WT}	35
4.2. Avaliação dos efeitos do tratamento com ruxolitinibe sobre IRS2 e sobre as vias JAK/STAT, PI3K/AKT/mTOR e MAPK em células HEL, U937 e NB4	37
4.3. O silenciamento de IRS2 reduz a ativação de STAT5 em células HEL	40
4.4. O silenciamento de IRS2 diminui a viabilidade celular, reduz a clonogenicidade e possui efeitos cumulativos com ruxolitinibe em células HEL	42
4.5. O silenciamento de IRS2 induz apoptose e apresenta efeitos cumulativos com ruxolitinibe	45
4.6. Caracterização clínica e molecular da coorte de pacientes com NMP incluídas no estudo.....	47
4.7. Elevada expressão de <i>IRS2</i> em pacientes com NMP JAK2 ^{V617F} comparados a JAK2 ^{WT}	51
4. Resultados Subprojeto 2 – Mutações de <i>KIT</i> em mastocitose sistêmica familiar	59
4.8. Descrição clínica - um raro caso de mastocitose sistêmica familiar.....	59
4.9. Identificação da mutação germinativa KIT ^{K509I}	64
4.10. As células de medula óssea com a mutação KIT ^{K509I} são sensíveis ao tratamento <i>in vitro</i> com inibidores de tirosinoquinase	65
4.11. O tratamento com mesilato de imatinibe induziu resposta clínica marcante e remissão laboratorial nos dois casos estudados	68
5. Discussão	71
5.1. Discussão Subprojeto 1 - IRS2 em neoplasias mieloproliferativas crônicas	71
5.2. Discussão Subprojeto 2 - Mutações de <i>KIT</i> em mastocitose sistêmica familiar	76
6. Conclusões	79
6.1. Conclusões Subprojeto 1 - IRS2 e as neoplasias mieloproliferativas crônicas	79
6.2. Conclusões Subprojeto 2 - Mastocitose sistêmica familiar e as mutações em <i>KIT</i>	79

7. Referências.....	81
8. Anexos	95
Anexo I	95
Anexo II	97
Anexo III	99
Anexo IV	101
Informações complementares ao Anexo IV.....	103
Anexo V	104
Anexo VI	105
Anexo VII	106

Dedicatória

Dedico este trabalho à minha família, base de sustentação e razão maior de tudo,
e a todos os professores que contribuíram para o meu crescimento
em todas as etapas da minha vida.

Agradecimentos

À minha família, pilar de sustentação e fonte maior de alegria. Agradeço aos meus pais, Jô e Nilson, que, com poucos recursos e muito amor, deixaram aos três filhos os maiores legados que poderiam: educação e a certeza de que, sem trabalho e esforço, não há recompensa ou vida digna. Aos meus irmãos, Flávia e Eduardo, agradeço as risadas e a amizade; com vocês tudo fica mais leve. Ao meu noivo, Henry, agradeço o companheirismo e o apoio em todos os momentos; minha vida com você é mais feliz.

A todos os professores que se dedicaram de algum modo à minha formação, desde as primeiras letras até a universidade. Vocês mudaram a minha vida e podem mudar um país. Meu muito obrigada.

À Profa. Dra. Fabiola Traina, minha orientadora, agradeço a paciência e a dedicação enormes, sempre com o intuito de que me tornasse uma médica e uma pesquisadora melhores; seja qual for o caminho, espero não decepcioná-la. Obrigada pela amizade nos momentos bons e ruins, pelos conselhos e por estender-me a mão sempre de que precisei.

À Profa. Dra. Sara T. Olalla Saad, agradeço a co-orientação neste trabalho, o apoio em seu laboratório e, sobretudo, por ter sido a primeira a dar-me oportunidades quando cheguei à universidade com dezoito anos e muitos sonhos. Os anos de iniciação científica foram fundamentais na minha formação.

Ao grande parceiro de trabalho e amigo João A. Machado-Neto, obrigada pela ajuda com as técnicas, interpretações de resultados e desabafos. Nossa dupla rendeu trabalhos e uma boa amizade. À amiga e companheira de laboratório Renata Scopim Ribeiro, agradeço a parceria com os nossos sequenciamentos, padronizações, e, sobretudo, pela amizade verdadeira e pelas risadas garantidas.

À Profa. Dra. Patrícia Favaro e a seus alunos Matheus e João Kléber, a ajuda nos desenhos dos experimentos, as orientações técnicas e a amizade.

Às biólogistas Adriana, Karla, Clarisa, Ana Leda, Irene, Fernanda, Maria Helena, Ana Lúcia, Audrey e Simone, e às bolsistas de treinamento técnico Rafaela e

Juliana, agradeço o apoio técnico e a disposição para ajudar sempre que necessário. O trabalho em equipe é fundamental na construção de boas ideias.

À Tereza Sueko, a amizade e a ajuda com compras, reagentes, orientações para experimentos e conselhos nas minhas funções administrativas.

A todos os alunos e pesquisadores do laboratório de Biologia Molecular, as ideias com os experimentos, a ajuda técnica e o companheirismo.

Às secretárias Patrícia Juliani e Nicete Romano, agradeço o apoio administrativo. A Rachel Foglio e Dra. Nicola Conran, as correções do inglês de nossos trabalhos. A Michel Moraes, o apoio didático.

Aos docentes do Hemocentro Prof. Dr. Fernando F. Costa e Profa. Dra. Irene Lorand-Metze, por abrirem as portas de seus ambulatórios para que pudéssemos realizar este trabalho, e por estarem sempre disponíveis para discussões de caso e colaborações.

À equipe de recepção e enfermagem do ambulatório de hematologia, pela ajuda com as coletas de amostras de pacientes.

Aos colaboradores internacionais da *Cleveland Clinic* (laboratório Dr. Ramon Tiu) e da *Ohio State University* (laboratório Dr. Brian Druker), pela ética nos estudos conjuntos e pela confiança depositada em nossa equipe.

Aos pacientes e doadores incluídos neste estudo, pela confiança depositada em nós e pelo altruísmo de se voluntariarem para pesquisas de resultados imprevisíveis e de longo prazo.

Às agências FAPESP, CNPq e INCT do sangue, pelo financiamento deste trabalho.

Este estudo foi financiado com recursos fornecidos pela FAPESP (Projetos 2008/57895-1; 2011/51959-0; 2012/09982-8) e pelo Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia do Sangue/CNPq (565036/2010-6).

“Gosto de ser gente porque, inacabado, sei que sou um ser condicionado, mas,
consciente do inacabamento, sei que posso ir mais além dele”

Paulo Freire

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Caracterização clínica e mutacional de policitemia vera (PV), trombocitemia essencial (TE) e mielofibrose primária^(2, 5, 6, 12-15). (A) Incidência média de evolução para fibrose de medula óssea, leucemia mieloide aguda (LMA) e eventos tromboembólicos em PV, TE e MFP, conforme indicado. As áreas em vermelho escuro e em vermelho claro representam as incidências mínimas e máximas, respectivamente, reportadas na literatura em análises populacionais. (B) Sobrevida média, em anos, dos pacientes com PV, TE e MFP. (C) Frequência de mutações (%) em *CALR*, *MPL* e *JAK2*, conforme indicado, em indivíduos com PV, TE e MFP..... 4

Figura 2. Representação esquemática de JAK2 e o efeito das mutações do exon 12 e V617F na atividade proteica. As regiões de homologia compartilhadas pelas proteínas da família JAK são denominadas *JAK homology domains* (JH). Assim como os domínios SH2 (*Src homology*), os domínios JH são nomeados da direção C para N terminal. O domínio JH1 constitui-se no domínio quinase propriamente dito, responsável pela atividade tirosinoquinase de JAK2; o domínio JH2 é um domínio pseudoquinase, que regula negativamente a atividade de JH1. A presença da mutação V617F leva à perda de função de JH2. Da mesma forma, mutações no exon 12 de JAK2, localizadas na região entre os domínios JH2 e SH2, causam alteração conformacional de JH2, com consequente perda de função deste domínio. A perda da regulação negativa de JH2 sobre JH1, por sua vez, culmina no aumento da atividade tirosinoquinase de JAK2, com consequente proliferação celular exacerbada. 6

Figura 3. Modelo esquemático da participação de IRS2 em vias de sinalização de proliferação e crescimento celulares. (1) Mediante estímulo de insulina e IGF1 em seus receptores (IR e IGF1R, respectivamente), ocorre associação de suas porções intracelulares com IRS2 e subsequente ativação de AKT e ERK, capazes de ativarem a transcrição de genes responsáveis pelo crescimento e proliferação celulares. (2) A ligação de hormônios e citocinas, como leptina, angiotensina e hormônio de crescimento, a seus receptores específicos leva à ativação de JAK2, associação com IRS2 e ativação *downstream* de vias de proliferação celular. (3) A ativação de receptores por seus ligantes específicos, como eritropoetina (EPO) - receptor de eritropoetina (EPOR), ativa IRS2 diretamente, com subsequente estímulo de AKT e ERK. Embora a ativação de EPOR seja capaz de ativar

IRS2 e JAK2 individualmente, o estímulo de IRS2 mediado por EPO ocorre de forma independente de JAK2. A figura foi produzida utilizando o *Servier Medical Art* (<http://www.servier.com/Powerpoint-image-bank>)..... 9

Figura 4. Ativação de AKT e ERK mediante estímulo de KIT. O estímulo do receptor KIT através do SCF (*Stem Cell Factor*) recruta PI3K e Grb2, levando à ativação de AKT e ERK, importantes mediadores da ativação de genes de proliferação e sobrevivência celulares. P70S6K é proteína regulada tanto por AKT quanto por ERK. A figura foi produzida utilizando o *Servier Medical Art* (<http://www.servier.com/Powerpoint-image-bank>)..... 12

Figura 5. Determinação da pureza das amostras após separação de células CD34⁺. Após a separação por coluna magnética de células CD34⁺ de pacientes com neoplasias mieloproliferativas e doadores normais, o percentual de células CD34⁺ em cada amostra foi determinado por citometria de fluxo utilizando marcação com anticorpos anti- CD34⁺. A figura é representativa de uma única amostra; as células CD34⁺ estão indicadas no quadro menor. Foram consideradas adequadas amostras com pureza superior a 90%..... 19

Figura 6. IRS2 associa-se a JAK2 em células HEL JAK2^{V617F}. Imunoprecipitação (IP) e imunoblotting (IB) com anticorpos anti- IRS2 e anti- JAK2, evidenciando associação constitutiva entre IRS2 e JAK2 em linhagem HEL, portadora da mutação JAK2^{V617F}, mas não em células U937 e NB4, com JAK2 selvagem. O anticorpo anti- IgG foi utilizado como controle negativo da imunoprecipitação; extratos totais (ET) das linhagens foram utilizados como controles positivos do imunoblotting. 35

Figura 7. Colocalização entre JAK2 e IRS2 em células HEL. Análise por microscopia confocal das linhagens HEL, U937 e NB4 em detalhe (A), e de focos de células HEL e U937 (B), com marcação para JAK2 (verde), IRS2 (vermelho) e DAPI (núcleo, em azul); o campo "fusão" representa as imagens fundidas. A análise de colocalização foi realizada com a ferramenta "*colocalization finder*" do programa computacional *Image J* (NIH), e mostra as imagens de JAK2 e IRS2 fundidas, com os pontos de colocalização representados em branco. Os coeficientes de correlação (*r*) são indicados na figura..... 36

Figura 8. Ruxolitinibe reduz a fosforilação de IRS2 em linhagem HEL. Células das linhagens HEL JAK2^{V617F} (A), U937 (B) e NB4 (C) JAK2^{WT} tratadas com diferentes doses de ruxolitinibe (0, 3, 10, 30, 100, 300, 1000nM) por 6 horas foram submetidas a imunoblotting com anticorpos anti-fosfotirosina (PY), IRS2, pJAK2/JAK2, pSTAT3/STAT3, pSTAT5/STAT5,

pERK1/2/ERK, pAKT/AKT, pP70S6K/P70S6K, como indicado na figura. Extrato total de células HEL foi utilizado nas membranas das células U937 e NB4 como controle positivo do bom funcionamento dos anticorpos. As membranas foram blotadas com os respectivos anticorpos para detecção da proteína total ou de sua forma fosforilada e reveladas com o *ECL Western Blot Analysis System*. 39

Figura 9. Inibição de IRS2 em células HEL e U937. Células HEL (A) e U937 (B) foram transduzidas com shRNA controle (shControle) ou IRS2 (shIRS2) entregue por lentivírus. A expressão do mRNA de *IRS2* (painéis superiores), avaliada por PCRq em tempo real, foi significativamente reduzida nas células shIRS2 em relação ao controle (redução de ~90% para a linhagem HEL e ~75% para a linhagem U937). Para avaliação da inibição proteica de IRS2 nas linhagens avaliadas, foi realizado imunoblotting (IB) com anticorpos anti- IRS2, com normalização pela expressão de actina, conforme indicado nas figuras (painéis inferiores). 40

Figura 10. O silenciamento de IRS2 modula pSTAT5 em células HEL (JAK2^{V617F}), mas não em U937 (JAK2^{WT}). Extratos totais de células HEL (A) e U937 (B) controle (shControle) ou inibidas para IRS2 (shIRS2) foram tratadas com ruxolitinibe (100 ou 300nM) ou com veículo apenas (DMSO) por 48 horas e submetidas a imunoblotting (IB) para as proteínas JAK2, STAT3, STAT5, ERK, AKT e P70S6K em suas formas totais e fosforiladas, conforme indicado nas figuras. A revelação foi realizada com o *ECL Western Blot Analysis System*. As células HEL shIRS2 apresentaram redução da fosforilação de STAT5 e aumento de pERK, enquanto que a inibição de IRS2 nas células U937 levou apenas a aumento de pERK. 41

Figura 11. O silenciamento de IRS2 reduz a viabilidade celular e possui efeitos cumulativos com ruxolitinibe em células HEL. A viabilidade celular foi determinada pelo ensaio de methythiazole-tetrazolium (MTT) após 48 horas de incubação de células shIRS2 HEL (A, B) ou U937 (C, D), normalizadas pelo controle correspondente. Os resultados são mostrados como média ± desvio padrão de oito experimentos diferentes. A comparação entre células shControle e shIRS2 foi realizada através de teste de *Mann-Whitney* (A, C). A comparação da curva de resposta de células shControle e shIRS2 foi realizada através de teste de *Anova* (B, D). 43

Figura 12. O silenciamento de IRS2 reduz a clonogenicidade e possui efeitos cumulativos com ruxolitinibe em linhagem HEL. O crescimento clonal foi determinado pelo ensaio de formação de colônias. Colônias contendo células viáveis foram detectadas após 8 dias de cultura de células shIRS2 HEL (A, B, E) ou U937 (C, D, F), tratadas com

ruxolitinibe (100 ou 300nM) ou com veículo apenas (DMSO), e normalizadas pelo controle correspondente. Os resultados são mostrados como média $\pm$ desvio padrão de dez experimentos diferentes **(A - D)**. A comparação entre células shControle e shIRS2 foi realizada através de teste *t Student* **(A, C)**. A comparação da curva de resposta de células shControle e shIRS2 foi realizada através de teste de *Anova* **(B, D)**. As imagens fotográficas das colônias (painéis inferiores) são ilustrativas de um único experimento em células HEL **(E)** e U937 **(F)**. 44

Figura 13. O silenciamento de IRS2 induz apoptose em células HEL e possui efeitos cumulativos com ruxolitinibe. **(A)** Apoptose avaliada por citometria de fluxo (células anexina V positivo / PI negativo) em células HEL shControle e shIRS2 tratadas com veículo apenas ou com ruxolitinibe. **(B)** Avaliação da ativação de caspase-3 por imunoblotting (IB) com anticorpo que reconhece caspase 3 total e caspase-3 clivada em células HEL shControle e shIRS2 tratadas com veículo apenas ou ruxolitinibe, evidenciando maior geração de caspase-3 clivada nas células inibidas para IRS2; pode-se observar efeito cumulativo da inibição de IRS2 com ruxolitinibe sobre a apoptose através da maior geração de caspase-3 clivada. **(C)** Porcentagem de caspase-3 observada por citometria de fluxo em células HEL sob as mesmas condições. **(D)** Apoptose avaliada por citometria de fluxo (células anexina V positivo/ PI negativo) em células U937 shControle e shIRS2 tratadas com veículo apenas ou com ruxolitinibe, e **(E)** por imunoblotting (IB) com anticorpo anti- caspase-3, que reconhece caspase 3 total e caspase-3 clivada, não sendo observada geração de caspase-3 clivada; extrato total de células HEL tratadas com ruxolitinibe foi adicionado ao experimento como controle positivo do bom funcionamento do anticorpo para a forma clivada de caspase-3. Média $\pm$ desvio padrão de dez experimentos diferentes estão representados nos gráficos de apoptose por citometria de fluxo, teste *t de Student*. As imagens de *dot plots* e imunoblotting são ilustrativas de um único experimento. 46

Figura 14. Mutações *indel* no gene *Calreticulina (CALR)* em pacientes com neoplasias mieloproliferativas (NMP). **(A)** Amplificação por PCR do éxon 9 do gene *CALR* corrido em gel de agarose 4%; linha 1: marcador de peso molecular 100pb (M); linha 2: controle negativo (NTC); linhas 3 a 8: amplicons de *CALR*. Pacientes com NMP #1 e #2: selvagens para *CALR* (amplicons *CALR*^{WT}: 297bp); #3 e #4 heterozigotos para o tipo-1 de mutação em *CALR* (amplicons *CALR*^{WT}: 297bp; amplicons *CALR*^{MUT} tipo-1: 245bp); #5 e #6: heterozigotos para o tipo-2 de mutação em *CALR* (amplicons *CALR*^{WT}: 297; amplicons *CALR*^{MUT} tipo-2: 302bp); #7: heterozigotos para mutação em *CALR* que não pertence ao tipo-1 e -2

(amplicons *CALR*^{WT}: 297bp; amplicons *CALR*^{MUT}: 291bp). **(B)** Análise por tamanho de fragmento para amplicons de *CALR* em pacientes com NMP: os picos em laranja representam o marcador de peso molecular *GeneScan 500 LIZ dye Size Standard* e os picos em azul representam os amplicons de *CALR*; as setas pretas indicam o alelo selvagem (297pb) e as setas vermelhas indicam os alelos mutados. 50

Figura 15. Aumento da expressão do mRNA de *IRS2* em células CD34⁺ de pacientes com trombocitemia essencial em relação aos doadores normais. Análise da expressão gênica de *IRS2* em células CD34⁺ de sangue periférico de doadores normais e de pacientes com diagnóstico de trombocitemia essencial (TE), policitemia vera (PV) e mielofibrose primária (MFP). Os pontos representam a expressão gênica de *IRS2* em cada sujeito avaliado e as barras horizontais indicam a mediana de cada grupo. O número de indivíduos incluídos em cada grupo (n) está indicado na figura. Foi observada maior expressão de *IRS2* no grupo de TE em relação aos doadores normais ($p=0,027$); embora tendência semelhante tenha sido observada nos grupos de PV e MFP em relação aos controles, esta diferença não foi estatisticamente significativa. Teste de *Mann-Whitney*. 52

Figura 16. Aumento da expressão do mRNA de *IRS2* em células CD34⁺ de pacientes com neoplasias mieloproliferativas (TE, PV, MFP) com mutação *JAK2*^{V617F} em relação a pacientes com *JAK2* selvagem (*JAK2*^{WT}). Análise da expressão gênica de *IRS2* em células CD34⁺ de sangue periférico de doadores normais e pacientes com diagnóstico de trombocitemia essencial, policitemia vera e mielofibrose primária categorizados com base na presença da mutação *JAK2*^{V617F}. Os pontos representam a expressão gênica de *IRS2* em cada sujeito avaliado e as barras horizontais indicam a mediana de cada grupo. O número de indivíduos incluídos em cada grupo (n) está indicado na figura. Foi observada maior expressão de *IRS2* no grupo de pacientes com a mutação *JAK2*^{V617F} em relação aos pacientes com *JAK2* selvagem ($p<0,001$) e aos doadores normais ($p=0,01$). Teste de *Mann-Whitney*. 54

Figura 17. Ausência de correlação entre a quantificação do alelo mutante de *JAK2*^{V617F} e a expressão do mRNA de *IRS2* em pacientes com neoplasias mieloproliferativas. Análise da correlação entre a expressão gênica de *IRS2* em células CD34⁺ de sangue periférico de pacientes com diagnóstico de NMP (n=55) (trombocitemia essencial (n=14), policitemia vera (n=24) e mielofibrose primária (n=17)) e a quantificação do alelo mutante de

JAK2^{V617F} em células totais de sangue periférico. Não foi observada correlação entre os parâmetros avaliados ($r=-0,12$, $p=0,35$). Teste de correlação de *Spearman*. 56

Figura 18. Redução da expressão do mRNA de *IRS2* em células CD34⁺ de pacientes com neoplasias mieloproliferativas (TE, PV, MFP) com mutações (tipo 1 e tipo 2) em *CALR* em relação a pacientes com *CALR* selvagem (*CALR*^{WT}). Análise da expressão gênica de *IRS2* em células CD34⁺ de sangue periférico de pacientes com diagnóstico de trombocitemia essencial (TE), policitemia vera (PV) e mielofibrose primária (MFP) categorizados com base na presença de mutações em *CALR* (*CALR*^{MUT}). Os pontos representam a expressão gênica individual de cada sujeito avaliado e as barras horizontais indicam a mediana de cada grupo. O número de indivíduos incluídos em cada grupo (n) está indicado na figura. Foi observada maior expressão gênica de *IRS2* no grupo de pacientes com *CALR* selvagem (*CALR*^{WT}) em relação aos pacientes com *CALR* mutada (*CALR*^{MUT}) ($p=0,01$) e aos doadores normais ($p=0,02$). Teste de *Mann-Whitney*. 57

Figura 19. Heredograma da família com mastocitose sistêmica em estudo. O heredograma foi construído com base nas informações fornecidas pelo caso 1 (caso índice, indicado pela seta). Em cinza, estão indicados os indivíduos acometidos / sintomáticos. 59

Figura 20. Infiltração maciça por mastócitos na medula óssea e no baço do caso 1. (A) Mielograma ao diagnóstico evidenciando infiltração maciça por mastócitos (setas). **(B)** Histologia da medula óssea: intensa hiperplasia da medula óssea secundária a infiltração por grandes aglomerados de mastócitos; são observados escassos remanescentes hematopoéticos das linhagens eritroide e megacariocítica (HE, 400x). **(C)** Histologia do baço em detalhe; denso infiltrado de mastócitos e focos de necrose (HE, 250x). **(D)** Baço difusamente infiltrado por mastócitos, entremeados por remanescentes da polpa branca (HE, 100x). 62

Figura 21. Extensa infiltração por mastócitos na medula óssea e na pele do caso 2. (A) Mielograma ao diagnóstico evidenciando infiltração por mastócitos de características maduras (setas). **(B)** Histologia da medula óssea: intensa hiperplasia secundária à presença de grandes focos de mastócitos; escassos remanescentes das linhagens eritroide e megacariocítica são observados (HE, 400x). **(C)** Histologia da pele: infiltração da derme superficial por agrupamentos de mastócitos, com padrão perivascular (HE, 250x). **(D)** Histologia da pele em detalhe; as células neoplásicas apresentam núcleos arredondados e citoplasma abundantemente granular (HE, 1000x). 63

Figura 22. Identificação da mutação germinativa KIT^{K509I} nos casos 1 e 2. Cromatogramas derivados de sequenciamento gênico pela técnica de Sanger. As setas indicam a mutação KIT^{K509I} (c. 1526 A>T) identificada no caso 1 **(A)** e no caso 2 **(B)**. A mutação foi observada em amostras de DNA de medula óssea total (MO), de células CD3⁺ purificadas de sangue periférico e de mucosa oral, como indicado na figura. **(C)** A análise de sequenciamento de *KIT* pela técnica de Sanger de células de sangue periférico da mãe e do pai do caso 1 não revelou mutações em *KIT*. 65

Figura 23. O tratamento com imatinibe, dasatinibe e PKC412 reduz a viabilidade celular *in vitro* de células totais de medula óssea com a mutação KIT^{K509I}. Viabilidade celular avaliada pela técnica de MTT: células totais de medula óssea dos casos 1 e 2 foram submetidas a tratamento com veículo apenas (DMSO, controle), imatinibe (5µM), dasatinibe (80nM) ou PKC412 (100nM), como indicado na figura. A viabilidade celular foi determinada nos dias 4, 8 e 12 de tratamento, e normalizada pelas células controle. Os resultados são mostrados como média ± desvio padrão de seis replicatas comparadas às células controle do mesmo dia de cultura; **p*<.05; ***p*<.01; teste t de *Student*. 66

Figura 24. O tratamento com imatinibe induz apoptose *in vitro* de células totais de medula óssea com a mutação KIT^{K509I}. Apoptose avaliada por citometria de fluxo com marcação para Anexina V / PI; as células apoptóticas são representadas pelas células Anexina V positivas / PI negativas. Células totais de medula óssea dos casos 1 e 2 foram submetidas a tratamento com veículo apenas (DMSO, controle), imatinibe (5µM), dasatinibe (80nM) ou PKC412 (100nM), como indicado na figura. A apoptose celular foi determinada nos dias 4, 8 e 12 de tratamento, e normalizada pelas células controle. Os resultados são mostrados como média ± desvio padrão de três replicatas comparadas às células controle do mesmo dia de cultura; **p*<.05; ***p*<.01; teste t de *Student*. 67

Figura 25. O tratamento com imatinibe, dasatinibe e PKC412 reduz a fosforilação de P70S6K de células totais de medula óssea com a mutação KIT^{K509I}. Extratos proteicos de células totais de medula óssea dos casos 1 e 2 tratadas com veículo apenas, imatinibe (5µM), dasatinibe (80nM) ou PKC412 (100nM) por 12 dias foram submetidos a análise por imunoblotting com anticorpos específicos para P70S6K total e fosforilada, como indicado na figura. Observa-se redução na fosforilação de P70S6K após o tratamento com as três drogas testadas. 68

Figura 26. Resposta clínica ao imatinibe obtida no caso 1 três meses após o início do tratamento. (A, C) *Rash* cutâneo difuso, de característica infiltrativa, observado na paciente 1 ao diagnóstico. (B, D) Clareamento completo da pele três meses após o início do tratamento com mesilato de imatinibe 400mg/dia. Cicatriz mediana resultante da esplenectomia prévia pode ser observada. 69

Figura 27. Resposta clínica ao imatinibe obtida no caso 2 três meses após o início do tratamento. (A, C) *Rash* cutâneo difuso, de característica infiltrativa, observado na paciente 2 ao diagnóstico. (B, D) Clareamento completo da pele três meses após o início do tratamento com mesilato de imatinibe 400mg/dia..... 70

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Sequência e concentração ótima dos iniciadores de <i>IRS2</i> e <i>HPRT</i> utilizados nos experimentos de PCRq	23
Tabela 2. Iniciadores específicos para os 21 exons de <i>KIT</i> e temperaturas de anelamento... ..	24
Tabela 3. Anticorpos utilizados nos experimentos de western blot e/ou imunoprecipitação. ..	29
Tabela 4. Características clínicas, laboratoriais e moleculares dos pacientes com PV, TE e MFP incluídos no estudo	48
Tabela 5. Maiores níveis do mRNA de <i>IRS2</i> em pacientes com a mutação $JAK2^{V617F}$	55
Tabela 6. Características clínico - laboratoriais das pacientes com mastocitose sistêmica familiar	61

LISTA DE ABREVIACÕES

APC - *Allophycocyanin*

AST- Aspartato aminotransferase

ASXL1 - *Additional sex combs like transcriptional regulator 1*

BCR-ABL1 - Gene de fusão BCR (*breakpoint cluster region*) - ABL1 (*Abelson murine leukemia viral oncogene homolog 1*)

BSA - *Bovine serum albumin*

CALR - *Calreticulin*

CALR^{MUT} - Muta  o em *Calreticulin*

cDNA - *Complementary DNA*

CEP - Comitê de   tica em pesquisa

DIPSS - *Dynamic International Prognostic Scoring System*

DMSO - Dimetilsulfóxido

DNA -   cido desoxirribonucleico

DNMT3A - *DNA (cytosine-5-)-methyltransferase 3 alpha*

dNTP - Desoxirribonucleotídeos fosfatados

DO - Densidade   ptica

EPO - Eritropoetina

EPOR - Receptor de eritropoetina

ERK - *Extracellular signal-regulated kinase* / pERK - forma fosforilada de ERK

ET - Extrato total

EZH2 - *Enhancer of zeste homolog 2*

FGFR1 - *Fibroblast growth factor receptor 1*

FIP1L1-PDGFR   - Gene de fus  o FIP1 (*Fip1-like-1*) - PDGFR   (*platelet derived growth factor receptor alpha*)

FITC - *Fluorescein isothiocyanate*

GH - *Growth hormone*

Gab1 - *Grb-associated binder-1*
 Grb2 - *Growth factor receptor-bound protein 2*
 GIST - *Gastrointestinal stromal tumors*
 GM-CSF - *Granulocyte macrophage colony-stimulating factor receptor*
 HE - Hematoxilina-Eosina
 HPRT - *Hypoxanthine Phosphoribosyltransferase 1*
 HRP - *Horseradish peroxidase*
 IB - *Imunoblotting*
 IDH1/2 - *Isocitrate dehydrogenase 1*
 IFN $\alpha/\beta/\gamma$ - Interferon $\alpha/\beta/\gamma$
 IGF-1 - *insulin-like growth factor 1*
 IGF-1R - Receptor de IGF-1
 IL 3, 5, 6 - Interleucina 3, 5, 6
 IP - Imunoprecipitado
 IR - Receptor de insulina
 IRS 1, 2, 3, 4 - Substratos do receptor de insulina 1, 2, 3, 4
 ITK - Inibidor de tirosinoquinase
 JAK 1, 2, 3 - Janus Kinase 1, 2, 3
 JAK2 - Janus Kinase 2 / pJAK2 - forma fosforilada de JAK2
 JAK2^{WT} - *JAK2* selvagem
 JAK2^{V617F} - *JAK2* com a mutação V617F
 JH 1, 2 - *Janus homology domains 1, 2*
 KIT - *V-kit Hardy-Zuckerman 4 feline sarcoma viral oncogene homolog*
 KIT^{D816V} - *KIT* com a mutação D816V
 KIT^{K509I} - *KIT* com a mutação K509I
 LDH - Lactato desidrogenase

LMA - Leucemia mieloide aguda

LMC - Leucemia mieloide crônica

MAPK - *Mitogen-activated protein kinases*

MFP - Mielofibrose primária

MO - Medula óssea

MOI - *Multiplicity of infection*

MPL - *MPL proto-oncogene, thrombopoietin receptor*

MPL^{W515L} - *MPL* com a mutação W515L

mRNA - RNA (ácido ribonucleico) mensageiro

mTOR - *Mechanistic target of rapamycin*

MTT - Methylthiazoletetrazolium

MS - Mastocitose sistêmica

NMP - Neoplasias mieloproliferativas

OMS - Organização Mundial de Saúde

P70S6K - *Ribosomal protein S6 kinase* / pP70S6K - forma fosforilada de P70S6K

PCR: Reação em cadeia da polimerase

PCRq: Reação em cadeia da polimerase quantitativa

PDGFRB - *Platelet derived growth factor receptor beta*

PI - Iodeto de propídeo

PI3K - *Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase*

PTB - *Phosphotyrosine-binding domain*

pTyr - Fosfotirosina

PV - Policitemia vera

RFLP - Análise de polimorfismos através de restrição de fragmentos de PCR

RNA - *Ribonucleic acid*

SCF - *Stem cell factor*

SF3B1 - Splicing factor 3b, subunit 1

SFB - Soro fetal bovino

SH2 - Src homology-2 domain

shControle - Controle negativo da inibição por lentivírus

shIRS2 - Inibição por lentivírus de IRS2

shRNA - Short hairpin RNA

SP - Sangue periférico

STAT - Signal transducer and activator of transcription

STAT5 - Signal transducer and activator of transcription 5 / pSTAT5: forma fosforilada de STAT5

STAT3 - Signal transducer and activator of transcription 3 / pSTAT3: forma fosforilada de STAT3

TE - Trombocitemia essencial

TET2 - Tet methylcytosine dioxygenase 2

TK - Tirosoquinase

TNF α / β / γ - Tumor necrosis factor α / β / γ

TYK2 - Tyrosine kinase 2

VEGF - Vascular endothelial growth factor

1. Introdução

Neoplasias mieloproliferativas crônicas e as tirosinoquinases

As neoplasias mieloproliferativas crônicas (NMP) são doenças clonais malignas do sistema hematopoético que acometem uma ou mais linhagens mieloides (granulocítica, eritroide, megacariocítica ou de mastócitos), caracterizadas pela exacerbação da proliferação celular resultante de hipersensibilidade a citocinas ou de independência da regulação normal mediada por estas citocinas (1-3). Como consequência, ocorre aumento da celularidade com manutenção da capacidade de diferenciação mieloide terminal (4). Possuem um curso inicial caracteristicamente insidioso; evolutivamente, no entanto, podem apresentar perda da capacidade de diferenciação celular, aumento do número de blastos e transformação para leucemia aguda, decorrentes de alterações genéticas adicionais (5).

De acordo com a classificação das neoplasias linfohematopoéticas da Organização Mundial de Saúde (OMS, 2008), as NMP são divididas conforme a presença do gene de fusão BCR-ABL1, responsável pelo desenvolvimento da leucemia mieloide crônica (LMC). As NMP BCR-ABL1 negativas são classificadas em policitemia vera (PV), trombocitemia essencial (TE), mielofibrose primária (MFP), mastocitose, leucemia neutrofílica crônica, leucemia eosinofílica crônica e neoplasias mieloproliferativas não classificadas (5).

A maior parte das NMP resulta de eventos genéticos nas células-tronco hematopoéticas que levam à ativação constitutiva de tirosinoquinases e mimetizam a sinalização celular induzida por fatores de crescimento hematopoéticos (2, 4). Como exemplo, na leucemia mieloide crônica, a atividade tirosinoquinase é induzida pelo gene de fusão *BCR-ABL1*; nas síndromes hipereosinofílicas, pode ser causada pelos genes *FIP1L1-*

PDGFRA, *FGFR1* e *PDGFRB*; na mastocitose, por mutações em *KIT*; e, em policitemia vera, trombocitemia essencial e mielofibrose primária, mutações em *JAK2*, *CALR* e *MPL* são capazes de ativar a atividade tirosinoquinase e induzir proliferação celular exacerbada (2, 3, 5).

Com a finalidade de minimizar os riscos de eventos tromboembólicos, que compõem a principal causa de morbimortalidade de PV e TE, os agentes citorredutores são o principal tratamento para os pacientes de alto risco com estas neoplasias (alto risco definido por idade avançada e antecedente de eventos tromboembólicos). Na PV, a redução do hematócrito é o principal alvo da terapia, e a hidroxiureia é a droga mais utilizada. Na TE, o objetivo do tratamento é o controle das contagens plaquetárias e hidroxiureia e anagrelide são as drogas de primeira linha (3, 6). Na MFP, além da citorredução nos pacientes de alto risco, o uso do inibidor de JAK1/2 ruxolitinibe apresentou benefício comprovado na redução da esplenomegalia e na melhora dos sintomas constitucionais; embora estudos recentes sugiram um potencial benefício na sobrevida, é necessário maior tempo de seguimento dos pacientes em uso de ruxolitinibe para avaliação mais acurada deste desfecho (7).

1.1. Subprojeto 1: IRS2 e as neoplasias mieloproliferativas crônicas

A patogênese das neoplasias mieloproliferativas crônicas: algo além de JAK2

Policitemia vera, trombocitemia essencial e mielofibrose primária são neoplasias mieloproliferativas crônicas caracterizadas pelo predomínio de proliferação eritroide, megacariocítica e megacariocítica/granulocítica, respectivamente, mantendo a capacidade de diferenciação celular terminal.

Em sua fase inicial, caracterizam-se por aumento da celularidade da medula óssea e das contagens celulares no sangue periférico, sendo observadas panmielose com predomínio de poliglobulia na PV, aumento de megacariócitos com trombocitose na TE, e panmielose com predomínio das linhagens granulocítica e plaquetária na MFP. Como principal consequência, apresentam risco aumentado de eventos tromboembólicos, culminando em elevadas taxas de morbidade, além de hepatoesplenomegalia resultante do represamento do excesso de células hematopoéticas nesses órgãos ou de hemopoese extramedular, presente em uma parcela dos pacientes. Ao longo de sua evolução, alterações genéticas clonais adicionais podem levar à progressão destas doenças, como consequência de dois processos básicos: (1) fibrose da medula óssea / mielofibrose secundária (PV e TE), e (2) crise blástica / leucemia aguda, que ocorre em 2-3% das PV, <5% das TE e 5-30% das MFP, levando a altas taxas de mortalidade (2, 3, 5, 8). As principais características de cada uma destas neoplasias estão ilustradas na **Figura 1**.

Por possuírem características clínico-morfológicas homogêneas e história natural bem definida, aventou-se a hipótese de que essas doenças pudessem apresentar como etiologia comum a desregulação de um gene específico, particularmente com atividade tirosinoquinase. Em 2005, a descrição de uma mutação recorrente no gene da tirosinoquinase Janus kinase 2 (*JAK2*) no cromossomo 9p (mutação *JAK2*^{V617F}) (1, 9, 10) em parcela significativa dos casos dessas neoplasias (~95% PV, ~40-50% TE, ~50% MFP), e, posteriormente, a descrição de mutações no éxon 12 de *JAK2* em casos de PV levantaram a hipótese de que estas mutações pudessem ser o fator etiológico comum nessas neoplasias (2, 3, 5, 10, 11).

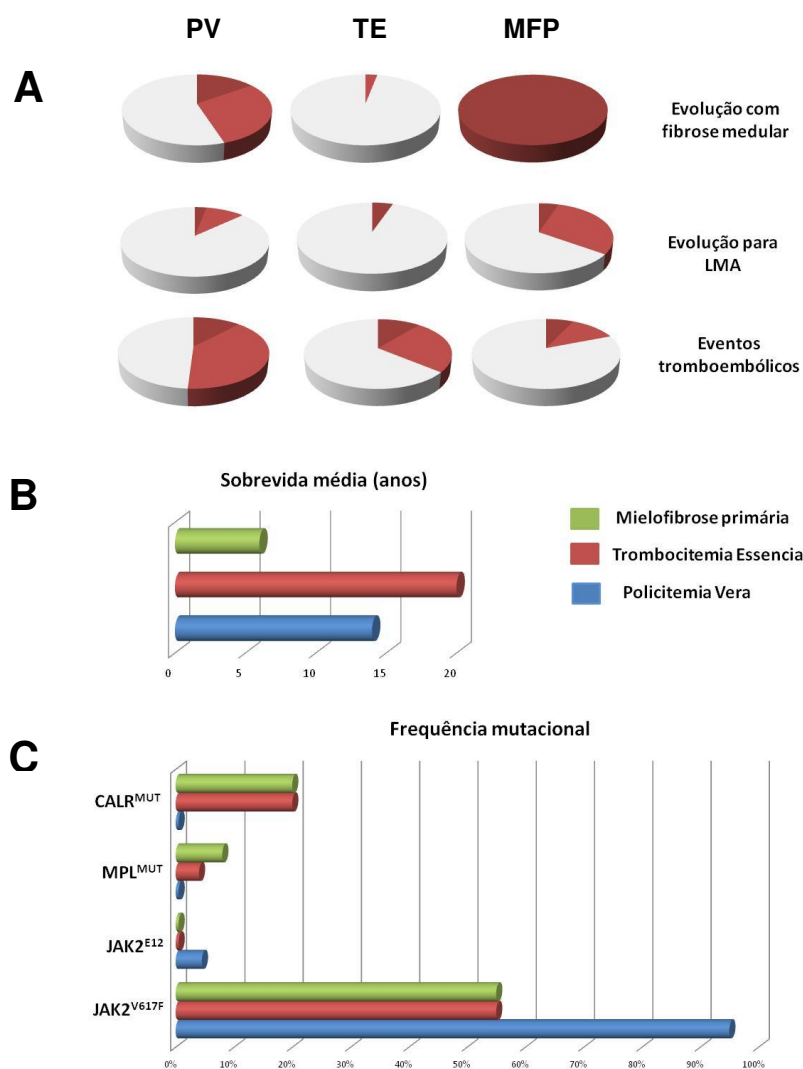


Figura 1. Caracterização clínica e mutacional de policitemia vera (PV), trombocitemia essencial (TE) e mielofibrose primária^(2, 5, 6, 12-15). **(A)** Incidência média de evolução para fibrose de medula óssea, leucemia mieloide aguda (LMA) e eventos tromboembólicos em PV, TE e MFP, conforme indicado. As áreas em vermelho escuro e em vermelho claro representam as incidências mínimas e máximas, respectivamente, reportadas na literatura em análises populacionais. **(B)** Sobrevida média, em anos, dos pacientes com PV, TE e MFP. **(C)** Frequência de mutações (%) em *CALR*, *MPL* e *JAK2*, conforme indicado, em indivíduos com PV, TE e MFP.

A família das JAK quinases foi inicialmente identificada em 1989, e engloba quatro tirosinoquinases intracitoplasmáticas (JAK1, JAK2, JAK3, TYK2) (2, 16) que se associam à porção intracelular dos receptores de citocinas e de fatores de crescimento hematopoéticos

que não possuem atividade tirosinoquinase intrínseca. Dentre eles, destacam-se três receptores mieloides: eritropoetina (EPOR), trombopoetina (MPL) e GM-CSF. As JAK quinases também medeiam sinalização de IL-3, IL-5, IL-6, hormônio de crescimento, prolactina, IFN γ e TNF $\alpha/\beta/\gamma$ (2, 17, 18). Após sua interação com os receptores, as JAK quinases ativam cascatas de sinalização intracelular, sobretudo as proteínas STAT (18), e as vias MAPK (19, 20) e PI3K/Akt/mTOR (21, 22), que, por sua vez, translocam para o núcleo e ativam genes-alvo de proliferação celular, angiogênese e resistência à apoptose, podendo levar ao desenvolvimento de neoplasias.

Estruturalmente, as JAK quinases contêm sete domínios, dentre os quais se destacam os domínios homólogos JH1, com atividade tirosinoquinase, e o domínio inativo JH2, pseudoquinase. Embora não possua atividade quinase intrínseca, o domínio JH2 é um regulador negativo de JH1; desta forma, mutações inativadoras de JH2 (p.ex., JAK2^{V617F} e mutações no exon 12 de JAK2) são capazes de exacerbar a atividade tirosinoquinase de JH1 (**Figura 2**), com consequente hiperresponsividade a citocinas e a fatores de crescimento, e ativação autônoma (2, 9, 10, 23, 24).

A mutação JAK2^{V617F} leva à ativação de JAK2, STATs, PI3K, AKT e ERK de forma independente do estímulo mediado por citocinas (25-28); estas vias, por sua vez, estão envolvidas na sinalização mediada por EPOR (29-32). Estudos prévios correlacionaram a medida da expansão dos clones JAK2^{V617F} positivos (quantificação do número de cópias do alelo mutante) com características clínicas fenotípicas das NMP BCR-ABL1 negativas, como leucocitose e plaquetopenia mais acentuadas (33) e maior taxa de fibrose medular (34).

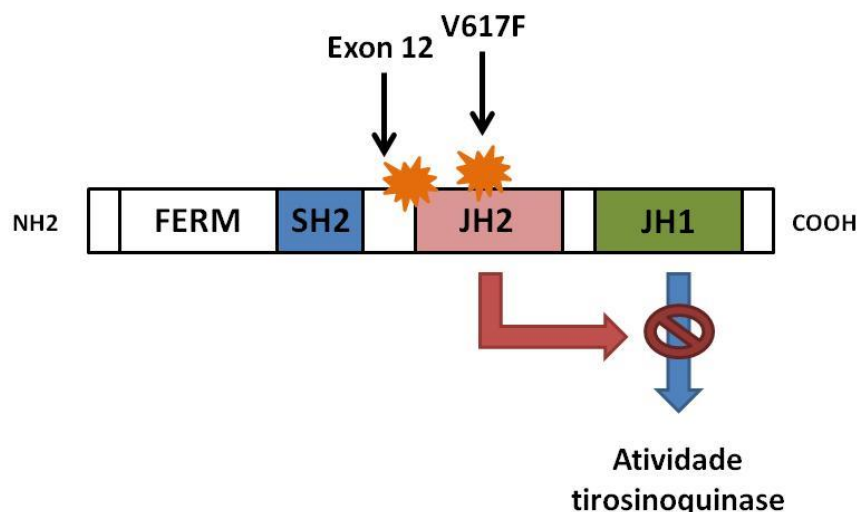


Figura 2. Representação esquemática de JAK2 e o efeito das mutações do exon 12 e V617F na atividade proteica. As regiões de homologia compartilhadas pelas proteínas da família JAK são denominadas *JAK homology domains* (JH). Assim como os domínios SH2 (*Src homology*), os domínios JH são nomeados da direção C para N terminal. O domínio JH1 constitui-se no domínio quinase propriamente dito, responsável pela atividade tirosinoquinase de JAK2; o domínio JH2 é um domínio pseudoquinase, que regula negativamente a atividade de JH1. A presença da mutação V617F leva à perda de função de JH2. Da mesma forma, mutações no exon 12 de JAK2, localizadas na região entre os domínios JH2 e SH2, causam alteração conformacional de JH2, com consequente perda de função deste domínio. A perda da regulação negativa de JH2 sobre JH1, por sua vez, culmina no aumento da atividade tirosinoquinase de JAK2, com consequente proliferação celular exacerbada.

Diante destas evidências, fármacos inibidores de JAK2 foram desenvolvidos com a finalidade de reduzir a proliferação celular em PV, TE e MFP. De um modo geral, os inibidores de JAK2 levaram a uma diminuição do tamanho do baço, melhora dos sintomas sistêmicos e da capacidade física; entretanto, ainda não foram evidenciadas respostas satisfatórias no que se refere à mudança na expressão do alelo mutado ou à erradicação do clone mutado (17, 35). Além disso, é sabido que a mutação $JAK2^{V617F}$ também pode acometer os linfócitos B e T em NMP sem que haja proliferação descontrolada da série linfocitária (36). Estudos recentes mostraram que a ativação das principais vias de proliferação celular nas NMP (STAT, MAPK e PI3K/Akt/mTOR) independe da presença da mutação de JAK2 (37). Da mesma forma, a mutação isolada de *JAK2* não parece ser suficiente para a ativação da via da AKT (27). Mutações recorrentes também foram descritas

nos genes *MPL* e da *calreticulina* (*CALR*) em pacientes com NMP, sendo capazes de induzir o fenótipo de TE e MFP (38-41). Em 2006, foi descrita uma mutação recorrente no gene *MPL* (*MPL*^{W515L}), que codifica o receptor da trombopoetina, com incidência aproximada de 5% das MFP e 1% das TE (38, 39). A mutação *MPL*^{W515L}, assim como *JAK2*^{V617F}, é capaz de induzir a ativação de STAT5 (42). As mutações somáticas em *CALR* foram inicialmente descritas em 2013 em pacientes com TE e MFP (40, 43), e, posteriormente, confirmadas por outros grupos. Com raríssimas exceções, são mutuamente exclusivas com as mutações de *JAK2* e *MPL*, estando presentes em 56-88% dos casos negativos para estas mutações. As mutações de *CALR* mais frequentes (~80%) são classificadas em tipo-1 (L367fs*46, deleção de 52pb) e tipo-2 (K385fs*47, inserção de 5pb) (40, 43). As alterações funcionais desencadeadas pelas mutações não estão completamente elucidadas, mas a superexpressão de uma mutação tipo-1 de *CALR* em células Ba/F3 resultou em crescimento celular independente de citocinas e ativação de STAT5 (43). Mutações em reguladores epigenéticos (*TET2*, *DNMT3A*, *IDH1/2*, *EZH2*, *ASXL1*) têm sido recentemente descritas em NMP e poderiam contribuir na patogênese destas doenças (44).

Embora esses dados indiquem a participação das mutações de *JAK2* na patogênese das PV, TE e MFP, elas não parecem ser o único fator causal. É provável que outros mecanismos associados, genéticos ou epigenéticos, estejam envolvidos na desregulação da proliferação celular, contribuindo para o fenótipo das NMP.

IRS2 e as vias de proliferação celular

Os receptores de insulina (IR) pertencem à família dos receptores de superfície com atividade tirosinoquinase intrínseca. Apresentam duas subunidades α extracelulares e duas subunidades β transmembrana ligadas por pontes dissulfídicas. A insulina liga-se à subunidade α , induzindo a fosforilação da subunidade β , com subsequente ativação de seus

substratos - IRS 1, 2, 3 e 4 – e de suas respectivas vias de sinalização (45-48). O conhecimento da função dos substratos do receptor de insulina (IRS) deve-se, em grande parte, aos estudos realizados com a via de sinalização da insulina.

IRS2 é uma proteína adaptadora de 180kDa descrita em 1995 como sendo equivalente à proteína 4PS, previamente identificada como substrato associado ao receptor de IL-4 em células mieloides (49). IRS2 medeia sinalização mitogênica e antiapoptótica de IR, IGF-1R, EPOR, MPL, VEGF, leptina, GH, interleucinas e IFN $\alpha/\beta/\gamma$, apresentando um importante papel na resposta aos estímulos de citocinas e de fatores de crescimento em células hematopoéticas, além de influenciar a proliferação de células neoplásicas (50-59). É sabido que a ativação do receptor de insulina resulta na associação de IRS2 com a subunidade p85 da PI3K e com Grb2, envolvidas nas vias de ativação PI3K/Akt/mTOR e MAPK, respectivamente (46, 49).

Em células não hematológicas, estudos prévios descreveram o envolvimento de IRS2 na via de sinalização de JAK2 (46, 60, 61). Pesquisas utilizando modelos *in vivo* ou culturas de células musculares lisas de aortas de ratos mostraram que a angiotensina II é capaz de estimular IRS1 e IRS2, como resultado da ativação de JAK2. Nestas células, a angiotensina II estimula a rápida fosforilação de resíduos de tirosina de JAK2, aumentando sua atividade catalítica e sua associação e coimunoprecipitação com IRS1 e IRS2 (47, 62, 63). A associação IRS2-JAK2 também foi descrita em células de ventrículo esquerdo de rato após estímulo com angiotensina (46, 60), e em fígado de rato após estímulo com leptina (61). As principais vias de sinalização em que há envolvimento de IRS2 estão representadas na **Figura 3**.

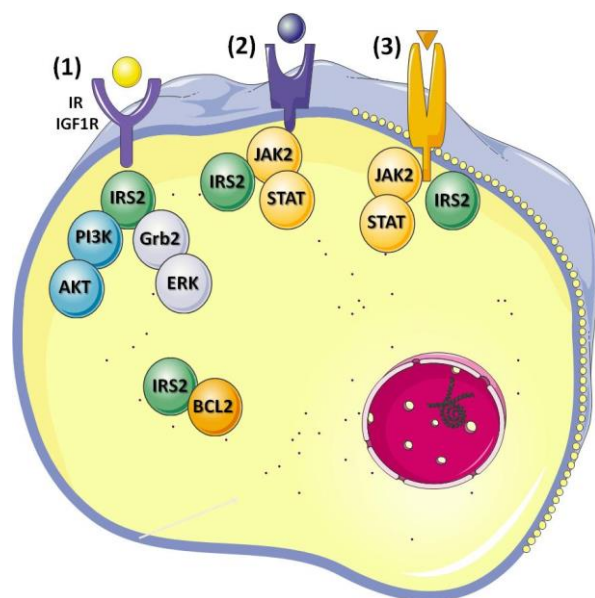


Figura 3. Modelo esquemático da participação de IRS2 em vias de sinalização de proliferação e crescimento celulares. (1) Mediante estímulo de insulina e IGF1 em seus receptores (IR e IGF1R, respectivamente), ocorre associação de suas porções intracelulares com IRS2 e subsequente ativação de AKT e ERK, capazes de ativarem a transcrição de genes responsáveis pelo crescimento e proliferação celulares. (2) A ligação de hormônios e citocinas, como leptina, angiotensina e hormônio de crescimento, a seus receptores específicos leva à ativação de JAK2, associação com IRS2 e ativação *downstream* de vias de proliferação celular. (3) A ativação de receptores por seus ligantes específicos, como eritropoetina (EPO) - receptor de eritropoetina (EPOR), ativa IRS2 diretamente, com subsequente estímulo de AKT e ERK. Embora a ativação de EPOR seja capaz de ativar IRS2 e JAK2 individualmente, o estímulo de IRS2 mediado por EPO ocorre de forma independente de JAK2. A figura foi produzida utilizando o *Servier Medical Art* (<http://www.servier.com/Powerpoint-image-bank>).

Esses dados sugerem que IRS2 possa ser elemento comum na sinalização de receptores celulares que ativam as vias JAK/STAT, Ras/Raf/MAPK e PI3K/Akt/mTOR, sabidamente envolvidas nos processos de proliferação e sobrevivência celulares e ativadas em neoplasias hematológicas, como síndromes mielodisplásicas e leucemia mieloide aguda (64, 65). Durante a maturação de células da linhagem eritroide, tanto em células normais como em PV, há relatos de que a insulina e o IGF1 ativam a sinalização celular através da fosforilação de IRS1 e IRS2 (66, 67).

A desregulação das vias JAK/STAT, MAPK e PI3K/Akt/mTOR foi descrita em grande variedade de neoplasias. A ativação constitutiva de PI3K/Akt/mTOR é encontrada em 50%

das amostras de LMA ao diagnóstico e pode ser estimulada pela via de sinalização de IGF1/IGF1R, um dos receptores capazes de ativar IRS2. A inibição da interação IGF1/IGF1R através do tratamento com um anticorpo monoclonal neutralizante anti- IGF1R foi capaz de inibir a fosforilação constitutiva de IGF1R e a atividade de PI3K em amostras de LMA (68, 69).

A expressão de IRS2 é aumentada em linhagens celulares de carcinoma de mama metastático agressivo, e células tumorais mamárias deficientes para IRS2 são significativamente mais sensíveis a estímulos apoptóticos, como privação de soro (56, 70). Em células K562 (linhagem celular BCR-ABL1 positiva), foi previamente demonstrado que IRS1, proteína homóloga a IRS2, está constitutivamente fosforilada, associando com BCR-ABL1 e estimulando a atividade de PI3K. Além disso, a inibição farmacológica de BCR-ABL1 com a droga imatinibe resultou em diminuição da fosforilação de IRS1 (71, 72).

Essas evidências sugerem que IRS2 possa participar das vias de sinalização celular nas NMP através de interação direta com JAK2 ou através de um mecanismo independente. Nossa principal hipótese foi a de que o estímulo tirosinoquinase intrínseco promovido pela mutação JAK2^{V617F} poderia mediar a associação constitutiva JAK2/IRS2 em NMP de forma análoga à associação proteica JAK2/IRS2 que ocorre após estímulo de citocinas em células não hematológicas, e que IRS2 poderia estar implicada na patogênese das NMP.

No subprojeto 1 deste estudo, avaliamos a interação IRS2/JAK2 em linhagens hematológicas com a mutação JAK2^{V617F} e com JAK2 selvagem, e investigamos a participação de IRS2 na viabilidade celular e na apoptose nestes modelos celulares. Além disso, avaliamos a expressão de *IRS2* em nossa coorte de pacientes com diagnóstico de PV, TE e MFP.

1.2. Subprojeto 2: Mastocitose sistêmica familiar e as mutações em *KIT*

As neoplasias de mastócitos são neoplasias mieloproliferativas crônicas caracterizadas pela proliferação anormal e acúmulo de mastócitos (MC) em diferentes tecidos (73). Sua apresentação clínica é heterogênea, variando de doença limitada à pele (mastocitose cutânea) a variantes mais agressivas (mastocitose sistêmica (MS)), que podem estar associadas a disfunção/falência multiorgânica e sobrevida reduzida (74-80). Embora raros, casos de mastocitose familiar afetando duas ou mais gerações de uma mesma família foram descritos, em sua maioria diagnosticados com a forma cutânea da doença (81-85).

A presença de mutações em *KIT* nos casos de mastocitose familiar é variável e pode estar associada a tumores gastrointestinais estromais do tipo GIST (*gastrointestinal stromal tumors*) (86-89). Em grande parcela dos casos de mastocitose sistêmica, a natureza clonal da doença pode ser estabelecida através da demonstração de mutações com ganho de função envolvendo o domínio tirosinoquinase de *KIT* em amostras de células de pele acometida ou de medula óssea (73).

O proto- oncogene *KIT* codifica um receptor com atividade tirosinoquinase que é estimulado pelo seu ligante, *stem cell factor* (SCF) (90). A ligação de SCF a KIT promove a dimerização e a auto- fosforilação do receptor em resíduos específicos de tirosina, levando à ativação de proteínas ERK, PI3K, Src e STATs (**Figura 4**) (90-92). A mutação de *KIT* mais bem caracterizada é a substituição Asp816Val (D816V), que resulta na auto- fosforilação independente de ligante do receptor KIT (92, 93). Embora o inibidor de tirosinoquinase mesilato de imatinibe seja efetivo na indução de apoptose de mastócitos com *KIT* selvagem, o mesmo não é observado nas células *KIT*^{D816V} (94-96). Alterações genéticas ou epigenéticas associadas a mutações de *KIT* podem alterar a susceptibilidade a determinadas drogas (97, 98). Neste sentido, a caracterização de novas mutações, bem como a avaliação da sensibilidade das células mutadas aos inibidores de tirosinoquinase disponíveis são

fundamentais para que se estabeleça a etiologia e o melhor tratamento em cada caso. No subprojeto 2 deste estudo, descrevemos e caracterizamos um caso de mastocitose sistêmica familiar atendido no ambulatório de hematologia do Hemocentro de Campinas – Unicamp. O atendimento destes casos coincidiu com o nosso interesse em investigar novas alterações moleculares em NMP e permitiu o desenvolvimento do subprojeto 2. Na família estudada, pesquisamos a presença de mutações em *KIT*, avaliamos a sensibilidade *in vitro* das células neoplásicas a três inibidores de tirosinoquinase comumente utilizados em mastocitose sistêmica, e descrevemos a resposta clínica dos pacientes ao tratamento com mesilato de imatinibe.

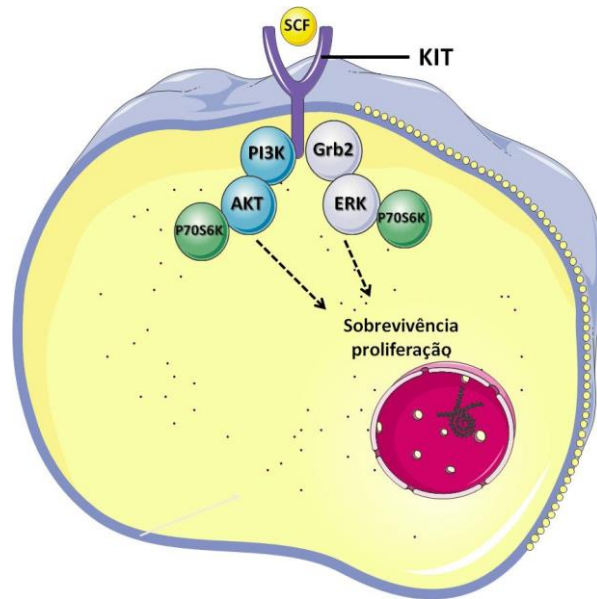


Figura 4. Ativação de AKT e ERK mediante estímulo de KIT. O estímulo do receptor KIT através do SCF (*Stem Cell Factor*) recruta PI3K e Grb2, levando à ativação de AKT e ERK, importantes mediadores da ativação de genes de proliferação e sobrevivência celulares. P70S6K é proteína regulada tanto por AKT quanto por ERK. A figura foi produzida utilizando o *Servier Medical Art* (<http://www.servier.com/Powerpoint-image-bank>).

1.3. Desafios na identificação de mecanismos envolvidos na fisiopatologia das neoplasias mieloproliferativas crônicas e propostas terapêuticas

Embora tenha havido, nos últimos anos, significativo avanço no conhecimento científico a respeito da patogênese das NMP, bem como o desenvolvimento de novas e eficazes terapias dirigidas aos respectivos genes mutados / afetados, existe uma grande parcela dos casos em que não foi identificada nenhuma lesão genética causal. Além disso, a falta de resposta ao tratamento observada em uma parcela significativa dos pacientes sinaliza a necessidade de investigação de novos genes e proteínas que possam estar implicados na fisiopatologia das NMP.

Neste estudo, tivemos por objetivo estudar mecanismos adicionais potencialmente envolvidos nas vias de sinalização celular de JAK2 e KIT. No subprojeto 1, de característica básica aplicada à clínica, investigamos a participação da proteína IRS2 na via JAK2/STAT, bem como sua função nas vias de proliferação celular e apoptose em modelos celulares e em pacientes com PV, TE e MFP; no subprojeto 2, de caráter translacional, buscamos definir a etiologia e os mecanismos moleculares e terapêuticos envolvidos em uma família com o diagnóstico de mastocitose sistêmica atendida no ambulatório de hematologia do Hemocentro de Campinas - Unicamp.

2. Objetivos e hipóteses

2.1. Subprojeto 1 - IRS2 em neoplasias mieloproliferativas crônicas

Objetivo principal: avaliar a participação de IRS2 na fisiopatologia das neoplasias mieloproliferativas crônicas BCR-ABL1 negativas.

Objetivos específicos:

2.1.1. Em linhagens celulares leucêmicas HEL (com mutação JAK2V617F), U937 (JAK2 selvagem (JAK2WT)) e NB4 (JAK2WT), investigar:

- a. A interação de IRS2 com JAK2;
- b. O efeito do silenciamento de IRS2 na expressão e na ativação de proteínas STAT e vias PI3K/AKT/mTOR e MAPK;
- c. O efeito do silenciamento de IRS2 na viabilidade celular e na apoptose;
- d. Os efeitos do silenciamento de IRS2 associado ao tratamento com ruxolitinibe (inibidor seletivo de JAK1/JAK2) na ativação de vias de sinalização, viabilidade celular e apoptose;

2.1.2. Em células de pacientes com PV, TE e MFP:

- a. Realizar a caracterização clínica e molecular (mutações *JAK2* e *CARL*) da coorte de pacientes com NMP incluída no estudo;
- b. Investigar e comparar a expressão gênica de *IRS2* em células CD34⁺ de controles normais e pacientes com NMP;

2.2. Subprojeto 2 - Mutações de *KIT* em mastocitose sistêmica familiar

Objetivo principal: Investigar os mecanismos moleculares envolvidos em um caso de mastocitose sistêmica familiar atendido no ambulatório de hematologia do Hemocentro de Campinas - Unicamp.

Objetivos específicos:

2.2.1. Caracterizar clinicamente os pacientes e familiares pertencentes à família índice;

2.2.2. Pesquisar mutações no gene *KIT* e em genes envolvidos em neoplasias mieloides (*SF3B1*, *TET2* e *DNMT3A* e *ASXL1*) nestes indivíduos;

2.2.3. Testar a susceptibilidade *in vitro* de células primárias dos pacientes a inibidores de tirosinoquinase: mesilato de imatinibe, dasatinibe e PKC412;

2.2.4. Caracterizar a resposta clínica dos pacientes ao tratamento estabelecido.

3. Material e Métodos

3.1. Aspectos éticos da pesquisa

Esta pesquisa e seus termos de consentimento foram aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas da Unicamp (parecer CEP: número 1129/2011 - **Anexos I e II**). Todos os procedimentos da pesquisa, levantamento de dados clínicos e coleta de amostras foram realizados após assinatura em duas vias do termo de consentimento livre e esclarecido pelos indivíduos incluídos no estudo ou pelo responsável legal, no caso dos indivíduos menores de idade.

3.2. Casuística de controles normais e de pacientes com PV, TE e MFP

Para realização do subprojeto 1, foram incluídos no estudo 28 controles normais, recrutados dentre os doadores de sangue do banco de sangue do Hemocentro de Campinas - Unicamp, e 99 pacientes com diagnóstico de NMP, incluindo PV (n=30), TE (n=37) e MFP (n=32), seguidos regularmente no ambulatório de hematologia do Hemocentro de Campinas - Unicamp.

Para o subprojeto 1, todos os pacientes foram recrutados para o estudo ao diagnóstico e/ou durante o seguimento ambulatorial dos pacientes, independentemente do tratamento (ácido acetilsalicílico, hidroxiureia, anagrelide) vigente à época. O diagnóstico dos pacientes foi confirmado com base em dados clínicos, de hemograma, mielograma, biópsia de medula óssea, biologia molecular (pesquisa do transcrito BCR-ABL1 e da mutação JAK2^{V617F}) e citogenética. O diagnóstico definitivo seguiu os critérios recomendados pela OMS, 2008 (5), e foi confirmado por pelo menos três especialistas, incluindo a pesquisadora principal deste estudo.

Com base nos prontuários médicos dos pacientes, foram levantados os seguintes dados: parâmetros do hemograma, visceromegalias (por exame de imagem ou exame físico), mielograma, biópsia de medula óssea, pesquisa do transcrito BCR-ABL1 e da mutação JAK2^{V617F} por biologia molecular, cariótipo, tratamentos recebidos e presença de eventos tromboembólicos.

3.3. Casuística dos indivíduos provenientes da família com mastocitose sistêmica

Para realização do subprojeto 2, duas pacientes (caso 1 [mãe] e caso 2 [filha]) e os pais do caso 1 foram incluídos no estudo. Amostras de medula óssea e sangue periférico foram obtidas antes do uso de inibidores tirosinoquinase em ambas pacientes, porém, após o tratamento com cladribina no caso da paciente 1.

3.4. Coleta e processamentos das amostras dos doadores normais e pacientes com PV, TE e MFP (subprojeto 1)

Foram coletados 20mL de sangue periférico dos doadores normais e dos pacientes com NMP. As amostras utilizadas neste estudo foram coletadas entre fevereiro de 2012 e outubro de 2014, e apresentavam RNA e DNA de boa qualidade no momento da realização dos experimentos.

Células mononucleares de sangue periférico foram obtidas através de gradiente de separação com Ficoll-Hypaque (Sigma, St. Louis, MO, EUA) e submetidas à seleção positiva de células CD34⁺ através de colunas de imunoafinidade MIDI-MACS utilizando anticorpo anti-CD34, de acordo com as instruções do fabricante (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Alemanha). A pureza das amostras foi determinada por citometria de fluxo, utilizando

anticorpos anti-CD34 conjugados com alofocianina (APC; Becton Dickinson, San Jose, EUA), sendo considerados adequados valores acima de 90%, como ilustrado na **Figura 5**. Após a purificação, as células foram submetidas à extração de RNA.

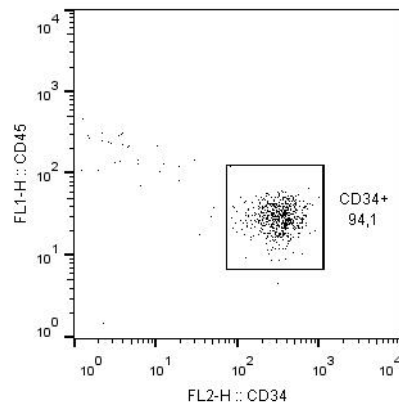


Figura 5. Determinação da pureza das amostras após separação de células CD34⁺. Após a separação por coluna magnética de células CD34⁺ de pacientes com neoplasias mieloproliferativas e doadores normais, o percentual de células CD34⁺ em cada amostra foi determinado por citometria de fluxo utilizando marcação com anticorpos anti- CD34⁺. A figura é representativa de uma única amostra; as células CD34⁺ estão indicadas no quadro menor. Foram consideradas adequadas amostras com pureza superior a 90%.

3.5. Coleta e processamentos das amostras dos indivíduos da família com mastocitose sistêmica (subprojeto 2)

Foram coletados 20mL de medula óssea e sangue periférico das duas pacientes para os estudos funcionais, e 5mL de sangue periférico para separação de soro antes do início do imatinibe e após três meses de tratamento. Adicionalmente, foram coletados 20mL de sangue periférico dos pais do caso 1. Foram obtidas amostras de mucosa bucal das duas pacientes incluídas no estudo.

Para as amostras de sangue periférico das duas pacientes, células mononucleares foram obtidas através de gradiente de separação com Ficoll-Hypaque (Sigma) e submetidas à seleção positiva de células CD3⁺ através de colunas de imunoafinidade MIDI-MACS utilizando anticorpo anti-CD3, de acordo com as instruções do fabricante (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Alemanha). A pureza das amostras foi determinada por citometria de fluxo, utilizando anticorpos anti-CD3 conjugados com alofococianina (APC; Becton Dickinson, San Jose, EUA).

As amostras purificadas de células totais de medula óssea, as amostras de mucosa bucal das pacientes, bem como as células de sangue periférico dos pais do caso 1 foram submetidas à extração de DNA genômico pela técnica de fenol e clorofórmio. As amostras de soro foram submetidas à dosagem de triptase sérica no Laboratório de Patologia Clínica do *Department of Clinical Pathology, Cleveland Clinic*, Cleveland, OH, EUA.

3.6. Linhagens celulares

Para os estudos de associação JAK2/IRS2, das vias de sinalização celular e para os estudos funcionais foram utilizadas como modelos as linhagens leucêmicas humanas HEL (com mutação JAK2^{V617F}, proveniente de paciente com diagnóstico de eritroleucemia) e U937 (originária de paciente com linfoma histiocítico, JAK2^{WT}), obtidas junto à ATCC (Filadélfia, PA, EUA), e NB4 (derivada de um paciente com leucemia promielocítica aguda, JAK2^{WT}), gentilmente cedida pelo Prof. Dr. Eduardo Magalhães Rego (Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, SP, Brasil) (99-102). As células foram cultivadas em meio apropriado contendo 10% de soro fetal bovino, glutamina, penicilina/estreptomicina e mantidas a 37°C, 5% CO₂.

3.7. Inibidor de JAK1/2 e inibidores de tirosinoquinase

Células primárias ou linhagens celulares foram submetidas a tratamentos com inibidores tirosinoquinase específicos. Para o estudo de IRS2, linhagens celulares HEL, U937 e NB4 foram submetidas a tratamento com o inibidor seletivo de JAK1/2 ruxolitinibe nas doses de 0, 3, 10, 30, 100, 300 ou 1000nM, pelos períodos de 6 horas, 48 horas ou oito dias, de acordo com o experimento realizado. As doses e o tempo de tratamento utilizados foram baseados no estudo pré- clínico do ruxolitinibe, publicado previamente (103). Para os experimentos com células primárias dos casos de mastocitose sistêmica, células mononucleares de medula óssea (2×10^5) das pacientes estudadas foram tratadas *in vitro* com DMSO (controle) ou com os inibidores de tirosinoquinase mesilato de imatinibe (5 μ M), dasatinibe (80nM) e PKC412 (100nM) diluídos em DMSO, por 4, 8 e 12 dias. As drogas ruxolitinibe, mesilato de imatinibe e PKC412 foram gentilmente cedidas pela Novartis farmacêutica (Basel, Suíça). O dasatinibe foi adquirido da Bristol-Myers Squibb (New Jersey, EUA). A escolha de imatinibe, dasatinibe e PKC412 para realização dos experimentos deu-se em virtude de sua efetividade em casos de mastocitose sistêmica descrita na literatura (96).

3.8. Extração de RNA e transcrição reversa

O RNA de linhagens celulares ou de células primárias CD34⁺ foi obtido através do kit RNAspin Mini RNA Isolation (GE Healthcare UK Limited, Buckinghamshire, Reino Unido), seguindo as instruções do fabricante. O RNA foi tratado com DNase na etapa de purificação utilizando reagentes do próprio kit. A quantificação do RNA obtido foi realizada através da leitura da densidade óptica (DO) de 1 μ L da amostra em espectrofotômetro com comprimento de onda equivalente a 260nm, considerando que 1 DO a 260nm equivale a 40 μ g/mL de

RNA. A relação entre as leituras realizadas a 260 e 280nm foi utilizada como parâmetro na estimativa do grau de contaminação do RNA por proteínas; esta relação varia normalmente entre 1,6 e 2,1.

Em virtude das baixas concentrações de RNA obtidas nas amostras de células CD34⁺ de sangue periférico dos pacientes com NMP, as amostras foram concentradas utilizando centrifugação com vácuo no aparelho Speed Vac SVC100 (Savant, Farmindale, EUA). Para a transcrição reversa, amostras contendo 1µg de RNA obtido de linhagens celulares ou todo o RNA obtido de células CD34⁺ foram transcritas reversamente em cDNA em uma reação de volume final de 20µL utilizando o kit RevertAid™ First Strand cDNA Synthesis (MBI Fermentas, St. Leon-Rot, Alemanha), de acordo com as instruções do fabricante.

3.9. PCR quantitativo em tempo real (PCRq)

A amplificação em tempo real do gene *IRS2* em amostras de células CD34⁺ de pacientes com NMP (PV, TE e MFP) ou em amostras de linhagens celulares submetidas ao silenciamento gênico foi realizada no aparelho ABI 7500 Sequence Detector System (Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA) utilizando-se Maxima Sybr Green qPCR Master Mix (MBI Fermentas). Duzentos e quarenta ng de cada amostra de cDNA foram utilizados na reação com os iniciadores para *IRS2* ou *HPRT*. A expressão do gene *HPRT* (Hypoxanthine Phosphoribosyltransferase 1) foi utilizada como controle endógeno. Cada reação foi repetida em triplicata no mesmo experimento. As sequências e as concentrações dos iniciadores foram definidas a partir da análise da sequência de nucleotídeos e testes de eficiência, e são descritas na **Tabela 1**. Um controle negativo, sem adição de cDNA, foi realizado para cada par de iniciadores. O protocolo de dissociação foi realizado no final de cada reação para verificar amplificações não específicas. A quantificação relativa da expressão gênica foi calculada utilizando-se a fórmula $2^{-\Delta\Delta CT}$ (104).

Tabela 1. Sequência e concentração ótima dos iniciadores de *IRS2* e *HPRT* utilizados nos experimentos de PCRq

Gene	Concentração	Sequência dos iniciadores
<i>IRS2</i>	300nM	Sense: 5' GAGTGCACCCGTACCTATGGAA 3' Antissense: 5' GAAATCCGGCTTTACCTTGAAGT 3'
<i>HPRT</i>	150nM	Sense: 5' GAACGTCTTGCTCGAGATGTGA 3' Antissense: 5' TCCAGCAGGTCAGCAAAGAAT 3'

3.10. Extração de DNA, reação em cadeia da polimerase (PCR) e sequenciamento gênico

A extração de DNA de células de medula óssea e sangue periférico foi realizada através da técnica de fenol/clorofórmio. As células de mucosa bucal foram obtidas através de bochecho com solução de sacarose por 5 minutos, e lavadas com água deionizada e solução de lavagem (10nM Tris-HCl, 10nM EDTA, 10nM NaCl); o DNA foi extraído do *pellet*, na reação em que foram utilizados subsequentemente 300μL de solução contendo tampão de lise celular e proteinase K, cloreto de lítio 7,5M, acetato de sódio 3M, e etanol 70%.

Para a identificação de mutações no gene *KIT*, DNA genômico foi obtido a partir de amostras totais de medula óssea e sangue periférico, células CD3⁺ de sangue periférico e células de mucosa bucal dos indivíduos estudados. Inicialmente, foi realizada padronização da reação em cadeia da polimerase (PCR) para os 21 éxons do gene *KIT*, representados por 18 pares de iniciadores, utilizando gradiente de doze temperaturas, tendo como valor de base a temperatura de eficiência fornecida pelo fabricante. A PCR foi realizada em uma reação com volume de 25μL (25ng de DNA genômico, 2,5μL do tampão de reação 10x, 0,9μL de MgCl₂ 50mM, 2,0μL de dNTP (10mM), 0,1uL de Taq polymerase Platinum, 2,0uL de cada iniciador a 3nM (sense e antissense) e 14,5uL de H₂O). As condições utilizadas no termociclador foram: 1 ciclo: 94°C por 5 minutos; 35 ciclos: 92°C por 30 segundos, temperatura de anelamento por 30 segundos, 72°C por 30 segundos; 1 ciclo: 72°C por 5

minutos. A sequência dos iniciadores específicos definidos para os exons de *KIT*, bem como as respectivas temperaturas de anelamento padronizadas e utilizadas estão descritas na **Tabela 2**.

Tabela 2. Iniciadores específicos para os 21 exons de *KIT* e temperaturas de anelamento

Exon	Iniciador Sense	Iniciador Antisense	Temperatura anelamento
1	ACTTGGGCGAGAGCTGG	AACGCACGGGCACTGAG	62°C
2	GCTTTATTTGCGCAAGGAAG	TGTCATCCAAAATTAAGAGCAGG	60°C
3	TTTCAGTGTCTGTGACCAGC	CACTAAGGTGGATCAACGAGAAG	64°C
4	GATAGGTTAGCACCATGCTTTG	TCTCCCAGACAATCCACCTC	60°C
5	TGACTGTCTTTCAACATAATCCTG	TGGTTTTGTGCTTTCATTGC	60°C
6	GCCAATTAATACTGGAAATCAACC	TAAGCCCACTGGAAAAGGG	60°C
7	CCTCAACAGGCATAGATTTCC	CTTGCAGCTGTTACAAACACG	60°C
8	GGAGTGAAGTGAATGTTGCTG	GAATTGCAGTCCTTCCCCTC	60°C
9	AGTATGCCACATCCCAAGTG	GACAGAGCCTAAACATCCCC	60°C
10-11	TGGTAGAGATCCCATCCTGC	GCCACTGGAGTTCCTTAAAGTC	64°C
12-13	TCCTTCAATTCCACCACCAG	AAGCAGTTTATAATCTAGCATTGCC	64°C
14	ATTAATGGCCATGCCACCC	ATTGCAAACCCTTATGACCC	56°C
15	AGTGCCCTTCTACATGTCCC	GAAGTGGTCTGCATCATTGC	60°C
16	ACACCAGGGAAGTGATCTGC	CTGCTTTTGGTTACCACACTTC	60°C
17	TGTGAACATCATTCAAGGCG	AAATGTGTGATATCCCTAGACAGG	64°C
18-19	CTCCACATTTCAAGCAACAGC	GAAAACCCTCAACATCTGGG	60°C
20	TACTGAAGTTGCTGGATGCC	GAGGACACACCTGGAAGTGG	60°C
21	TTGTTGCTATGTTGTTGTAGG	GAAAATAACCATCATGGAAGCC	60°C

O produto de PCR foi submetido à eletroforese em gel de agarose 1% para confirmar a amplificação específica de cada exon. Após a confirmação da amplificação e da integridade do material, 5uL do produto de PCR foram submetidos a purificação com 2uL da enzima ExoSAP (GE Healthcare), sendo levados às temperaturas de 37°C por 15 minutos e 80°C por 15 minutos. A reação de sequenciamento foi feita nas seguintes condições: 3uL do produto de PCR purificado, 1uL do iniciador sense e 2uL H₂O, adicionando-se após 4uL da solução de mistura contendo 1uL de Big Dye (Life Technologies) para cada 3uL de tampão

de sequenciamento. A reação foi adicionada a uma placa de 96 poços e levada ao termociclador nas seguintes condições: 1 ciclo: 96°C por 1 minuto; 35 ciclos: 96°C por 10 segundos, temperatura de anelamento por 5 segundos, 60°C por 4 minutos; 1 ciclo: 8°C por 5 minutos. A placa foi subsequentemente submetida a reação de precipitação com isopropanol 75% e etanol 70%. Após secagem da placa, a mesma foi levada ao sequenciador Mega Bace 1000 DNA analysis system nos laboratórios Sincroton (Campinas, Brasil) e Helixxa (Campinas, Brasil), sendo gerados os cromatogramas correspondentes. As análises dos cromatogramas foram realizadas através do programa computacional Finch TV (Geospiza Inc., Washington, EUA). A avaliação das sequências obtidas e a pesquisa de mutações e polimorfismos já descritos foram realizados através das páginas eletrônicas: <https://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgGateway> e <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp>.

Com a finalidade de verificar potenciais mutações associadas nas regiões mais comumente mutadas (*hotspots*) de genes envolvidos no controle epigenético, os genes *SF3B1* (éxons 13-16), *TET2* (éxons 3-11), *DNMT3A* (éxons 18-23) e *ASXL1* (éxon 12) foram sequenciados por nossos colaboradores do laboratório do Dr. Ramon V. Tiu, Departamento de Medicina Translacional e Pesquisa em Oncologia, Taussig Cancer Institute, Cleveland Clinic, Cleveland, OH, EUA. O sequenciamento destes genes foi realizado através da técnica de Sanger, conforme descrito previamente (105).

3.11. Pesquisa de mutações em *JAK2* e *CALR* e quantificação do alelo mutante de *JAK2*^{V617F}

A identificação da mutação *JAK2*^{V617F} é realizada na rotina de nosso serviço para os pacientes com PV, TE e MFP utilizando análise de polimorfismos através de restrição de fragmentos de PCR (RFLP) ou através de PCR alelo específico com iniciadores marcados com fluorescência. Para a análise RFLP, os produtos de PCR de *JAK2* são digeridos com BsaXI (New England Biolabs, Hitchin, Reino Unido), de acordo com o protocolo do

fabricante, e visualizados em gel de agarose 2,5%. O genótipo normal de JAK2 é representado por um fragmento de 460pb; o genótipo heterozigoto por fragmentos de 460pb, 24pb e 189pb; e o homozigoto por fragmentos de 241pb e 189pb. Neste estudo, a presença da mutação JAK2^{V617F} foi avaliada, portanto, com base nos resultados já disponíveis em prontuário.

Das 35 amostras negativas para JAK2^{V617F}, 31 foram submetidas à pesquisa de mutações no éxon 12 de *JAK2*, através de sequenciamento gênico. O fato de estas mutações não terem sido investigadas em todos os pacientes deveu-se à indisponibilidade de amostras de DNA ou da qualidade inadequada das mesmas na ocasião da realização dos experimentos. Para a avaliação das mutações no éxon 12 de *JAK2*, foi realizada PCR após obtenção de DNA genômico. A PCR foi realizada em uma reação com volume de 25µL (25ng de DNA genômico, 3,0µL do tampão de reação 10X, 1,5µL de MgCl₂ 50mM, 1µL de dNTP (10mM), 0,3µL (5U/ µL) de Taq polimerase e 0,5 µL de cada iniciador a 10nM). Os iniciadores utilizados foram desenhados como previamente descrito (10): sense 5' CTCCTCTTTGGAGCAATTCA 3' e antissense 5' ATAGCGTTGAGGGTTCAAGAG 3'. As condições da reação foram: 5 minutos de desnaturação a 96°C, seguidos por 35 ciclos de 1 minuto a 96°C, 30 segundos a 55°C e 1 minuto a 72°C, com uma etapa final de 72°C por 5 minutos. O produto de PCR foi submetido a eletroforese em gel de agarose. Após a confirmação da amplificação e da integridade do material, foi realizado sequenciamento no Sequenciador MegaBACE 1000 DNA analysis system, na reação que utilizou um volume final de 10µL, contendo 1,0µL de solução tampão, 1,0µL de Big Dye Terminator (Life Technologies), 1,0µL de iniciador sense ou antissense (10nM), 2,0µL de produto de PCR e 5,0µL de água. As substituições de base única identificadas foram comparadas com bancos de dados do cDNA (Ensembl) e COSMIC através do programa Blast disponível em <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>. Em seguida, a reação foi precipitada para posterior aplicação no sequenciador.

Das 64 amostras positivas para a mutação $JAK2^{V617F}$, 55 foram submetidas à quantificação do alelo mutante ($JAK2^{V617F}$) em relação ao selvagem em uma amostra de interesse. Para esta avaliação, foi utilizado o Competitive Allele-Specific TaqMan® PCR kit (Life Technologies), conforme instruções do fabricante. As análises foram realizadas no programa SDS Software v1.x and v2.x (Life Technologies). Neste experimento de detecção de mutação, uma amostra de estado mutacional desconhecido é submetida à realização de PCRq com um ensaio que tem por alvo o alelo mutante de um gene (neste caso, $JAK2^{V617F}$) e o gene referência correspondente ($JAK2$). Após a amplificação, os valores de CT são determinados e a diferença entre os valores de CT do alelo mutante e do gene referência são calculados. Este valor de ΔCT é utilizado para o cálculo da porcentagem do alelo mutado na amostra.

As mutações somáticas no gene da *CALR* de tipo-1 (L367fs*46, deleção de 52pb) e tipo-2 (K385fs*47, inserção de 5pb) foram analisadas em 97 dos 99 pacientes de nossa coorte. A metodologia para investigação das mutações de *CALR* foi padronizada para fins da caracterização da coorte de pacientes incluída neste estudo, e foi realizada conforme descrito a seguir. Após a hemólise e a extração de DNA pela técnica de fenol/clorofórmio, as mutações no éxon 9 da *CALR* foram avaliadas através de PCR, seguida por confirmação da amplificação através de corrida em eletroforese em gel de agarose e sequenciamento por análise de fragmentos. O iniciador sense foi marcado com a sonda fluorescente 6-FAM para a análise de fragmentos. As sequências dos iniciadores foram: sense 5' TAACAAAGGTGAGGCCTGGT 3'; antissense 5' GCCTCTCTACAGCTCGTCCTT 3'. A PCR foi realizada em uma reação com volume de 30µL (50ng de DNA genômico, 3,0µL do tampão de reação 10X, 1,5µL de $MgCl_2$ 50mM, 1µL de dNTP (10mM), 1,5µL de DMSO, 0,3µL de Taq DNA polimerase (5U/µL), 0,3µL de cada iniciador a 10µM (sense e antissense) e 20,1µL de H_2O). As condições utilizadas no termociclador foram: 1 ciclo: 94°C por 10 minutos; 35 ciclos: 94°C por 30 segundos, 55°C por 30 segundos, 72°C por 30 segundos; 1

ciclo: 72°C por 10 minutos. Após a amplificação, os produtos foram aplicados em gel de agarose 4% e analisados. Alelos selvagens apresentam bandas com 297pb, sendo possível identificar o genótipo com mutação *indel*, ou seja, com deleção ou inserção, pelo aparecimento de bandas de 245pb para a mutação do tipo 1 e 302pb para a mutação do tipo 2.

A confirmação das mutações em *CALR* foi realizada através da análise de fragmentos. Para tal, o produto da PCR foi diluído em água ultrapura em uma relação 1:15 para a preparação da reação, composta por 1µL do produto diluído; 8,7µL de formamida e 0,3µL de 500 LIZ. O material foi submetido à análise de tamanho de fragmento no aparelho ABI 3500 XL Genetic Analyzer (Life Technologies) e os resultados foram analisados através do Software do próprio sequenciador.

3.12. Extração proteica, imunoprecipitação e western blot

Para a extração proteica, 5×10^6 a 1×10^7 células foram submetidas a centrifugação por 5 minutos a 0,2g. Ao precipitado celular, foi acrescentado tampão de extração de proteínas contendo 100mM Tris (pH 7,6), 1% Triton X-100, 150mM NaCl, 35mg PMSF/mL, 10mM Na_3VO_4 , 100mM NaF, 10mM $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$, e 4mM EDTA. As amostras foram homogeneizadas até que se tornassem bastante fluidas. Após 40 minutos a 4°C, foram centrifugadas a 13,4g, 4°C, durante 20 minutos, para remoção dos restos celulares. Ao produto do extrato total proteico, adicionou-se tampão de *Laemmli* contendo 100mmol/L de ditioneitol e aqueceu-se em banho seco a 94°C por 5 minutos. Após isso, as amostras foram submetidas à eletroforese ou armazenadas a -80°C.

Para realização de imunoprecipitado, adicionou-se ao extrato proteico o anticorpo de interesse e proteína A-Sepharose 6MB (para anticorpos produzidos em coelho) ou proteína G-Sepharose 4MB (para anticorpos produzidos em cabra). Após o término da incubação e

da lavagem, os precipitados foram ressuspensos em 25µL tampão de *Laemmli* contendo 100mmol/L de ditiotreitol e aquecidas em banho seco a 94°C por 5 minutos. Em seguida, os extratos proteicos ou as proteínas imunoprecipitadas foram submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida 6,5-15%-SDS-PAGE em aparelho de eletroforese (Mini-Protean, Bio-Rad Laboratories, Richmond, CA, EUA). A eletrotransferência das proteínas do gel para a membrana foi realizada em 90 minutos a 100V em aparelho de transferência (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 magro, 10mmol/L Tris, 150mmol/L NaCl, e 0,02% Tween-20), a temperatura ambiente. A membrana de nitrocelulose foi incubada com anticorpos específicos diluídos em tampão de incubação (3% leite em pó magro, 10mmol/L Tris, 150mmol/L NaCl, e 0,02% Tween-20) por 12 horas a 4°C e lavada 3 vezes com solução basal (10mmol/L Tris, 150mmol/L NaCl e 0,02% Tween-20). Os anticorpos primários utilizados estão descritos na **Tabela 3**.

Tabela 3. Anticorpos utilizados nos experimentos de western blot e/ou imunoprecipitação.

Anticorpo	Referência	Concentração utilizada	Fabricante
IRS2	sc-1555	1:250	Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA)
Fosfotirosina (pTyr)	sc-508	1: 1000	
JAK2	sc-294	1: 1000	
STAT3	sc-7179	1: 1000	
STAT5	sc-835	1: 1000	
Actina	sc-1616	1: 2000	
P70S6K	sc-8418	1: 1000	
pP70S6K	sc-7984	1: 1000	
Akt1/2/3	sc-8312	1: 2000	
pJAK2	3774S	1: 1000	Cell Signaling Technology (Danvers, MA, USA)
pSTAT3	9131S	1: 1000	
pSTAT5	9359S	1: 1000	
Caspase 3 total/clivada	9665S	1: 1000	
pERK1/2	44654G	1: 1000	Life Technologies (Carlsbad, CA, EUA)
ERK1/2	700012	1:2000	

As membranas de nitrocelulose foram então incubadas por 1 hora com o anticorpo secundário conjugado a HRP (*Horseradish peroxidase*), lavadas novamente por três vezes e submetidas ao substrato da enzima, ECL Western Blot Analysis System (Amersham Pharmacia Biotech, Reino Unido), resultando em um produto luminescente detectado por autorradiografias em filmes Kodak XAR (Eastman Kodak, Rochester, NY, EUA) ou pelo aparelho foto-documentador UVIttec Cambridge (UVIttec Limited, Cambridge, Reino Unido). A intensidade de expressão proteica foi normalizada pela expressão da actina e a intensidade da fosforilação proteica foi normalizada pela expressão da proteína correspondente. Quando necessário, as membranas de nitrocelulose foram submetidas à retirada dos anticorpos através de incubação com solução de *stripping* por 20 minutos, seguida de três lavagens com solução basal, bloqueio e incubação com novos anticorpos, conforme descrito acima.

3.13. Microscopia confocal

As linhagens HEL, U937 e NB4 foram cultivadas sobre lamínulas de vidro previamente tratadas com poli-L-lisina (1 mg/mL), lavadas com PBS e fixadas com uma solução de paraformaldeído 4%. Em seguida, foram realizados o bloqueio e a permeabilização das células com uma solução 3% BSA e 0,5% Triton. Os anticorpos primários anti-IRS2 (produzido em cabra, sc-1555, Santa Cruz Biotechnology) e anti-JAK2 (produzido em coelho, sc-294, Santa Cruz Biotechnology) foram utilizados na diluição 1:200 em solução 3% BSA e incubados com as células em câmara úmida a 4°C durante 18 horas. Após 3 lavagens com PBS, foram incubados os anticorpos secundários marcados com anti-cabra Alexa 633 (produzido em asno) e anti-coelho Alexa 488 (produzido em frango) (Life Technologies) por 2 horas a temperatura ambiente. Anticorpos primários e secundários de espécies diferentes foram escolhidos para evitar ligações cruzadas entre eles, uma vez que

quatro anticorpos diferentes foram utilizados em uma mesma reação. As lamínulas foram novamente lavadas com PBS e montadas utilizando-se o meio de montagem para fluorescência (ProLong® Gold com DAPI, da Life technologies). As lâminas foram analisadas por escaneamento em microscópio Zeiss LSM 780-NLO confocal montado sobre um microscópio Axio Observer Z.1 (Carl Zeiss AG, Jena, Alemanha), utilizando-se a objetiva de 40x de imersão em óleo. Em todos os experimentos foram feitos controles negativos somente com anticorpos secundários, não sendo observada fluorescência. A ferramenta “*colocalization finder*” do programa *ImageJ quantification* (U.S. National Institutes of Health, Bethesda, MD, EUA) foi utilizada para a análise de colocalização entre IRS2 e JAK2.

3.14. Transdução de lentivírus

As linhagens leucêmicas HEL (JAK2^{V617F}) e U937 (JAK2^{WT}) foram transduzidas com lentivírus contendo *short hairpin* RNA controle não específico (sc-108080; Santa Cruz Biotechnology), aqui denominadas células "shControle", ou shRNA tendo por alvo IRS2 (sc-29378V; Santa Cruz Biotechnology), definidas aqui por células "shIRS2", constituída de um conjunto de quatro sequências diferentes específicas para o gene *IRS2*. Resumidamente, $2,5 \times 10^5$ células foram transduzidas com lentivírus pela técnica de inoculação através da centrifugação, que consiste em centrifugar as células por 30 minutos a 800g na presença de 3µg/mL de polibrene (Sigma). O MOI (*multiplicity of infection*; número de partículas lentivirais por célula) utilizado foi de 4. Após a transdução, as células foram selecionadas com 0,75µg/mL de puomicina para a linhagem HEL e 1,0µg/mL de puomicina para a linhagem U937. A inibição gênica foi testada por PCRq e western blot no 21º dia dos experimentos. Células silenciadas para IRS2 e células-controle foram submetidas aos experimentos funcionais.

3.15. Ensaio de Methylthiazoletetrazolium (MTT)

A viabilidade celular foi mensurada através do ensaio de Methylthiazoletetrazolium (MTT; Sigma). Para os experimentos com linhagens celulares HEL e U937, $2,5 \times 10^4$ células por poço foram semeadas em uma placa de 96 poços em 100µL de meio RPMI contendo 10% SFB. Foram utilizadas células shControle ou shIRS2 tratadas com DMSO apenas ou com ruxolitinibe nas doses de 100 ou 300nM, por 48 horas. Em resumo, 10µL de uma solução a 5mg/mL de MTT foram adicionados aos poços e incubados a 37°C por 4 horas. A reação foi interrompida pela adição de 100µL de 0,1N HCl em isopropanol. A viabilidade celular foi avaliada pela mensuração da absorbância a 570nm, utilizando-se um leitor automático de placas. Todas as condições foram testadas em oito replicatas, de um total de duas inibições diferentes.

Para os experimentos com células primárias das pacientes com mastocitose sistêmica, $2,5 \times 10^4$ células mononucleares obtidas através de aspirado de medula óssea foram incubadas em placas de 96 poços com Alpha MEM suplementado com 5ng/mL IL-3, 20ng/ml SCF e diferentes inibidores de tirosinoquinase: mesilato de imatinibe (5µM), dasatinibe (80nM) ou PKC412 (100nM) diluídos em DMSO, ou apenas com DMSO (controle), por 4, 8 ou 12 dias. A avaliação da viabilidade celular foi realizada por MTT, conforme descrito acima, em um total de seis replicatas.

3.16. Ensaio de formação de colônias

Para avaliação do crescimento clonal em linhagens celulares HEL e U937, foi utilizado o ensaio de formação de colônias. A formação de colônias foi realizada em meio semissólido de metilcelulose ($1,0 \times 10^3$ células/mL; MethoCult 4230; StemCell Technologies Inc., Vancouver, Canadá). Foram utilizadas células shControle ou shIRS2 tratadas com

DMSO apenas ou com ruxolitinibe nas doses de 100 ou 300nM. As colônias foram detectadas após 8 dias de cultura pela adição de 1mg/mL de reagente MTT, e as contagens foram realizadas com o auxílio do programa *ImageJ quantification* (U.S. National Institutes of Health). Todas as condições foram testadas em dez duplicatas, de um total de duas inibições diferentes.

3.17. Avaliação da apoptose

Para estimativa das taxas de apoptose, células das linhagens HEL e U937 transduzidas com lentivírus shIRS2 ou shControle foram submetidas ao tratamento com veículo (DMSO) ou ruxolitinibe (100 ou 300nM) e avaliadas por: (a) atividade de caspase-3 e marcação com Anexina V/PI por citometria de fluxo, (b) geração de caspase-3 clivada por western blot, conforme descrito anteriormente. A avaliação da apoptose foi feita em quatro replicatas, resultantes de duas inibições distintas.

Para avaliação da apoptose de células primárias de pacientes com mastocitose sistêmica, $12,5 \times 10^4$ células mononucleares de medula óssea foram incubadas em placas de 24 poços com Alpha MEM suplementado com 5ng/mL IL-3 e 20ng/ml SCF, e tratadas com veículo (DMSO) ou com diferentes inibidores de tirosinoquinase (mesilato de imatinibe (5 μ M), dasatinibe (80nM) ou PKC412 (100nM) diluídos em DMSO) por 4, 8 ou 12 dias. A avaliação da apoptose foi feita em triplicata por citometria de fluxo com marcação para Anexina V/PI.

Caspase-3. A atividade de caspase 3 foi avaliada através de citometria de fluxo utilizando-se o *Caspase-3 Detection Kit* (FITC-DEVD-FMK), conforme instruções do fabricante (Calbiochem, Germany).

Anexina V/PI. Para análise por citometria de fluxo com marcação para Anexina-V/Iodeto de propídio (Anexina V/PI), 1×10^5 células foram lavadas duas vezes com PBS

gelado e ressuspendidas em tampão de ligação contendo 1µg/mL de PI e 1µg/mL de FITC ou APC anexina-V (Becton–Dickinson, CA, EUA). Após incubação no escuro por 15 minutos à temperatura ambiente, todas as amostras foram analisadas em um FACSCalibur (Becton–Dickinson). Dez mil eventos foram adquiridos para cada amostra.

3.18. Análises estatísticas

As análises estatísticas foram realizadas utilizando GraphPad InStat 5 (GraphPad Software, Inc., CA, EUA). O teste de *Shapiro-Wilk* foi utilizado como teste de normalidade, e os testes t de *Student*, *Anova*, *Mann-Whitney* ou *Wilcoxon* foram realizados para fatores mensuráveis, conforme apropriado. Um valor de $p < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo.

4. Resultados Subprojeto 1 - IRS2 em neoplasias mieloproliferativas crônicas

4.1. IRS2 é constitutivamente associada a JAK2 em células HEL JAK2^{V617F}, mas não em linhagens U937 e NB4 JAK2^{WT}

As linhagens celulares HEL, U937 e NB4 foram submetidas a imunoprecipitação e imunoblotting com os anticorpos anti-IRS2 e anti-JAK2 para investigação de uma possível associação entre estas proteínas. A imunoprecipitação com IgG foi utilizada como controle negativo do experimento, garantindo a especificidade das bandas encontradas. Na linhagem HEL JAK2^{V617F}, foi observada associação constitutiva (independente de ligante) entre JAK2 e IRS2. Nas linhagens U937 e NB4, que possuem JAK2 selvagem, não foi encontrada associação entre as proteínas (**Figura 6**).

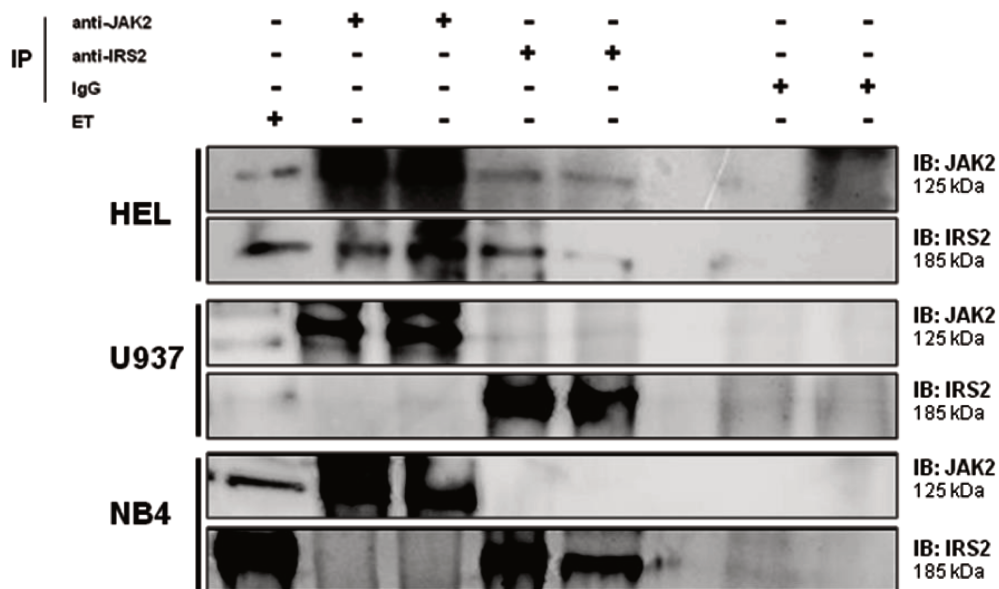


Figura 6. IRS2 associa-se a JAK2 em células HEL JAK2^{V617F}. Imunoprecipitação (IP) e imunoblotting (IB) com anticorpos anti- IRS2 e anti- JAK2, evidenciando associação constitutiva entre IRS2 e JAK2 em linhagem HEL, portadora da mutação JAK2^{V617F}, mas não em células U937 e NB4, com JAK2 selvagem. O anticorpo anti- IgG foi utilizado como controle negativo da imunoprecipitação; extratos totais (ET) das linhagens foram utilizados como controles positivos do imunoblotting.

As linhagens HEL, U937 e NB4 foram submetidas ao ensaio de colocalização por microscopia confocal (**Figuras 7 A-B**).

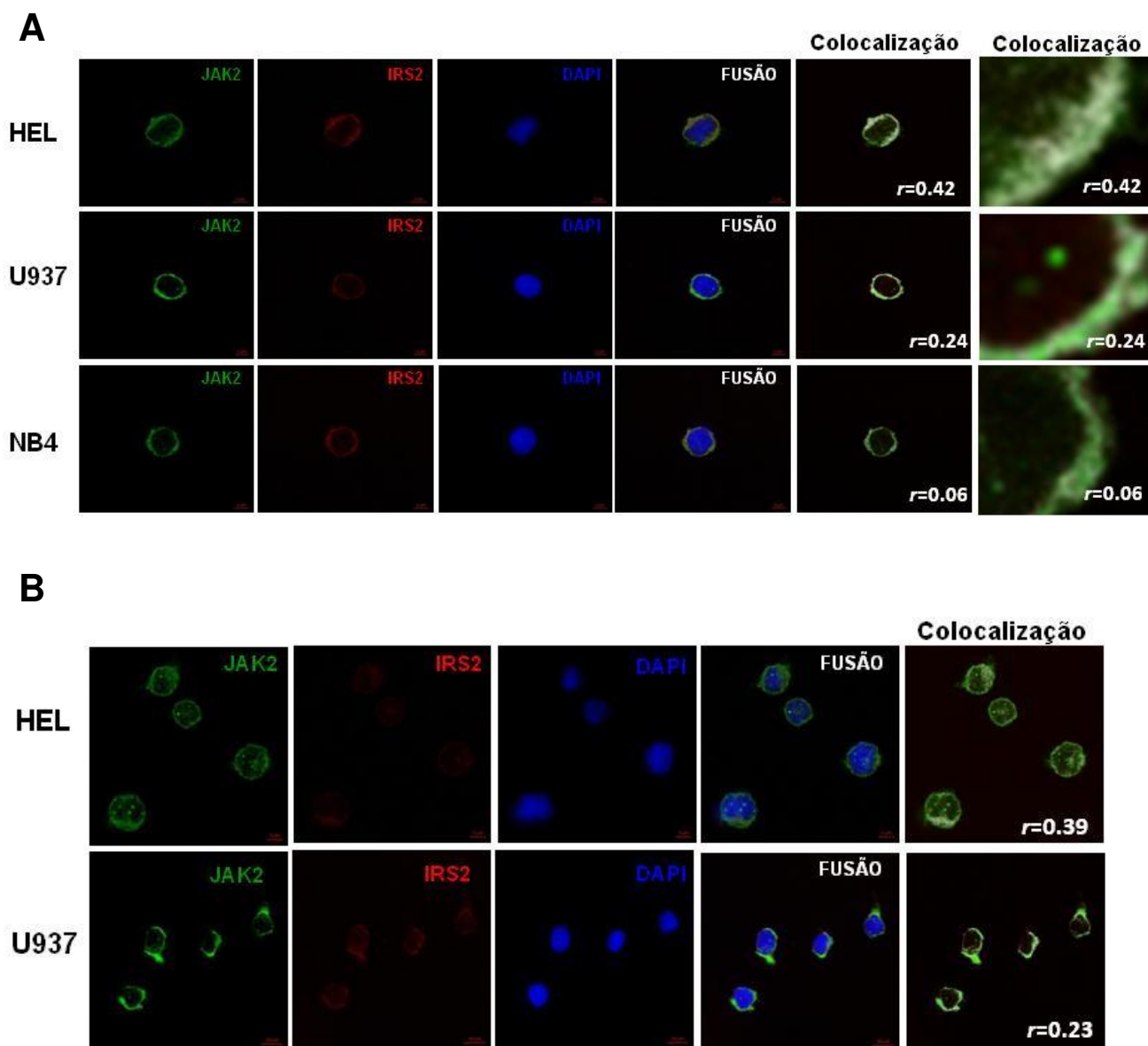


Figura 7. Colocalização entre JAK2 e IRS2 em células HEL. Análise por microscopia confocal das linhagens HEL, U937 e NB4 em detalhe (**A**), e de focos de células HEL e U937 (**B**), com marcação para JAK2 (verde), IRS2 (vermelho) e DAPI (núcleo, em azul); o campo "fusão" representa as imagens fundidas. A análise de colocalização foi realizada com a ferramenta "*colocalization finder*" do programa computacional *Image J* (NIH), e mostra as imagens de JAK2 e IRS2 fundidas, com os pontos de colocalização representados em branco. Os coeficientes de correlação (r) são indicados na figura.

Corroborando os achados de interação proteica observados através da imunoprecipitação, foi observada maior colocalização entre JAK2/IRS2 em células HEL em relação às células U937 e NB4.

4.2. Avaliação dos efeitos do tratamento com ruxolitinibe sobre IRS2 e sobre as vias JAK/STAT, PI3K/AKT/mTOR e MAPK em células HEL, U937 e NB4

Com a finalidade de avaliarmos o estado basal de IRS2 e das principais vias de sinalização celular ativadas via JAK2, bem como os efeitos do tratamento com ruxolitinibe sobre estas proteínas, células HEL (JAK2^{V617F}), U937 e NB4 (JAK2^{WT}) foram submetidas a tratamento com ruxolitinibe em diferentes doses (0, 3, 10, 30, 100, 300, 1000nM) por 6 horas e submetidas a imunoblotting com anticorpos que reconhecem a forma fosforilada (ativa) e a quantidade total das seguintes proteínas: fosfotirosina (PY)/IRS2, pJAK2/JAK2, pSTAT3/STAT3, pSTAT5/STAT5, pERK/ERK, pAKT/AKT, pP70S6K/P70S6K. A fosfotirosina total (correspondente ao peso molecular de 185kDa) foi utilizada como estimativa da fosforilação em tirosina de IRS2, uma vez que não dispúnhamos de anticorpo específico para avaliar a fosforilação de IRS2 em tirosina. Os resultados observados nas linhagens HEL, U937 e NB4 são indicados na **Figura 8 A-C**.

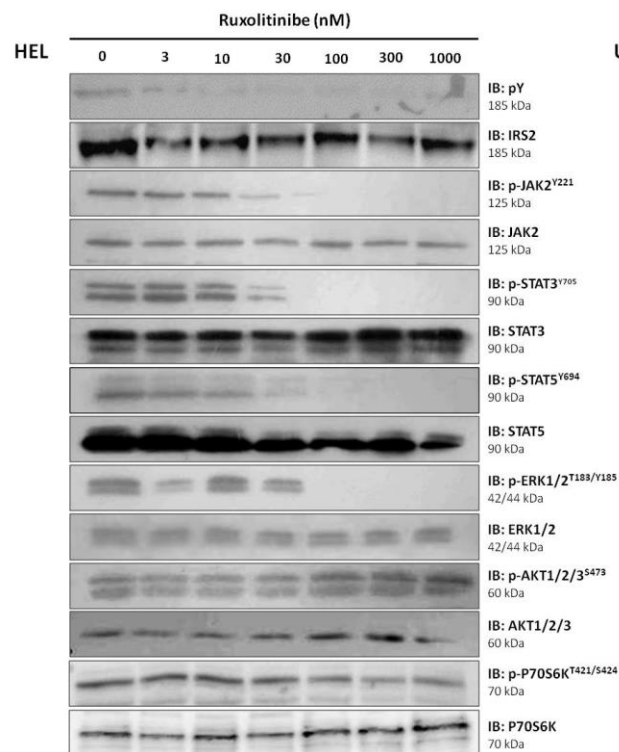
Em células HEL, houve redução progressiva da fosforilação de IRS2 com as doses crescentes de ruxolitinibe, sendo obtida inibição máxima a partir da dose de 300nM. O tratamento com ruxolitinibe reduziu a fosforilação de IRS2, JAK2, STAT3, STAT5 e ERK de forma dose-dependente. A fosforilação de P70S6K foi discretamente reduzida, provavelmente como consequência da redução de pERK, já que não houve mudanças na ativação de AKT, sua outra proteína ativadora, após o tratamento com ruxolitinibe. A ausência de modulação de AKT com ruxolitinibe sob as mesmas condições já havia sido descrita anteriormente nos estudos pré-clínicos da droga (103). Nas células U937, foram

obtidos resultados semelhantes, exceto pelo fato de que STAT3 não é constitutivamente fosforilada nestas células; uma amostra controle de células HEL foi incluída no experimento de forma a confirmar o bom funcionamento do anticorpo anti-pSTAT3. Na linhagem NB4, não foi observada fosforilação constitutiva de JAK2 e não houve modulação da fosforilação das proteínas estudadas após o tratamento com ruxolitinibe.

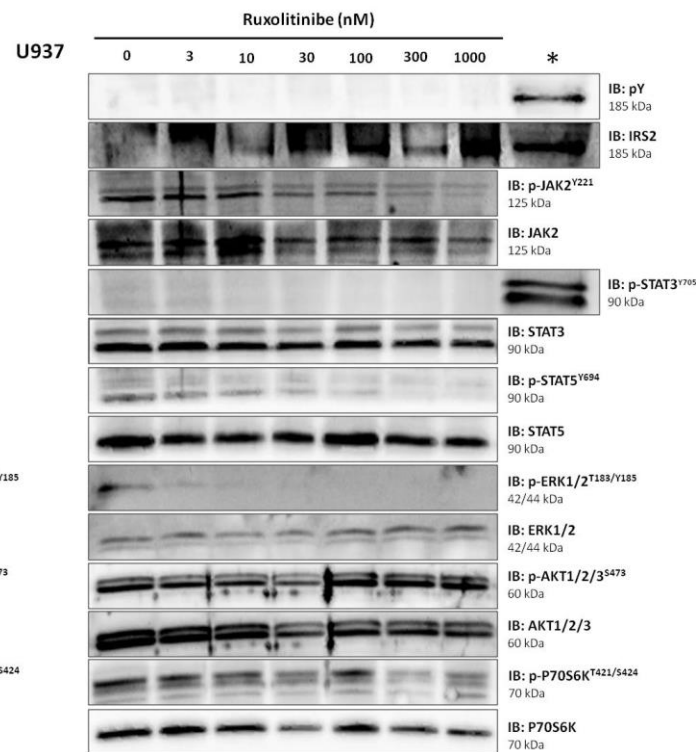
Dado interessante foi o fato de que a linhagem U937 não apresentou fosforilação constitutiva de IRS2. Uma amostra da linhagem HEL sem tratamento foi incluída no experimento como controle do funcionamento eficaz do anticorpo anti-fosfotirosina. O imunoblotting com anticorpo anti-IRS2 foi realizado após *stripping* da membrana de nitrocelulose para confirmação da banda correspondente a IRS2.

Considerando os resultados obtidos e o fato de desejarmos avaliar a participação de IRS2 na via JAK2, optamos por prosseguir nossos experimentos funcionais utilizando como modelos as linhagens HEL, para *JAK2* mutado, e U937, para *JAK2* selvagem, uma vez que a linhagem NB4 apresentou baixa expressão de JAK2, ausência de fosforilação constitutiva desta proteína e ausência de inibição das principais vias estudadas após o tratamento com ruxolitinibe.

A



B



C

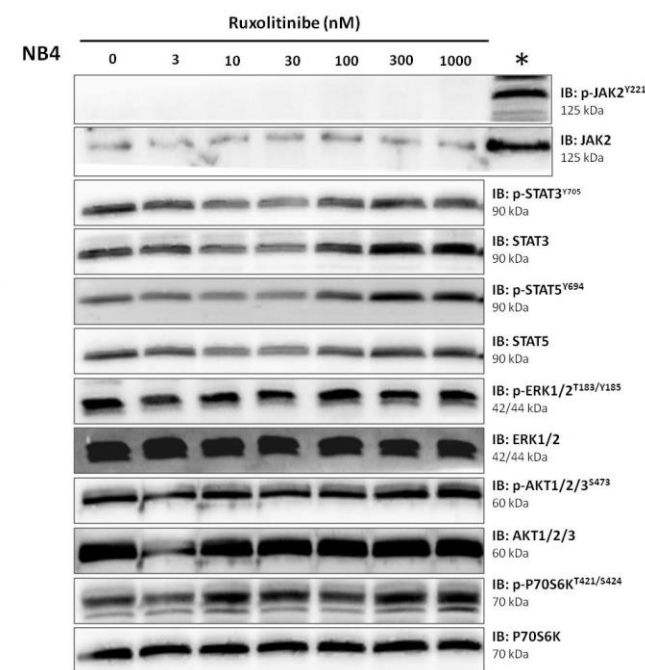


Figura 8. Ruxolitinibe reduz a fosforilação de IRS2 em linhagem HEL. Células das linhagens HEL JAK2^{V617F} (A), U937 (B) e NB4 (C) JAK2^{WT} tratadas com diferentes doses de ruxolitinibe (0, 3, 10, 30, 100, 300, 1000nM) por 6 horas foram submetidas a imunoblotting com anticorpos anti-fosfotirosina (PY), IRS2, pJAK2/JAK2, pSTAT3/STAT3, pSTAT5/STAT5, pERK1/2/ERK, pAKT/AKT, pP70S6K/P70S6K, como indicado na figura. Extrato total de células HEL foi utilizado nas membranas das células U937 e NB4 como controle positivo do bom funcionamento dos anticorpos. As membranas foram blotadas com os respectivos anticorpos para detecção da proteína total ou de sua forma fosforilada e reveladas com o *ECL Western Blot Analysis System*.

4.3. O silenciamento de IRS2 reduz a ativação de STAT5 em células HEL

Para investigarmos o papel de IRS2 na sinalização celular em células *JAK2* mutadas (HEL) ou não (U937), as células foram silenciadas para IRS2 através de inibição por lentivírus codificando shRNA com sequências específicas para *IRS2* (shIRS2) ou com sequências-controle (shControle). A confirmação do silenciamento deu-se através de PCRq e western blot, como mostrado na **Figuras 9 A-B**. Considerando como calibradora a amostra shControle, observamos inibição gênica de *IRS2* de cerca de 80% nas células shIRS2 para ambas linhagens, que culminou com inibição proteica evidente, como observado pela menor expressão de IRS2 nas células shIRS2.

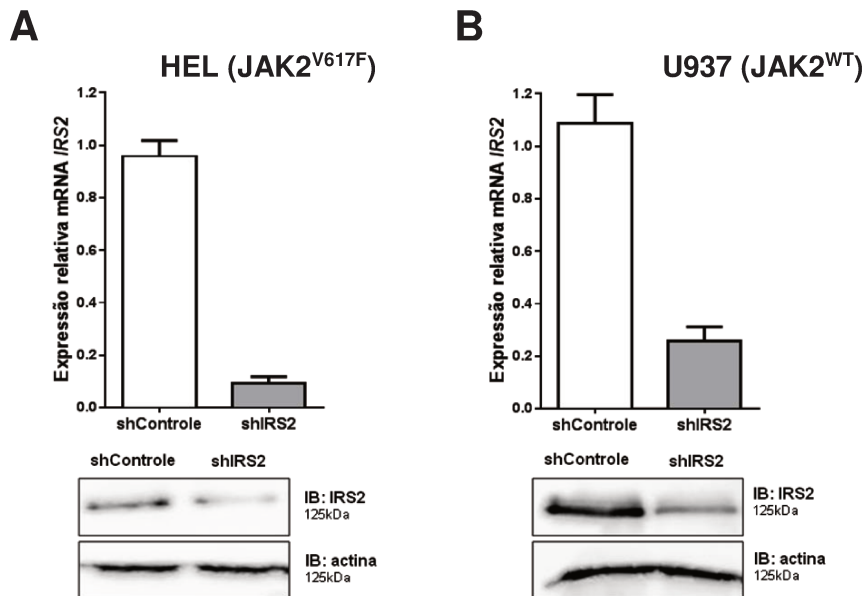


Figura 9. Inibição de IRS2 em células HEL e U937. Células HEL (**A**) e U937 (**B**) foram transduzidas com shRNA controle (shControle) ou IRS2 (shIRS2) entregue por lentivírus. A expressão do mRNA de *IRS2* (painéis superiores), avaliada por PCRq em tempo real, foi significativamente reduzida nas células shIRS2 em relação ao controle (redução de ~90% para a linhagem HEL e ~75% para a linhagem U937). Para avaliação da inibição proteica de IRS2 nas linhagens avaliadas, foi realizado imunoblotting (IB) com anticorpos anti- IRS2, com normalização pela expressão de actina, conforme indicado nas figuras (painéis inferiores).

De forma a determinarmos os efeitos do silenciamento de IRS2 nas vias JAK/STAT, PI3K/AKT/mTOR e MAPK, as células shIRS2 e shControle foram tratadas por 48 horas com ruxolitinibe em diferentes doses (100 ou 300nM) ou com DMSO apenas (controle) e submetidas a imunoblotting com os anticorpos específicos (**Figuras 10 A-B**).

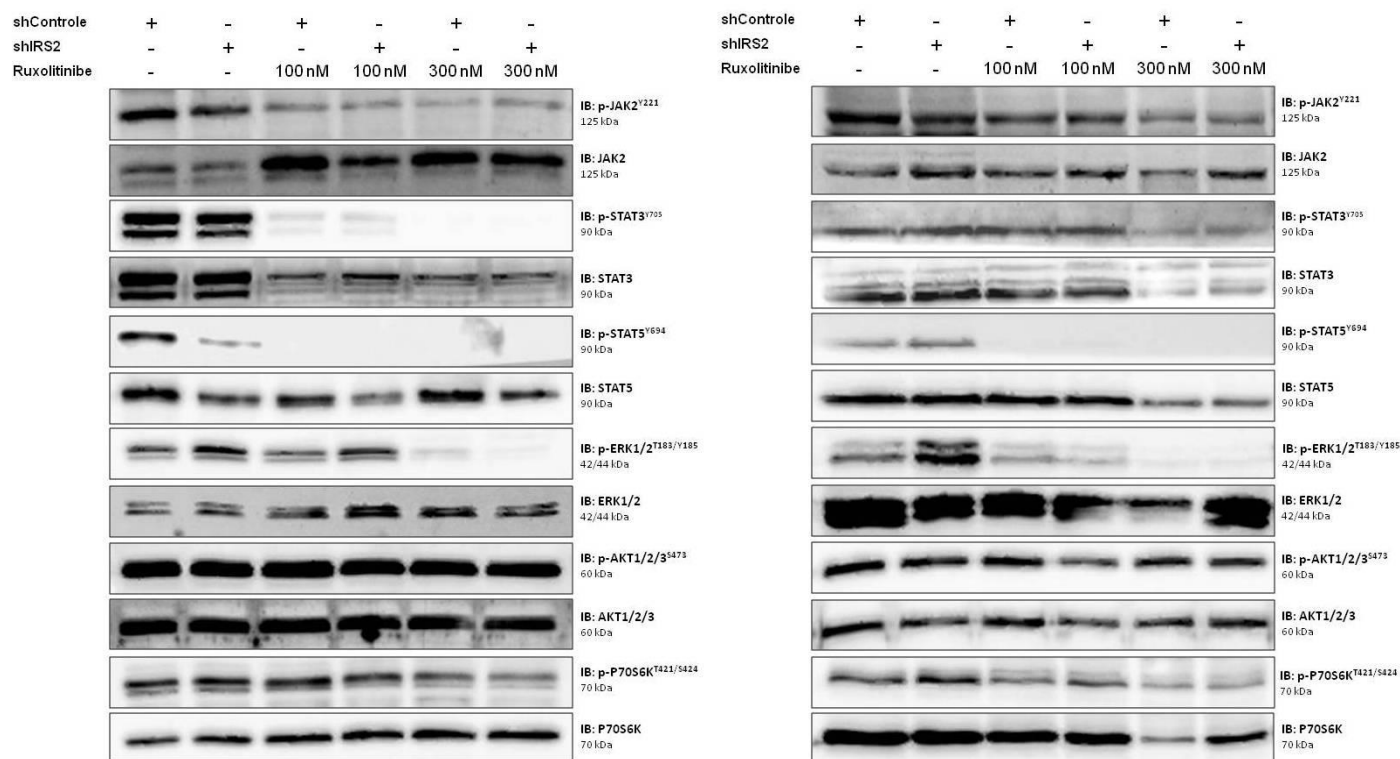


Figura 10. O silenciamento de IRS2 modula pSTAT5 em células HEL (JAK2^{V617F}), mas não em U937 (JAK2^{WT}). Extratos totais de células HEL (**A**) e U937 (**B**) controle (shControle) ou inibidas para IRS2 (shIRS2) foram tratadas com ruxolitinibe (100 ou 300nM) ou com veículo apenas (DMSO) por 48 horas e submetidas a imunoblotting (IB) para as proteínas JAK2, STAT3, STAT5, ERK, AKT e P70S6K em suas formas totais e fosforiladas, conforme indicado nas figuras. A revelação foi realizada com o *ECL Western Blot Analysis System*. As células HEL shIRS2 apresentaram redução da fosforilação de STAT5 e aumento de pERK, enquanto que a inibição de IRS2 nas células U937 levou apenas a aumento de pERK.

A inibição de IRS2 foi capaz de induzir uma diminuição da fosforilação de STAT5 e um aumento de pERK em células HEL (JAK2^{V617F}). Nestas células, o tratamento com

ruxolitinibe reduziu a sinalização via JAK/STAT (redução de pJAK2, pSTAT3 e pSTAT5) e MAPK (redução de pERK e pP70S6K), porém, não alterou a fosforilação de AKT. O efeito individual do silenciamento de IRS2 sobre pSTAT5 e pERK não foi observado nas células tratadas com ruxolitinibe 300nM, já que o último é, por si só, um potente inibidor de STAT5 e ERK. Em células U937 (JAK2^{WT}), não houve modulação de pSTAT5 nas células inibidas para IRS2. O aumento de pERK nas células U937 inibidas, entretanto, também foi observado (**Figuras 10 A-B**).

4.4. O silenciamento de IRS2 diminui a viabilidade celular, reduz a clonogenicidade e possui efeitos cumulativos com ruxolitinibe em células HEL

A fim de avaliarmos o impacto do silenciamento de IRS2 sobre a viabilidade celular nos dois modelos celulares estudados, bem como os efeitos da inibição conjunta de IRS2 e de JAK2, células shIRS2 e shControle das linhagens HEL e U937 foram tratadas com ruxolitinibe (100 ou 300nM) ou apenas com DMSO (controle) por 48 horas e submetidas ao ensaio de methythiazoletetrazolium (MTT). Na linhagem HEL (JAK2^{V617F}), a viabilidade celular foi significativamente reduzida nas células silenciadas para IRS2. Além disso, houve efeito cumulativo com o tratamento com ruxolitinibe em ambas as doses testadas (todos $p \leq 0,07$) (**Figuras 11 A, B**). Nas células U937, por sua vez, não foi observada alteração na viabilidade celular das células inibidas para IRS2 e das células tratadas com ruxolitinibe em relação ao controle (**Figuras 11 C, D**).

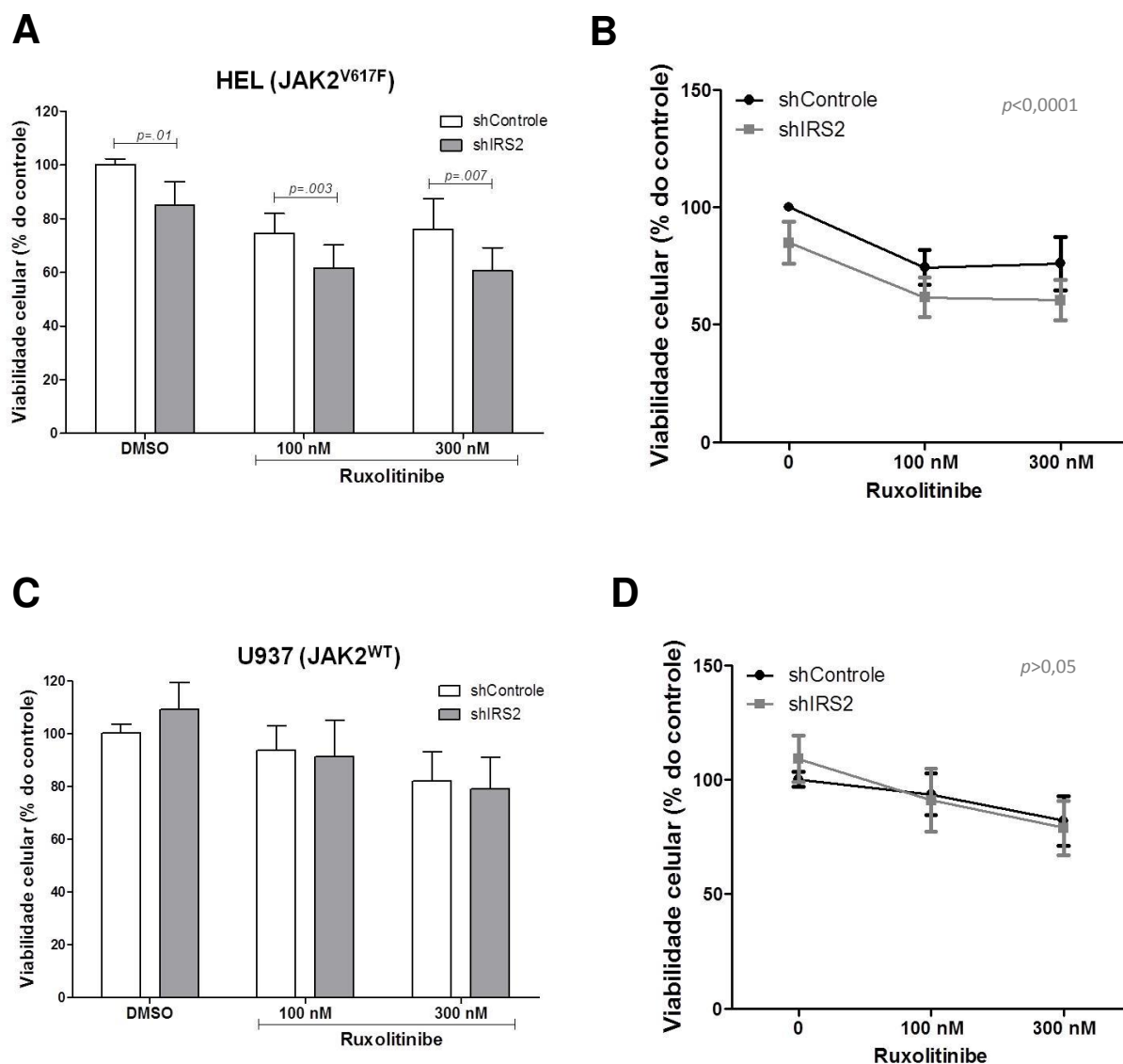


Figura 11. O silenciamento de IRS2 reduz a viabilidade celular e possui efeitos cumulativos com ruxolitinibe em células HEL. A viabilidade celular foi determinada pelo ensaio de methythiazolotetrazolium (MTT) após 48 horas de incubação de células shIRS2 HEL (**A, B**) ou U937 (**C, D**), normalizadas pelo controle correspondente. Os resultados são mostrados como média $\pm$ desvio padrão de oito experimentos diferentes. A comparação entre células shControl e shIRS2 foi realizada através de teste de *Mann-Whitney* (**A, C**). A comparação da curva de resposta de células shControl e shIRS2 foi realizada através de teste de *Anova* (**B, D**).

Para analisarmos o crescimento clonogênico nas linhagens HEL e U937, células shIRS2 e shControl foram tratadas com ruxolitinibe (100 ou 300nM) ou com DMSO (controle) por 8 dias e submetidas ao ensaio de formação de colônias (**Figuras 12 A - F**).

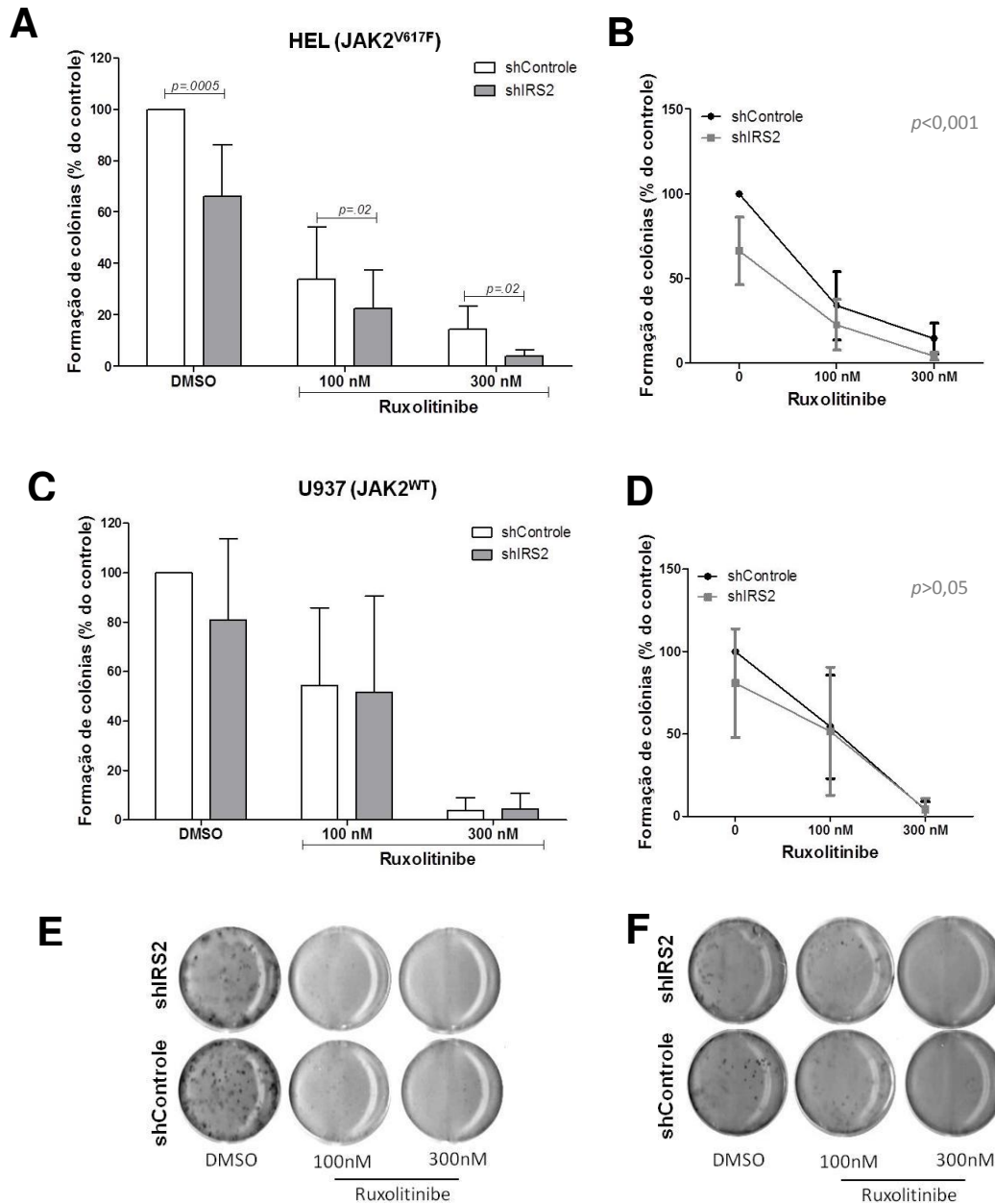


Figura 12. O silenciamento de IRS2 reduz a clonogenicidade e possui efeitos cumulativos com ruxolitinibe em linhagem HEL. O crescimento clonal foi determinado pelo ensaio de formação de colônias. Colônias contendo células viáveis foram detectadas após 8 dias de cultura de células shIRS2 HEL (**A**, **B**, **E**) ou U937 (**C**, **D**, **F**), tratadas com ruxolitinibe (100 ou 300nM) ou com veículo apenas (DMSO), e normalizadas pelo controle correspondente. Os resultados são mostrados como média $\pm$ desvio padrão de dez experimentos diferentes (**A** - **D**). A comparação entre células shControl e shIRS2 foi realizada através de teste *t Student* (**A**, **C**). A comparação da curva de resposta de células shControl e shIRS2 foi realizada através de teste de *Anova* (**B**, **D**). As imagens fotográficas das colônias (painéis inferiores) são ilustrativas de um único experimento em células HEL (**E**) e U937 (**F**).

O silenciamento de IRS2 reduziu significativamente a formação de colônias nas células HEL (JAK2^{V617F}). Além disso, o silenciamento de IRS2 apresentou efeito aditivo ao ruxolitinibe nas doses testadas (100 e 300nM) (todos $p < 0,05$) (**Figuras 12 A, B, E**).

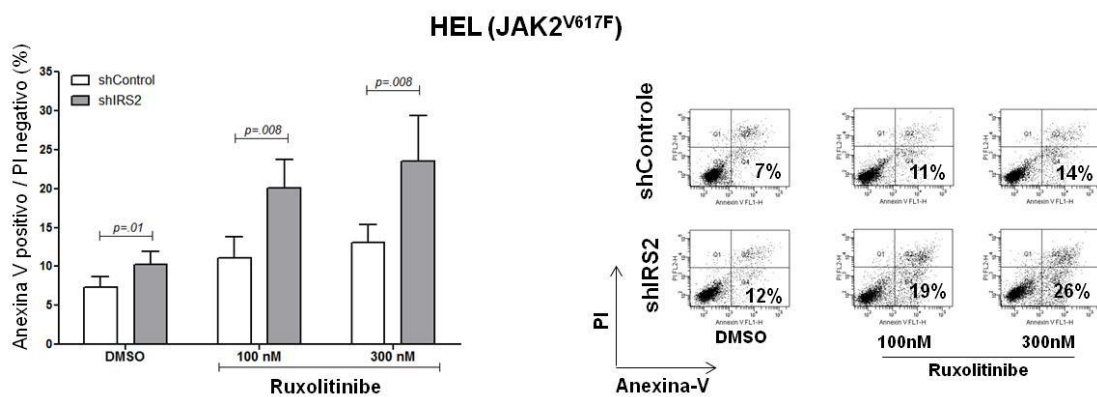
A inibição de IRS2 não foi capaz de reduzir a clonogenicidade em células U937 (JAK2^{WT}), embora o tratamento com ruxolitinibe isoladamente tenha reduzido a formação de colônias nesta linhagem celular (**Figuras 12 C, D, F**). O fato de o ruxolitinibe não ter tido efeito sobre a viabilidade celular por MTT, mas ter resultado em redução do crescimento clonal em células U937, provavelmente deve-se aos diferentes tempos de exposição à droga necessários para cada ensaio: 48 horas para o MTT e 8 dias para a formação de colônias.

4.5. O silenciamento de IRS2 induz apoptose e apresenta efeitos cumulativos com ruxolitinibe

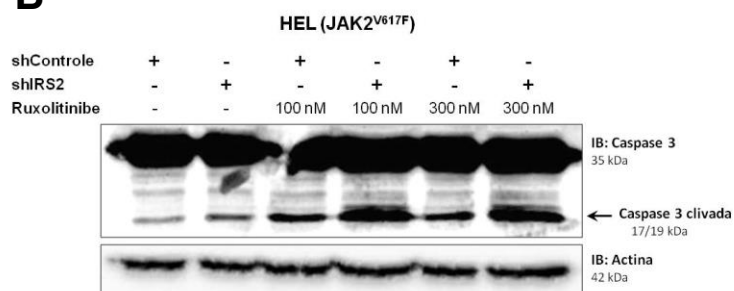
A partir dos resultados obtidos nos ensaios de viabilidade celular e clonogenicidade, procuramos avaliar se estes efeitos poderiam ser secundários a um aumento das taxas de apoptose. Para isso, células shIRS2 e shControle tratadas com ruxolitinibe (100 e 300nM) ou DMSO por 48 horas foram submetidas à análise de apoptose dos marcadores Anexina V/PI e caspase-3 por citometria de fluxo, e de caspase-3 clivada/pró- caspase 3 por western blot.

Nas células HEL (JAK2^{V617F}), o silenciamento de IRS2 aumentou significativamente a quantidade de células anexina V positivas / PI negativas (células apoptóticas), possuindo efeito cumulativo com o ruxolitinibe (todos $p < 0,01$) (**Figura 13 A**).

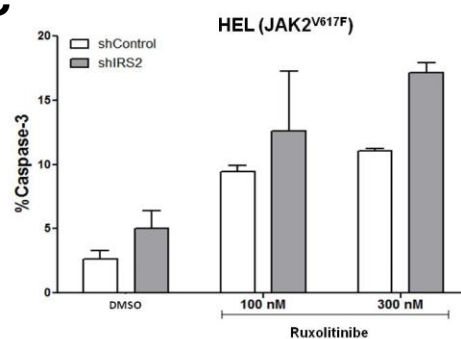
A



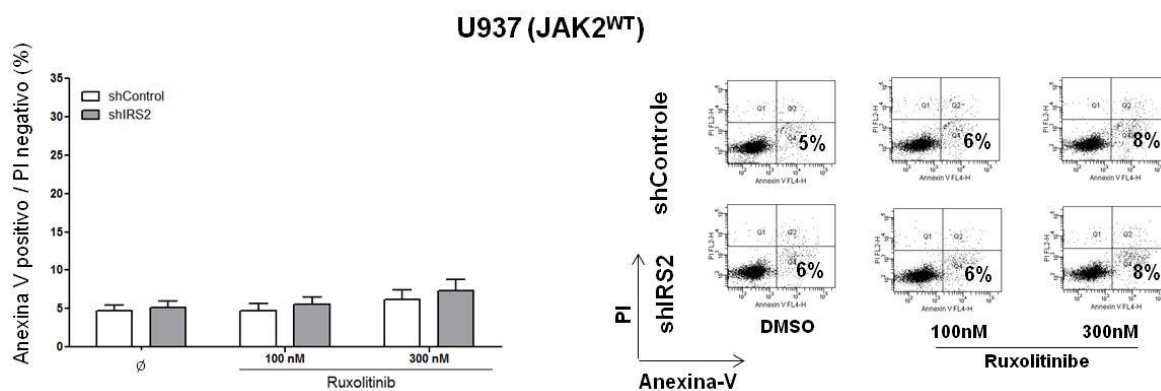
B



C



D



E

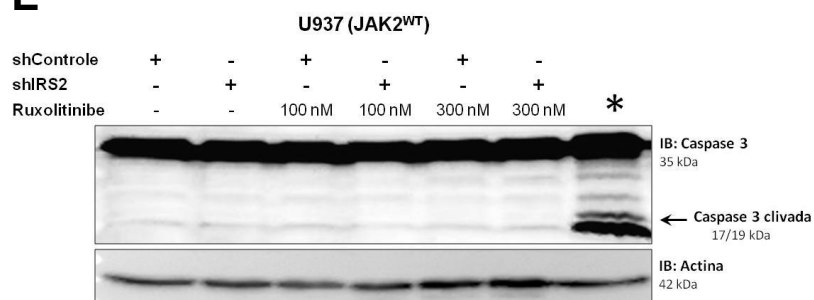


Figura 13. O silenciamento de IRS2 induz apoptose em células HEL e possui efeitos cumulativos com

ruxolitinibe. (A) Apoptose avaliada por citometria de fluxo (células anexina V positivo / PI negativo) em células HEL shControle e shIRS2 tratadas com veículo apenas ou com ruxolitinibe. **(B)** Avaliação da ativação de caspase-3 por imunoblotting (IB) com anticorpo que reconhece caspase 3 total e caspase-3 clivada em células HEL shControle e shIRS2 tratadas com veículo apenas ou ruxolitinibe, evidenciando maior geração de caspase-3 clivada nas células inibidas para IRS2; pode-se observar efeito cumulativo da inibição de IRS2 com ruxolitinibe sobre a apoptose através da maior geração de caspase-3 clivada. **(C)** Porcentagem de caspase-3 observada por citometria de fluxo em células HEL sob as mesmas condições. **(D)** Apoptose avaliada por citometria de fluxo (células anexina V positivo/ PI negativo) em células U937 shControle e shIRS2 tratadas com veículo apenas ou com ruxolitinibe, e **(E)** por imunoblotting (IB) com anticorpo anti- caspase-3, que reconhece caspase 3 total e caspase-3 clivada, não sendo observada geração de caspase-3 clivada; extrato total de células HEL tratadas com ruxolitinibe foi adicionado ao experimento como controle positivo do bom funcionamento do anticorpo para a forma clivada de caspase-3. Média $\pm$ desvio padrão de dez experimentos diferentes estão representados nos gráficos de apoptose por citometria de fluxo, teste t de *Student*. As imagens de *dot plots* e imunoblotting são ilustrativas de um único experimento.

Em concordância com estes resultados, foi observado aumento de caspase 3 por citometria de fluxo e de caspase-3 clivada por western blot nas células HEL inibidas para IRS2. Novamente, os experimentos demonstraram efeitos cumulativos entre a inibição de IRS2 e o tratamento com ruxolitinibe; os maiores níveis de caspase-3 clivada foram observados nas células shIRS2 tratadas com ruxolitinibe (**Figuras 13 B-C**).

Nas células U937, o silenciamento de IRS2 isoladamente ou combinado com ruxolitinibe não afetou as taxas de apoptose por citometria de fluxo com marcação para anexina V/PI e por imunoblotting com anticorpos anti- caspase-3, não sendo observada geração de caspase-3 clivada nestas células (**Figuras 13 D-E**).

4.6. Caracterização clínica e molecular da coorte de pacientes com NMP incluídas no estudo

Noventa e nove pacientes com PV, TE ou MFP foram incluídos na coorte de estudo. As características clínicas, laboratoriais e moleculares estão descritas na **Tabela 4** e no **Anexo IV**.

Tabela 4. Características clínicas, laboratoriais e moleculares dos pacientes com PV, TE e MFP incluídos no estudo

	Total	Policitemia vera	Trombocitemia essencial	Mielofibrose primária
Pacientes estudados	99	30	37	32
Sexo (masculino/feminino)	41/58	15/15	11/26	15/17
Idade em anos, mediana (variação)	59,8 (18,9-87,1)	65,4 (35,1-83,3)	55,6 (18,9-84,1)	61,7 (26,5-87,1)
Visceromegalias (sim/não)†	25/74	06/24	06/31	13/19
Eventos tromboembólicos* (sim/não)	12/87	07/23	02/35	03/29
Tratamento na data de coleta[#] (HU/AN/Nenhum)	72/02/25	25/00/05	25/01/11	22/01/09
Status mutacional (JAK2^{V617F}/JAK^{exon12}/CALR^{MUT})	64/00/25	28/00/00	15/00/16	21/00/09
Parâmetros hematimétricos ao diagnóstico, mediana (variação)				
Hemoglobina, g/dL	14,2 (8,1-22,7)	18,3 (16,4-22,7)	13,7 (9,7-17)	13,5 (8,1-20,4)
Leucócitos, x 10 ⁹ /L	10,10 (2,40-43,26)	11,35 (6,28-25,54)	9,00 (3,03-17,80)	11,60 (2,40-43,26)
Neutrófilos, x 10 ⁹ /L	7,00 (0,47-38,33)	8,06 (3,54-20,19)	5,48 (2,11-15,10)	8,13 (0,47-38,33)
Plaquetas, x 10 ⁹ /L	738,0 (108,0-2650,0)	564,0 (203,0-309,0)	898,0 (436,0-2650,0)	711,0 (108,0-1897,0)

Abreviações: PV, policitemia vera; TE, trombocitemia essencial; MFP, mielofibrose primária.

JAK2^{V617F}: mutação V617F em *JAK2*; JAK2^{exon12}: mutações no exon 12 de *JAK2*; CALR^{MUT}: mutações em *calreticulina*.

* Eventos isquêmicos, trombóticos ou embólicos, sem outra causa associada aparente.

[#] Tratamento vigente na data de coleta da amostra de sangue periférico. HU: hidroxiureia; AN: anagrelide.

† Hepatomegalia ou esplenomegalia detectadas ao exame físico ou através de ultrassonografia de abdômen.

Os dados clínicos e laboratoriais foram obtidos com base nos prontuários dos pacientes e nos dados laboratoriais gerados neste estudo. Foram coletados dados clínicos desde o diagnóstico até a última data em que os pacientes foram avaliados no ambulatório de hematologia do Hemocentro de Campinas - Unicamp.

As mutações somáticas no gene da *CALR* de tipo-1 (L367fs*46, deleção de 52pb) e tipo-2 (K385fs*47, inserção de 5pb) foram analisadas através de sequenciamento por análise de fragmentos em 97 dos 99 pacientes de nossa coorte (**Figura 14**).

O fato de mutações no gene *CALR* não ter sido investigada em dois dos pacientes deveu-se à falta de disponibilidade de amostras de DNA ou da qualidade inadequada das mesmas na ocasião da realização dos experimentos. Alelos selvagens apresentam bandas com 297pb, sendo possível identificar o genótipo com mutação *indel*, ou seja, com deleção ou inserção, pelo aparecimento de bandas de 245pb para a mutação do tipo 1 e 302pb para a mutação do tipo 2 (**Figura 14A**). Outras mutações *indel* de *CALR* também podem ser identificadas por essa metodologia; mais de 30 tipos de mutações *indel* de *CALR* já foram descritas (40, 43). A confirmação das mutações foi realizada através da análise de fragmentos (**Figura 14B**). Encontramos mutações *indel* em *CALR* em 25 dos pacientes testados, sendo um paciente com TE e nove pacientes com MFP.

A correlação dos dados clínicos e laboratoriais com o prognóstico dos pacientes incluídos (sobrevida global e sobrevida livre de eventos (progressão para leucemia aguda ou mielofibrose secundária)) não foi possível em virtude do curto tempo de seguimento prospectivo desta pesquisa (dezembro/12 a março/15). Na coorte de pacientes com PV e TE, houve registro de apenas um óbito em cada grupo, resultantes de progressão para LMA e MFP, respectivamente; não houve outros casos de progressão de doença em ambos os grupos.

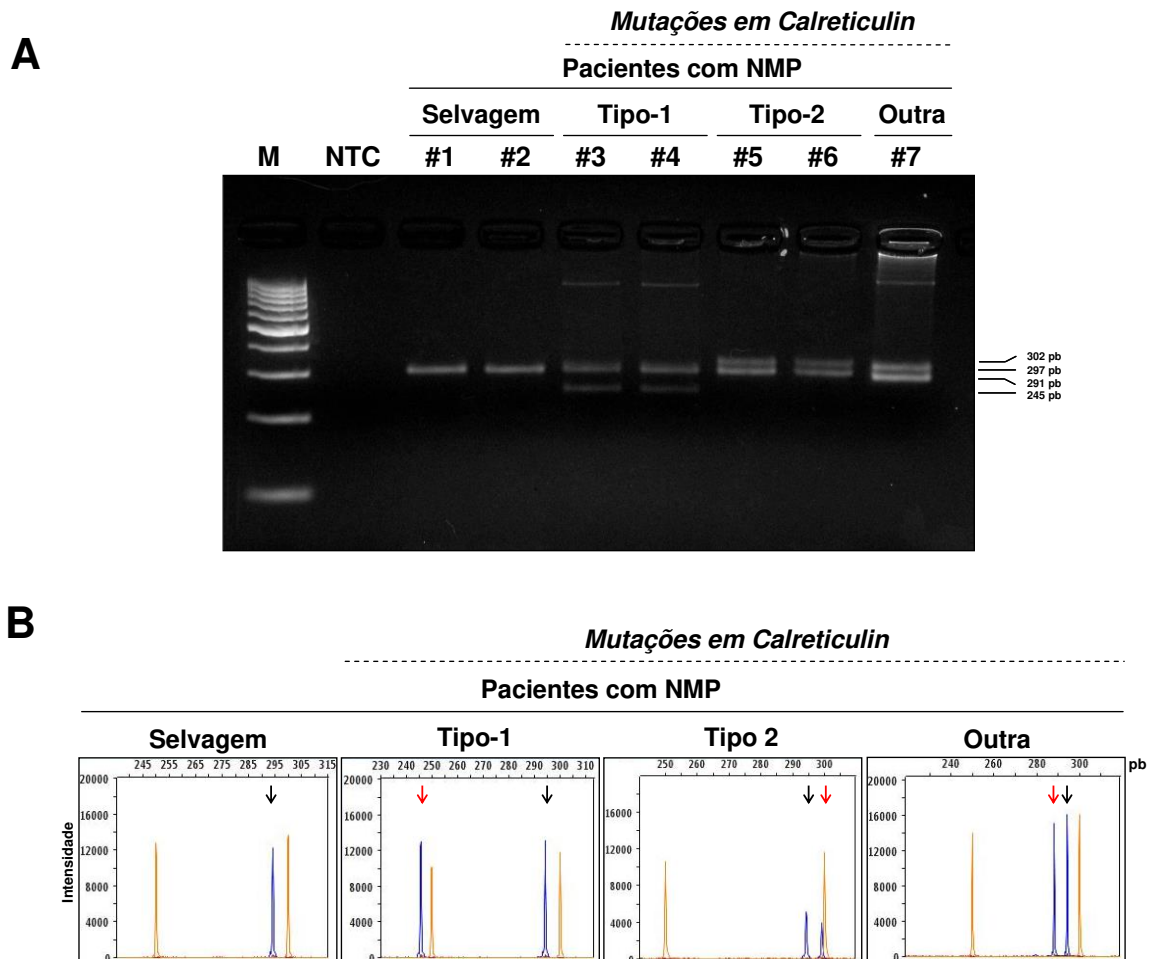


Figura 14. Mutações *indel* no gene *Calreticulín* (*CALR*) em pacientes com neoplasias mieloproliferativas (NMP). (A) Amplificação por PCR do éxon 9 do gene *CALR* corrido em gel de agarose 4%; linha 1: marcador de peso molecular 100pb (M); linha 2: controle negativo (NTC); linhas 3 a 8: amplicons de *CALR*. Pacientes com NMP #1 e #2: selvagens para *CALR* (amplicons *CALR*^{WT}: 297bp); #3 e #4 heterozigotos para o tipo-1 de mutação em *CALR* (amplicons *CALR*^{WT}: 297bp; amplicons *CALR*^{MUT} tipo-1: 245bp); #5 e #6: heterozigotos para o tipo-2 de mutação em *CALR* (amplicons *CALR*^{WT}: 297; amplicons *CALR*^{MUT} tipo-2: 302bp); #7: heterozigotos para mutação em *CALR* que não pertence ao tipo-1 e -2 (amplicons *CALR*^{WT}: 297bp; amplicons *CALR*^{MUT}: 291bp). **(B)** Análise por tamanho de fragmento para amplicons de *CALR* em pacientes com NMP: os picos em laranja representam o marcador de peso molecular *GeneScan 500 LIZ dye Size Standard* e os picos em azul representam os amplicons de *CALR*; as setas pretas indicam o alelo selvagem (297pb) e as setas vermelhas indicam os alelos mutados.

Segundo o DIPSS (106) (*Dynamic International Prognostic Scoring System, International Working Group for Myeloproliferative Neoplasms Research and Treatment*), escore prognóstico de sobrevida amplamente utilizado em pacientes com diagnóstico de mielofibrose primária, onde são considerados os fatores "idade", "hemoglobina", "contagens de leucócitos" e "presença de sintomas constitucionais", nosso grupo de pacientes com MFP foi estratificado da seguinte forma: 17 pacientes de baixo risco, 13 pacientes de risco intermediário-1 e dois pacientes de risco intermediário-2. No grupo de pacientes com MFP, foram registrados seis óbitos: um óbito após evolução para LMA (DIPSS ao diagnóstico: intermediário-2), quatro por falência medular após progressão para a fase fibrótica da doença (DIPSS ao diagnóstico: um caso intermediário-2 e três casos de baixo risco) e um óbito por causa não relacionada (insuficiência cardíaca) (DIPSS baixo risco).

Considerando a baixa ocorrência dos eventos "óbito", "progressão para LMA" e "progressão para mielofibrose secundária", as análises estatísticas de sobrevida global e sobrevida livre de eventos não foram possíveis. A ocorrência destes eventos nas NMP é rara e requer período mais longo de avaliação. A continuação deste trabalho, com maiores períodos de seguimento, permitirá análises mais fidedignas destes elementos em nossa casuística.

4.7. Elevada expressão de *IRS2* em pacientes com NMP $JAK2^{V617F}$ comparados a $JAK2^{WT}$

Os níveis de mRNA de *IRS2* foram avaliados em amostras de células $CD34^+$ de doadores normais (controles) e de pacientes com NMP. O gene *HPRT* foi utilizado como controle endógeno, e uma amostra de células primárias $CD34^+$ de um doador normal (controle) foi utilizada como amostra calibradora. Um aumento significativo na expressão de

IRS2 foi observado em pacientes com TE em relação às amostras controle (0,36 [0,08-2,16], n=37 versus 0,18 [0,00-2,29], n=28; $p=0,027$). Embora tenha havido tendência de aumento da expressão de *IRS2* nos pacientes com diagnóstico de PV e MFP em relação aos doadores normais, esta diferença não foi estatisticamente significativa. Quando os pacientes com TE, PV e MFP foram agrupados em um único grupo (NMP), não houve diferença na expressão de *IRS2* no grupo de NMP em relação aos indivíduos controle ($p=0,19$) (**Figura 15**).

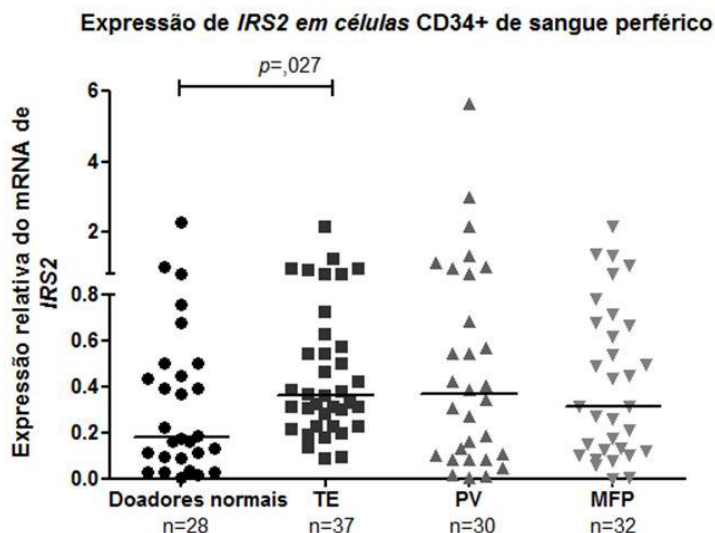


Figura 15. Aumento da expressão do mRNA de *IRS2* em células CD34⁺ de pacientes com trombocitemia essencial em relação aos doadores normais. Análise da expressão gênica de *IRS2* em células CD34⁺ de sangue periférico de doadores normais e de pacientes com diagnóstico de trombocitemia essencial (TE), policitemia vera (PV) e mielofibrose primária (MFP). Os pontos representam a expressão gênica de *IRS2* em cada sujeito avaliado e as barras horizontais indicam a mediana de cada grupo. O número de indivíduos incluídos em cada grupo (n) está indicado na figura. Foi observada maior expressão de *IRS2* no grupo de TE em relação aos doadores normais ($p=0,027$); embora tendência semelhante tenha sido observada nos grupos de PV e MFP em relação aos controles, esta diferença não foi estatisticamente significativa. Teste de *Mann-Whitney*.

Níveis significativamente maiores de *IRS2* foram observados em amostras de pacientes portadores da mutação JAK2^{V617F} quando comparados a JAK2^{WT} (0,48 [0,00-5,65], n=64 *versus* 0,29 [0,00-0,83], n=35; $p<0,001$) (**Figura 16**). Esta diferença permaneceu significativa quando os pacientes com e sem a mutação foram comparados dentro dos grupos de TE e MFP ($p\leq 0,01$). Embora tenha sido observada baixa expressão do mRNA de *IRS2* nos pacientes com PV JAK2^{WT}, o número de amostras não mutadas foi muito baixo, impossibilitando análise estatística adequada (n=2) (**Tabela 5**). Os níveis de expressão gênica de *IRS2* foram significativamente maiores nos pacientes com NMP JAK^{V617F} em relação aos doadores normais (0,48 [0,00-5,65], n=64 *versus* 0,18 [0,00-2,29], n=28; $p=0,01$); entretanto, não houve diferença estatisticamente significativa na expressão de *IRS2* entre os grupos de doadores normais e pacientes com NMP JAK2^{WT} (**Figura 16**).

Expressão de *IRS2* de acordo com a presença da mutação $JAK2^{V617F}$

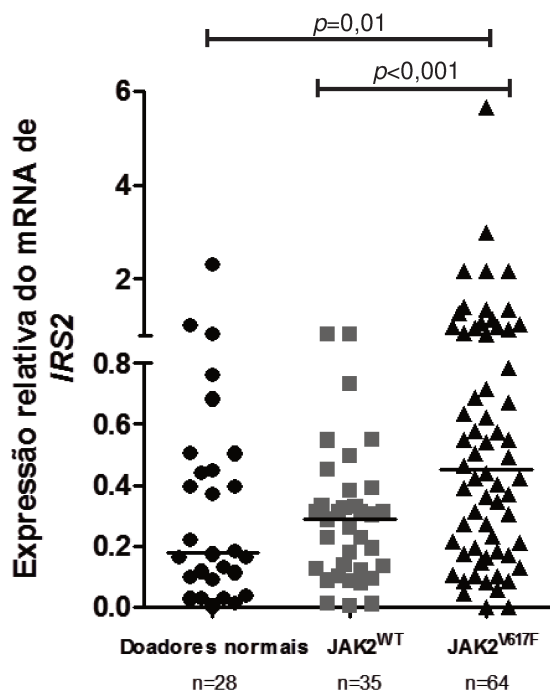


Figura 16. Aumento da expressão do mRNA de *IRS2* em células CD34⁺ de pacientes com neoplasias mieloproliferativas (TE, PV, MFP) com mutação $JAK2^{V617F}$ em relação a pacientes com $JAK2$ selvagem ($JAK2^{WT}$). Análise da expressão gênica de *IRS2* em células CD34⁺ de sangue periférico de doadores normais e pacientes com diagnóstico de trombocitemia essencial, policitemia vera e mielofibrose primária categorizados com base na presença da mutação $JAK2^{V617F}$. Os pontos representam a expressão gênica de *IRS2* em cada sujeito avaliado e as barras horizontais indicam a mediana de cada grupo. O número de indivíduos incluídos em cada grupo (n) está indicado na figura. Foi observada maior expressão de *IRS2* no grupo de pacientes com a mutação $JAK2^{V617F}$ em relação aos pacientes com $JAK2$ selvagem ($p<0,001$) e aos doadores normais ($p=0,01$). Teste de *Mann-Whitney*.

Tabela 5. Maiores níveis do mRNA de *IRS2* em pacientes com a mutação $JAK2^{V617F}$

Diagnóstico	Trombocitemia essencial n=37		Policitemia vera n=30		Mielofibrose primária n=32	
	$JAK2^{WT}$ n=22	$JAK2^{V617F}$ n=15	$JAK2^{WT}$ n=2	$JAK2^{V617F}$ n=28	$JAK2^{WT}$ n=11	$JAK2^{V617F}$ n=21
Expressão de <i>IRS2</i> *	0,31 (0,09-0,83)	0,50 (0,20-2,17) $p=0,01$	NA#	0,39 (0,00-5,65) $p=NA$	0,12 (0,00-0,49)	0,52 (0,00-2,16) $p=0,02$

$JAK2^{WT}$: *JAK2* selvagem; $JAK2^{V617F}$: mutação V617F em *JAK2*

* Os níveis relativos do mRNA de *IRS2* são indicados por mediana (mínimo- máximo)

Os níveis relativos do mRNA de *IRS2* em pacientes com policitemia vera $JAK2^{WT}$ foram 0,01 para ambos pacientes (n=2)

NA: não avaliável

Quando analisamos a quantificação do alelo mutante de JAK2^{V617F} em uma parcela de pacientes de nossa coorte (n=55), não pudemos observar correlação entre os níveis de expressão do alelo JAK2^{V617F} e os níveis de *IRS2*, sugerindo que a presença da mutação de JAK2, mais do que seus níveis, pode interferir na expressão de *IRS2* (**Figura 17**).

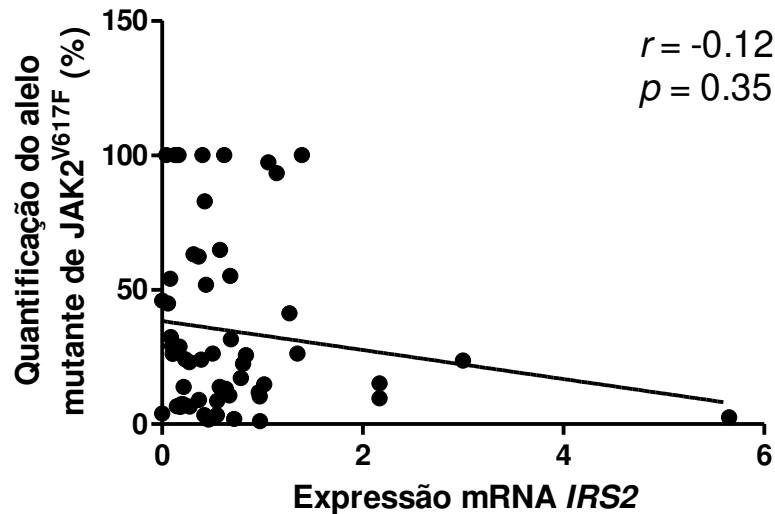


Figura 17. Ausência de correlação entre a quantificação do alelo mutante de JAK2^{V617F} e a expressão do mRNA de *IRS2* em pacientes com neoplasias mieloproliferativas. Análise da correlação entre a expressão gênica de *IRS2* em células CD34⁺ de sangue periférico de pacientes com diagnóstico de NMP (n=55) (trombocitemia essencial (n=14), policitemia vera (n=24) e mielofibrose primária (n=17)) e a quantificação do alelo mutante de JAK2^{V617F} em células totais de sangue periférico. Não foi observada correlação entre os parâmetros avaliados ($r=-0,12$, $p=0,35$). Teste de correlação de *Spearman*.

A expressão do mRNA de *IRS2* foi significativamente menor nos pacientes com NMP com *CALR* mutada em relação àqueles com *CALR* selvagem (0,30 [0,00-0,81], n=25 *versus* 0,43 [0,00-5,65], n=72; $p=0,01$). Os pacientes com NMP com *CALR* selvagem apresentaram níveis significativamente maiores de *IRS2* quando comparados aos doadores normais (0,30 [0,00-0,81], n=25 *versus* 0,18 [0,00-2,29], n=28; $p=0,02$); não foi observada diferença

significativa na expressão de *IRS2* entre os grupos de pacientes com NMP com *CALR* mutada e doadores normais ($p=0,89$) (**Figura 18**).

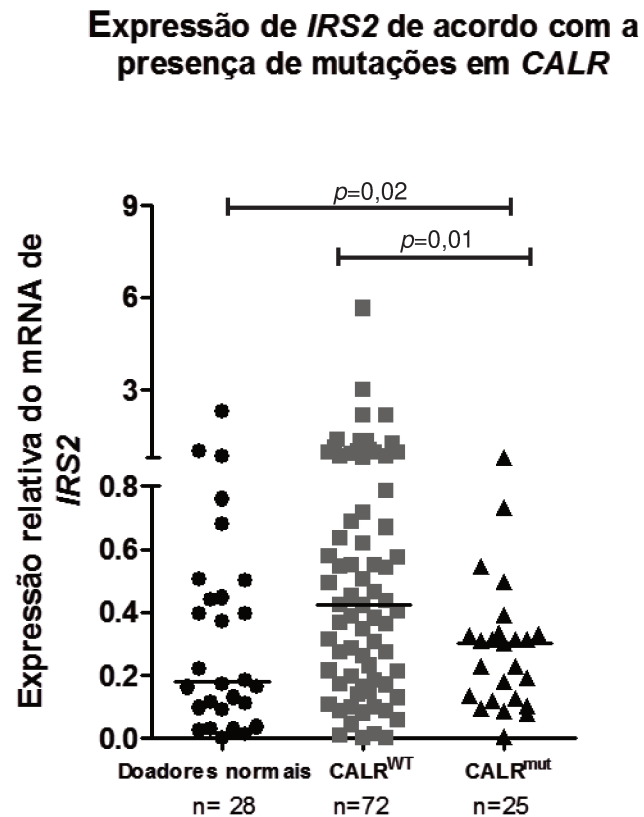


Figura 18. Redução da expressão do mRNA de *IRS2* em células $CD34^+$ de pacientes com neoplasias mieloproliferativas (TE, PV, MFP) com mutações (tipo 1 e tipo 2) em *CALR* em relação a pacientes com *CALR* selvagem ($CALR^{WT}$). Análise da expressão gênica de *IRS2* em células $CD34^+$ de sangue periférico de pacientes com diagnóstico de trombocitemia essencial (TE), policitemia vera (PV) e mielofibrose primária (MFP) categorizados com base na presença de mutações em *CALR* ($CALR^{MUT}$). Os pontos representam a expressão gênica individual de cada sujeito avaliado e as barras horizontais indicam a mediana de cada grupo. O número de indivíduos incluídos em cada grupo (n) está indicado na figura. Foi observada maior expressão gênica de *IRS2* no grupo de pacientes com *CALR* selvagem ($CALR^{WT}$) em relação aos pacientes com *CALR* mutada ($CALR^{MUT}$) ($p=0,01$) e aos doadores normais ($p=0,02$). Teste de Mann-Whitney.

Cabe ressaltar que, na nossa casuística, os grupos de *CALR* mutada e *JAK2*^{V617F} foram mutuamente exclusivos, corroborando os resultados obtidos na maior parte dos estudos que investigaram estas mutações. Desta forma, o grupo de maior expressão de *IRS2* corresponde aos pacientes com *JAK2* mutado e *CALR* selvagem; inversamente, os pacientes com menor expressão de *IRS2* correspondem aos pacientes com *CALR* mutada e *JAK2* selvagem. Assim, não é possível atribuir a uma ou a outra mutação as alterações observadas nos níveis de *IRS2*.

4. Resultados Subprojeto 2 – Mutações de *KIT* em mastocitose sistêmica familiar

4.8. Descrição clínica - um raro caso de mastocitose sistêmica familiar

Caso 1. O caso índice de nosso estudo foi uma paciente do sexo feminino de 33 anos, que foi encaminhada ao nosso serviço para avaliação de quadro de esplenomegalia maciça e pancitopenia. A paciente negava quaisquer comorbidades, e, no momento da primeira avaliação, negava antecedentes familiares de neoplasias hematológicas. A paciente era filha única e tinha apenas uma filha (caso 2). Quando interrogada sobre queixas adicionais, a paciente referia vermelhidão difusa da pele, com prurido associado, desde a infância. Referia que sua filha apresentava quadro cutâneo semelhante (**Figura 19**).

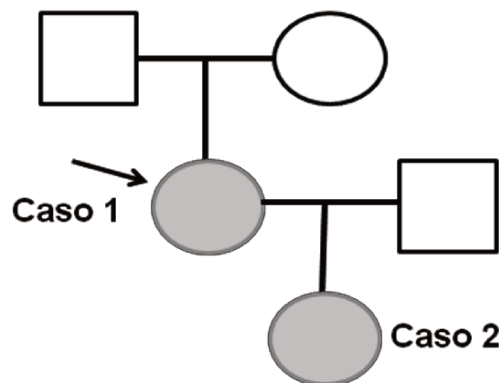


Figura 19. Heredograma da família com mastocitose sistêmica em estudo. O heredograma foi construído com base nas informações fornecidas pelo caso 1 (caso índice, indicado pela seta). Em cinza, estão indicados os indivíduos acometidos / sintomáticos.

Ao exame físico da primeira consulta, apresentava *rash* cutâneo difuso, de característica infiltrativa, e esplenomegalia acentuada (baço a 25cm do rebordo costal esquerdo), sem alterações observadas em outros órgãos ou sistemas. Para investigação,

foram solicitados exames subsidiários, descritos na **Tabela 6**. A paciente apresentava anemia discreta, plaquetopenia e hipoalbuminemia. Para investigação etiológica das alterações hematológicas, foi solicitada avaliação de medula óssea: a biópsia de medula óssea revelou 70% de infiltração por mastócitos. O mielograma mostrou 51% de mastócitos, sendo menos do que 10% de elementos atípicos ou fusiformes. A citogenética foi normal (46,XX[20]). Em virtude das manifestações cutâneas, foi realizada biópsia de pele, que revelou infiltração extensa por mastócitos. O valor da triptase sérica era de 165,00ug/L (valor de referência: 1,0 a 11,0ug/L). Durante o seguimento, a paciente evoluiu com ruptura esplênica espontânea; a histologia do baço evidenciou densa infiltração por mastócitos. A paciente foi submetida a esplenectomia de emergência, com subsequente resolução das citopenias. A infiltração da medula óssea e do baço por mastócitos do caso 1 está ilustrada na **Figura 20**. Após a recuperação pós- operatória, dada a gravidade do caso, foi iniciado tratamento com cladribina, um análogo de purina efetivo em algumas formas de mastocitose sistêmica; no entanto, após dois ciclos da quimioterapia, não houve resposta clínica em relação ao quadro cutâneo, nem redução da infiltração medular por mastócitos.

A paciente foi mantida em conduta expectante, e, quatorze meses após, quando houve aprovação do uso compassivo da medicação pelo comitê de ética da instituição (**Anexo III**), simultaneamente à conclusão dos resultados deste trabalho, foi iniciado tratamento com mesilato de imatinibe (400mg/dia).

Tabela 6. Características clínico - laboratoriais das pacientes com mastocitose sistêmica familiar

	Caso 1	Caso 2
Idade em anos	33	17
Sexo (M/F)	F	F
Características clínicas		
Urticária pigmentosa	Não	Não
Eritrodermia	Sim	Sim
Sintomas cutâneos*	Sim	Sim
Sintomas constitucionais†	Não	Não
Sintomas relacionados a mediadores‡	Não	Não
Perda de peso §	Não	Não
Hepatomegalia	Sim	Não
Esplenomegalia	Sim	Não
Adenomegalia¶	Não	Não
Exames subsidiários		
Hemoglobina, g/dL	11,1	13,0
Leucócitos, x 10 ⁹ /L	4,08	7,94
Neutrófilos, x 10 ⁹ /L	2,73	4,42
Eosinófilos, x 10 ⁹ /L	0,04	1,8
Monócitos, x 10 ⁹ /L	0,08	0,42
Plaquetas, x 10 ⁹ /L	62,2	163,0
Albumina, g/dL (3,5-5,0)	2,6	3,71
Fosfatase alcalina sérica, U/L (40-150)	77	90
AST, U/L (7-40)	17	21
Bilirrubina total, mg/dL (0-1,5)	0,18	0,40
LDH, U/L (100-220)	297	241
Triptase sérica, µg/L (1 a 11) [#]	165	130
Endoscopia digestiva alta	Normal	Normal

Símbolos e abreviações:

AST, aspartato aminotransferase, LDH, lactato desidrogenase

*Inclui prurido, *flushing*, urticária, eritrodermia e angioedema

†Inclui perda de peso, febre, calafrios e sudorese noturna

‡Inclui cefaleia, tonturas, síncope/ pré-síncope, hipotensão, anafilaxia, palpitação/taquicardia, broncoconstrição/sibilância e úlcera péptica

§Perda de peso de >10% em um período de seis meses ou menos

||Hepatomegalia ou esplenomegalia palpáveis

¶Adenomegalia palpável ou vista por exame de imagem

[#]Quantificação realizada no laboratório de patologia clínica (Dr. Rogers), *Cleveland Clinic*, EUA

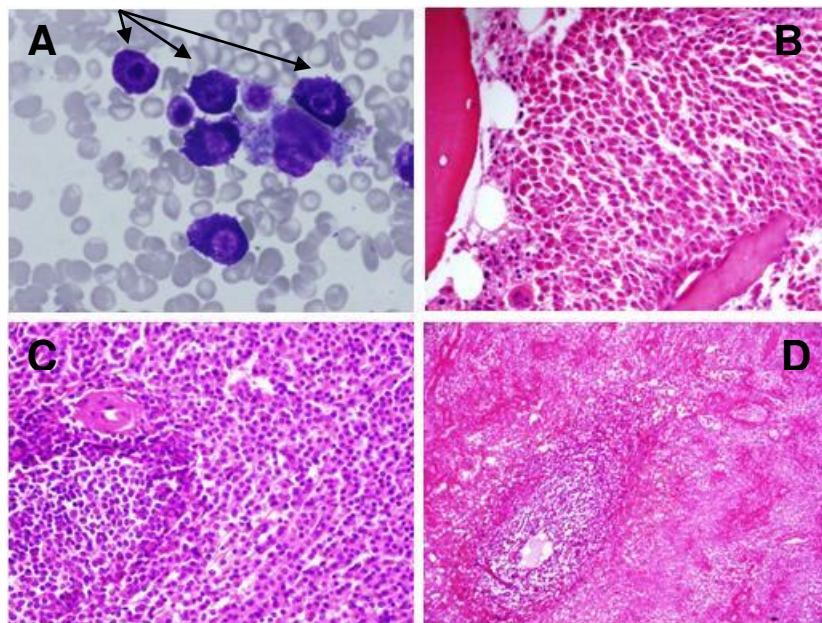


Figura 20. Infiltração maciça por mastócitos na medula óssea e no baço do caso 1. (A) Mielograma ao diagnóstico evidenciando infiltração maciça por mastócitos (setas). (B) Histologia da medula óssea: intensa hipercelularidade da medula óssea secundária a infiltração por grandes aglomerados de mastócitos; são observados escassos remanescentes hematopoéticos das linhagens eritroide e megacariocítica (HE, 400x). (C) Histologia do baço em detalhe; denso infiltrado de mastócitos e focos de necrose (HE, 250x). (D) Baço difusamente infiltrado por mastócitos, entremeados por remanescentes da polpa branca (HE, 100x).

Caso 2. A única filha do caso 1 (caso 2) foi avaliada em nosso serviço após a informação de que apresentava manifestações cutâneas semelhantes à da mãe desde a primeira infância. Tratava-se de uma mulher de 17 anos, com uma história insidiosa de *rash* cutâneo e prurido. Ao exame físico, apresentava hiperemia cutânea difusa, com espessamento da pele. Não apresentava visceromegalias ou alterações perceptíveis em outros sistemas. Seu hemograma era normal. Sua biópsia de pele evidenciou infiltração moderada por mastócitos, com 70% de infiltração por mastócitos na biópsia de medula óssea. O mielograma revelou 17% de mastócitos, com 3% de elementos atípicos (**Figura 21**). O cariótipo resultou normal (46,XX[20]). Os níveis de triptase sérica eram de 130,00µg/L

(valor de referência: 1,0 a 11,0 μ g/L). Os resultados dos principais exames subsidiários realizados estão descritos na **Tabela 6**. A paciente iniciou uso de mesilato de imatinibe 400mg/dia na ocasião da aprovação do uso compassivo da droga (**Anexo III**).

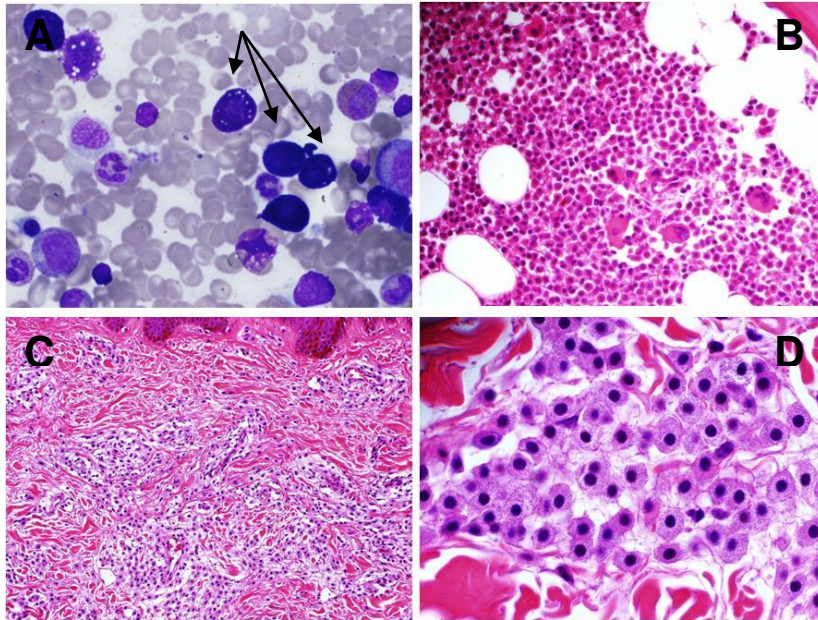


Figura 21. Extensa infiltração por mastócitos na medula óssea e na pele do caso 2. (A) Mielograma ao diagnóstico evidenciando infiltração por mastócitos de características maduras (setas). **(B)** Histologia da medula óssea: intensa hipercelularidade secundária à presença de grandes focos de mastócitos; escassos remanescentes das linhagens eritroide e megacariocítica são observados (HE, 400x). **(C)** Histologia da pele: infiltração da derme superficial por agrupamentos de mastócitos, com padrão perivascular (HE, 250x). **(D)** Histologia da pele em detalhe; as células neoplásicas apresentam núcleos arredondados e citoplasma abundantemente granular (HE, 1000x).

Ambas pacientes preenchem os critérios de 2008 da Organização Mundial da Saúde para o diagnóstico de mastocitose sistêmica (107): o critério maior (infiltrados densos, multifocais, de mastócitos na biópsia de medula óssea) mais um critério menor (triptase persistentemente acima de 20 μ g/L). A paciente 1 foi diagnosticada com leucemia de mastócitos forma aleucêmica: ela apresentava esplenomegalia maciça com hiperesplenismo,

pancitopenia, infiltração significativa da medula óssea por mastócitos, com hemopoese normal reduzida, e ausência de mastócitos circulantes na periferia. A paciente 2 foi diagnosticada com mastocitose sistêmica indolente (ausência de achados "C", apenas um achado "B" [30% de infiltração por mastócitos na biópsia de medula óssea], e ausência de evidências de outra neoplasia hematológica não relacionada à mastocitose). As pacientes 1 e 2 apresentavam a subvariante morfológica denominada "mastocitose sistêmica bem diferenciada", caracterizada por células de fenótipo maduro, com formato arredondado, núcleo central e citoplasma granular (108, 109).

4.9. Identificação da mutação germinativa KIT^{K509I}

As análises das reações de sequenciamento evidenciaram a substituição de adenina (A) por timidina (T) na posição 1547 do éxon 9 de *KIT*, resultando em uma troca no aminoácido 509 de lisina para isoleucina (c.1547 A>T, p. K509I). A mutação foi encontrada nas amostras de DNA obtidas de mucosa bucal, células CD3⁺ e células totais de sangue periférico e medula óssea dos casos 1 e 2 (**Figuras 22 A-B**). Os pais do caso 1 apresentaram *KIT* selvagem, como observado pela análise do sequenciamento (**Figura 22C**).

Não foram encontradas outras mutações em *KIT*, incluindo KIT^{D816V} , e nos éxons pesquisados (*hotspots*) de *TET2*, *DNMT3A*, *ASXL1* e *SF3B1*. Estes resultados indicam que a mutação KIT^{K509I} foi uma mutação germinativa adquirida *de novo* pela paciente 1, sendo subsequentemente transmitida para sua filha (paciente 2).

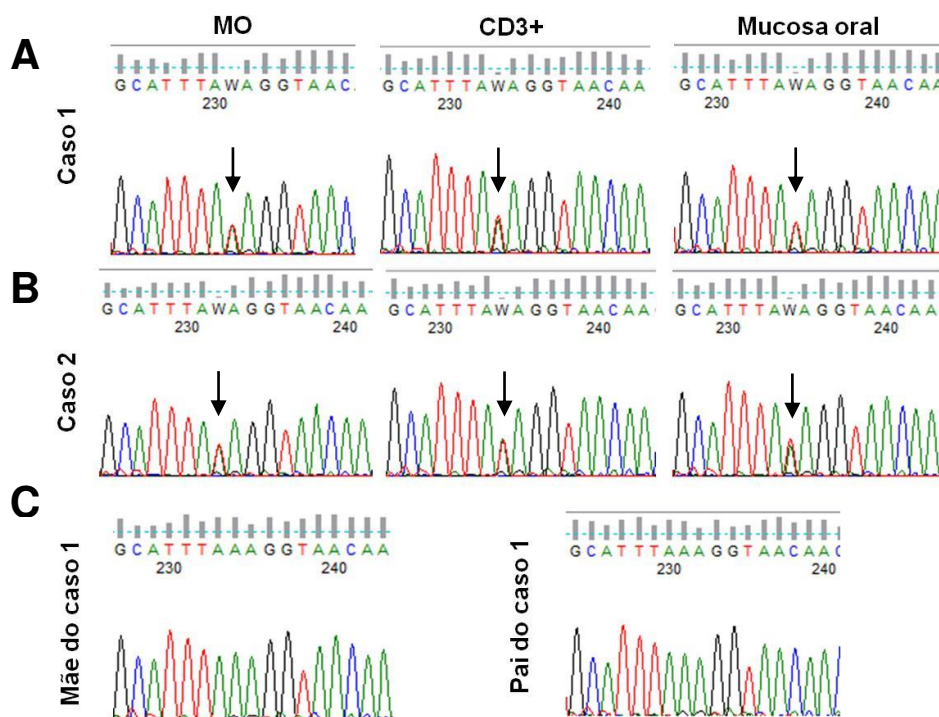


Figura 22. Identificação da mutação germinativa KIT^{K509I} nos casos 1 e 2. Cromatogramas derivados de sequenciamento gênico pela técnica de Sanger. As setas indicam a mutação KIT^{K509I} (c. 1526 A>T) identificada no caso 1 **(A)** e no caso 2 **(B)**. A mutação foi observada em amostras de DNA de medula óssea total (MO), de células $CD3^+$ purificadas de sangue periférico e de mucosa oral, como indicado na figura. **(C)** A análise de sequenciamento de *KIT* pela técnica de Sanger de células de sangue periférico da mãe e do pai do caso 1 não revelou mutações em *KIT*.

4.10. As células de medula óssea com a mutação KIT^{K509I} são sensíveis ao tratamento *in vitro* com inibidores de tirosinoquinase

O tratamento *in vitro* com inibidores de tirosinoquinase das células mononucleares da medula óssea das pacientes 1 e 2 portando a mutação KIT^{K509I} resultaram em efeitos variáveis sobre a viabilidade celular e a apoptose, de acordo com a droga utilizada e a duração do tratamento.

O tratamento com mesilato de imatinibe resultou em redução significativa da viabilidade celular, avaliada por MTT, nos dias 4, 8 e 12 de cultura. Também foi observada significativa redução da viabilidade celular com dasatinibe nos dois casos estudados nos dias 8 e 12 de tratamento, e com PKC412 no quarto e no oitavo dias de tratamento para a paciente 1 e no quarto dia para a paciente 2 (todos $p < 0,05$) (**Figura 23**).

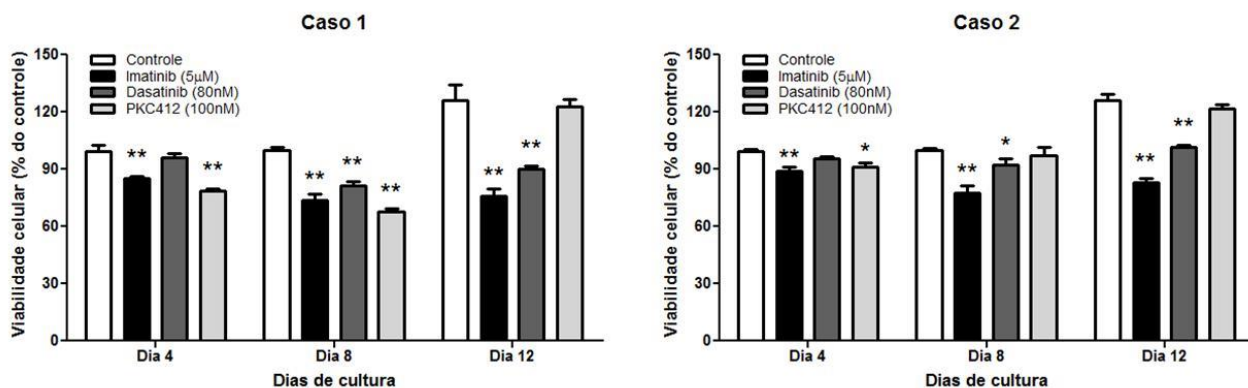


Figura 23. O tratamento com imatinibe, dasatinibe e PKC412 reduz a viabilidade celular *in vitro* de células totais de medula óssea com a mutação KIT^{K509I} . Viabilidade celular avaliada pela técnica de MTT: células totais de medula óssea dos casos 1 e 2 foram submetidas a tratamento com veículo apenas (DMSO, controle), imatinibe (5µM), dasatinibe (80nM) ou PKC412 (100nM), como indicado na figura. A viabilidade celular foi determinada nos dias 4, 8 e 12 de tratamento, e normalizada pelas células controle. Os resultados são mostrados como média $\pm$ desvio padrão de seis replicatas comparadas às células controle do mesmo dia de cultura; * $p < .05$; ** $p < .01$; teste t de *Student*.

O tratamento com mesilato de imatinibe resultou em aumento da apoptose, avaliada por citometria de fluxo com Anexina V/PI, nos dias 8 e 12 de cultura em ambas pacientes (todos $p < 0,03$). Houve aumento das taxas de apoptose com dasatinibe no dia 12 de cultura apenas no caso 1 ($p = 0,03$). O tratamento com PKC412 não alterou as taxas de apoptose em relação ao controle (**Figura 24**).

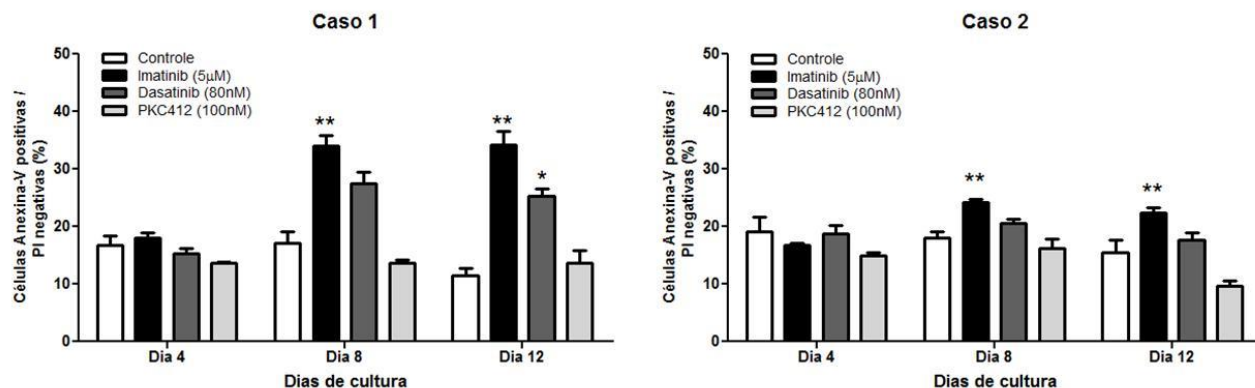


Figura 24. O tratamento com imatinibe induz apoptose *in vitro* de células totais de medula óssea com a mutação KIT^{K509I}. Apoptose avaliada por citometria de fluxo com marcação para Anexina V / PI; as células apoptóticas são representadas pelas células Anexina V positivas / PI negativas. Células totais de medula óssea dos casos 1 e 2 foram submetidas a tratamento com veículo apenas (DMSO, controle), imatinibe (5µM), dasatinibe (80nM) ou PKC412 (100nM), como indicado na figura. A apoptose celular foi determinada nos dias 4, 8 e 12 de tratamento, e normalizada pelas células controle. Os resultados são mostrados como média ± desvio padrão de três replicatas comparadas às células controle do mesmo dia de cultura; * $p < .05$; ** $p < .01$; teste t de Student.

Para estudarmos o efeito dos inibidores de tirosinoquinase utilizados sobre as principais vias de proliferação celular estimuladas por SCF/KIT, avaliamos a ativação de P70S6K, proteína efetora das vias PI3K/AKT/mTOR e MAPK. Extratos proteicos obtidos de células de medula óssea total dos casos 1 e 2 tratadas com veículo apenas (DMSO) ou com mesilato de imatinibe, dasatinibe e PKC412 por 12 dias foram testados para P70S6K total e fosforilada. Foi observada redução da fosforilação de P70S6K para todas as drogas testadas, em ambas pacientes (**Figura 25**).

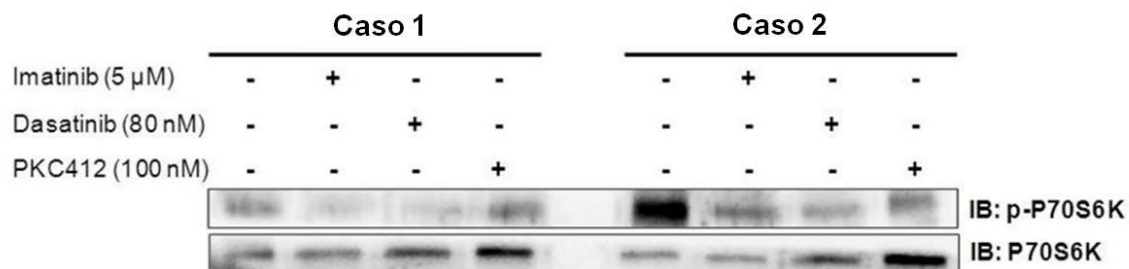


Figura 25. O tratamento com imatinibe, dasatinibe e PKC412 reduz a fosforilação de P70S6K de células totais de medula óssea com a mutação KIT^{K509I}. Extratos proteicos de células totais de medula óssea dos casos 1 e 2 tratadas com veículo apenas, imatinibe (5 μ M), dasatinibe (80nM) ou PKC412 (100nM) por 12 dias foram submetidos a análise por imunoblotting com anticorpos específicos para P70S6K total e fosforilada, como indicado na figura. Observa-se redução na fosforilação de P70S6K após o tratamento com as três drogas testadas.

4.11. O tratamento com mesilato de imatinibe induziu resposta clínica marcante e remissão laboratorial nos dois casos estudados

A partir da definição da ausência da mutação KIT^{D816V}, solicitamos à Novartis® e ao Comitê de Ética da Instituição a aprovação para uso compassivo de imatinibe 400mg via oral ao dia para ambas as pacientes. A aprovação do uso compassivo ocorreu após a conclusão deste trabalho, que, por sua vez, contribuiu para evidenciar um possível benefício dos inibidores de tirosinoquinase na redução da viabilidade celular e no aumento da apoptose em células primárias KIT^{K509I}. Em junho de 2013, foi introduzido tratamento com imatinibe 400mg ao dia, via oral, para os casos 1 e 2. Após três meses de tratamento, ambas pacientes apresentaram melhora marcante do *rash* cutâneo, com clareamento completo da pele, além de redução expressiva na contagem de mastócitos ao mielograma: 1,5% e 0,5% de mastócitos nos casos 1 e 2, respectivamente, sem elementos atípicos. Os níveis de triptase sérica normalizaram após três meses de tratamento com imatinibe: 1,28ug/L e 1,15ug/L nas pacientes 1 e 2, respectivamente. A melhora expressiva do *rash* cutâneo obtida no caso 1 é

ilustrada na **Figura 26**. A paciente do caso 2 também obteve melhora completa da hiperemia cutânea e da característica infiltrativa da pele; porém, como paciente apresenta pele morena, a visualização desta diferença através das figuras é menos evidente (**Figura 27**).

De acordo com os critérios propostos em 2003 para resposta ao tratamento de casos de mastocitose sistêmica agressiva (77), a paciente 1 apresentou remissão completa. A paciente 2 também apresentou resposta clínica expressiva; os critérios de resposta mencionados anteriormente, no entanto, não se aplicam ao caso, sendo específicos para os casos de mastocitose sistêmica agressiva. No momento, após dois anos de seguimento, as pacientes mantêm-se em remissão completa da mastocitose, sem alterações cutâneas, citopenias e visceromegalias, e com contagem normal de mastócitos ao mielograma.



Figura 26. Resposta clínica ao imatinibe obtida no caso 1 três meses após o início do tratamento. (A, C) Rash cutâneo difuso, de característica infiltrativa, observado na paciente 1 ao diagnóstico. (B, D) Clareamento completo da pele três meses após o início do tratamento com mesilato de imatinibe 400mg/dia. Cicatriz mediana resultante da esplenectomia prévia pode ser observada.



Figura 27. Resposta clínica ao imatinibe obtida no caso 2 três meses após o início do tratamento. (A, C) *Rash* cutâneo difuso, de característica infiltrativa, observado na paciente 2 ao diagnóstico. (B, D) Clareamento completo da pele três meses após o início do tratamento com mesilato de imatinibe 400mg/dia.

5. Discussão

5.1. Discussão Subprojeto 1 - IRS2 em neoplasias mieloproliferativas crônicas

Embora as mutações em JAK2, MPL e CALR contribuam para o fenótipo das neoplasias mieloproliferativas crônicas, outras proteínas devem estar envolvidas no aumento da proliferação celular observado nestas doenças. IRS2 medeia a sinalização celular induzida por EPOR e MPL (54, 110), dois importantes receptores diretamente envolvidos na proliferação mieloide, e associa-se com JAK2 em células não hematológicas mediante estímulo extrínseco, como leptina e angiotensina (60, 61). Diante disso, nossa hipótese inicial foi a de que a mutação JAK2^{V617F}, presente em parte significativa dos pacientes com PV, TE e MFP, pudesse desencadear um estímulo constitutivo para a associação entre JAK2 e IRS2 em NMP com JAK2 mutado, contribuindo para o fenótipo de proliferação celular exacerbado observado nestas neoplasias.

Neste trabalho, nós descrevemos que IRS2 se associa a JAK2 na linhagem celular HEL (JAK^{V617F}); no entanto, esta associação não foi observada em células U937 e NB4 (JAK^{WT}). A associação constitutiva JAK2/IRS2 observada em células JAK2-mutadas pode ser justificada pela atividade tirosinoquinase intrínseca desencadeada pela mutação JAK2^{V617F} e por sua capacidade de ativar vias de sinalização intracelulares (9, 111, 112). O fato de não termos detectado esta associação em células U937 e NB4 sugere que um estímulo promovido por citocinas, hormônios, fatores de crescimento ou pela mutação JAK2^{V617F} em si deva ser necessário para o recrutamento de IRS2 mediado por JAK2 em células que apresentam JAK2 selvagem; experimentos futuros utilizando estímulo extrínseco, como eritropoetina, às linhagens U937 e NB4 ajudariam a comprovar esta hipótese. Além disso, para complementação dos resultados de associação JAK2/IRS2 obtidos em linhagens celulares, a realização da técnica de imunoprecipitado em células murinas Ba/F3

expressando JAK2^{V617F} ou JAK2^{WT} agregaria evidências sobre o papel da mutação JAK2^{V617F} na indução da associação JAK2/IRS2.

A associação entre JAK2 e IRS2 pode ocorrer de forma direta ou indireta, a depender da célula estudada. A eritropoetina induz aumento de IRS2 em eritroblastos de pacientes com LMA e na linhagem celular de LMA UT7 (54, 113). IRS2 é capaz de associar-se de forma direta e individual tanto com EPOR (54) como com JAK2 (46, 60, 61). A fosforilação em tirosina de JAK2 pela eritropoetina ou por outros mecanismos leva ao recrutamento de proteínas com domínios SH2 e PTB e inicia a fosforilação em tirosina de vias de sinalização dependentes (114, 115). Desta forma, o domínio PTB de IRS2 pode estar envolvido na interação JAK2/IRS2 de forma direta em células JAK2^{V617F}. Alternativamente, Duan e colaboradores (116) demonstraram que a proteína adaptadora SH2B se liga simultaneamente tanto a JAK2 como a IRS2, promovendo a formação do complexo terciário JAK2/SH2B/IRS2 e a subsequente fosforilação de IRS2 por JAK2. Em outro trabalho, o estímulo com leptina induziu a associação JAK2/IRS2 em células HEK293 expressando o receptor de leptina apenas na presença de SH2B, e a leptina não foi capaz de ativar JAK2 ou IRS2 em ratos SH2B^{-/-} (117), indicando que proteínas adaptadoras também podem participar da interação JAK2/IRS2. Independentemente do mecanismo da associação JAK2/IRS2, demonstramos em nossos resultados que IRS2 é ativada por JAK2, e que sua fosforilação é maior em células HEL quando comparada a células U937.

Corroborando os resultados acima, observamos que a expressão do mRNA de *IRS2* é maior em células CD34⁺ de sangue periférico de pacientes portadores da mutação JAK2^{V617F} em relação àqueles detentores de JAK2 selvagem. Nos pacientes com trombocitemia essencial, os níveis de *IRS2* mostraram-se aumentados em relação aos doadores normais. O fato de a maioria dos pacientes estar em uso de hidroxiureia quando da coleta das amostras representa uma limitação deste estudo, já que os efeitos desta droga

sobre as células estudadas - e particularmente sobre *IRS2* - são desconhecidos; entretanto, uma vez que grande parte dos pacientes em seguimento regular em nossa instituição está em uso de hidroxiureia, a exclusão dos indivíduos em tratamento reduziria muito a coorte de estudo. De qualquer forma, dentro do contexto dos demais experimentos realizados, os estudos de expressão gênica de *IRS2* vão ao encontro dos demais dados e reforçam a participação de *IRS2* nas NMP *JAK2*^{V617F}.

Para entendermos melhor a participação de *IRS2* na proliferação celular e na apoptose em modelos de células leucêmicas, avaliamos o efeito do silenciamento de *IRS2* por lentivírus em linhagens HEL e U937. As células HEL (*JAK2*^{V617F}) silenciadas para *IRS2* apresentaram viabilidade celular e clonogenicidade significativamente diminuídas, como observado pelas técnicas de MTT e formação de colônias. Além disso, células HEL inibidas para *IRS2* apresentaram taxas aumentadas de apoptose. Estes efeitos foram aditivos ao tratamento com ruxolitinibe. Nas células U937 (*JAK2*^{WT}), por outro lado, a inibição de *IRS2* não afetou a viabilidade celular, o crescimento clonal e as taxas de apoptose. As diferenças observadas após a inibição de *IRS2* entre as linhagens HEL e U937 podem ser explicadas pela menor fosforilação em tirosina de *STAT5* observada nas células HEL silenciadas para *IRS2*, mas não nas células U937. Na linhagem HEL, embora a fosforilação de *STAT5* seja reduzida após o tratamento com ruxolitinibe, a inibição de *IRS2* *per se* reduziu p*STAT5*, sugerindo que, nestas células, *STAT5* pode ser ativada de forma *IRS2*-dependente/*JAK2*-independente e de forma *JAK2*-dependente; este duplo mecanismo poderia explicar o efeito aditivo entre a inibição de *IRS2* e o tratamento com ruxolitinibe. Embora *STAT5* seja classicamente uma proteína ativada por *JAK2*, o estímulo com insulina pode induzir a ativação de *STAT5* de maneira independente de *JAK2* (118). Na linhagem de rabdomiossarcoma Kym-1, o tratamento com um inibidor do receptor de insulina aboliu a fosforilação em tirosina de *STAT5*; entretanto, este efeito não foi obtido com o uso de um

inibidor de JAK2 (118). É sabido que a ativação de STAT5 apresenta importante papel anti-apoptótico (31, 119-121) e pode estar envolvida na transformação maligna e na progressão tumoral (119, 122-125). Schafranek e colaboradores mostraram que a perda da atividade de STAT5, e não de JAK2, é crítica para a indução de morte celular em células BCR-ABL1 positivas (126). Recentemente, Weber e colaboradores mostraram que a inibição de STAT5 reduz a sobrevivência de células HEL (127).

Em nossos experimentos, um efeito surpreendente da inibição de IRS2 tanto em células HEL quanto em U937 foi o aumento na expressão de pERK; embora este fato não possa ser explicado neste momento, é possível que se trate de um mecanismo compensatório de outras proteínas sobre a ativação de ERK. Fritsche e colaboradores (128) mostraram, em células HEK293 expressando IR ou IRS2 isoladamente ou em combinação, que níveis elevados da proteína IR isoladamente foram suficientes para a fosforilação de ERK1/2 induzida por insulina. Além disso, outras proteínas adaptadoras, como Shc ou Gab1 (Grb-associated binder-1) podem induzir a ativação de ERK (129-131). O aumento de pERK também foi descrito após inibição farmacológica de IRS1/2 com o inibidor seletivo NT 157; neste trabalho, Reuveni e colaboradores (132) atribuíram o mecanismo de ação da droga ao aumento de pERK, que fosforilaria IRS1/2 em serina, propiciando sua subsequente degradação pelo proteassoma. No entanto, nossos achados após silenciamento de IRS2 por lentivírus sugerem que o aumento de pERK possa ser um efeito secundário da redução de IRS2, mais do que o mecanismo de ação da droga inibidora de IRS2 em si.

Os substratos do receptor de insulina, como mediadores de vias de sinalização de proliferação e sobrevivência celulares, são proteínas potencialmente envolvidas na patogênese do câncer (51, 56, 70-72, 132). A inibição farmacológica de IRS1/2 (compostos NT) foi suficiente para inibir a formação de colônias e a migração de células de melanoma, não afetando melanócitos normais (132). Os mesmos efeitos anti-proliferativos da inibição

farmacológica de IRS1/2 foram observados em células de câncer de próstata (133). Células de tumor de mama deficientes para a expressão de IRS2 são mais sensíveis ao estímulo apoptótico (56, 70, 71). Estes dados, juntamente com as maiores taxas de apoptose e a reduzida viabilidade celular observadas em nosso estudo após inibição de IRS2, reforçam a importância de estudos da participação de IRS2 em neoplasias mieloides.

Até o momento, não foram realizados estudos clínicos em humanos que tenham IRS2 como alvo, e seus efeitos terapêuticos ainda precisam ser explorados. Da mesma forma, os efeitos colaterais da inibição de IRS2 em humanos são desconhecidos. Extrapolando dados observados em modelos de animais *knockout* para *Irs2* (134), é possível que a inibição farmacológica de IRS2 em humanos desencadeie o fenótipo de diabetes mellitus tipo 2, tendo em vista que IRS2 é proteína fundamental na via de sinalização da insulina. Por outro lado, o uso clínico dos inibidores de IRS2 em doses baixas poderia atuar preferencialmente nas vias anormalmente hiperativadas (como JAK^{V617F} , por exemplo), minimizando, assim, seus efeitos colaterais. O real benefício, bem como a tolerabilidade, do uso clínico dos inibidores farmacológicos de IRS2 em NMP precisam ser mais bem avaliados através de novos estudos com modelos animais, e, subsequentemente, com estudos clínicos de fases 1 e 2.

Nossos dados indicam que IRS2 se liga a JAK2 em neoplasias mieloproliferativas, e que esta associação poderia ser induzida pelo estímulo constitutivo da mutação $JAK2^{V617F}$. Nossos resultados sugerem que a associação JAK2/IRS2 possa estar envolvida em mecanismos anti- apoptóticos nestas doenças. O efeito aditivo entre a inibição de IRS2 e o tratamento com ruxolitinibe reforça o potencial da inibição farmacológica conjunta de IRS2 e JAK2.

Os resultados gerados no subprojeto 1 deram origem a dois manuscritos: o primeiro já publicado (**Anexo V**) e o segundo em processo de submissão (**Anexo VI**).

5.2. Discussão Subprojeto 2 - Mutações de *KIT* em mastocitose sistêmica familiar

Durante a investigação etiológica de um caso de mastocitose sistêmica familiar de nosso ambulatório, nosso estudo identificou a mutação germinativa KIT^{K509I} no gene *KIT*. O fato de esta mutação estar presente no caso 1, mas seus pais possuírem *KIT* selvagem, indica que a mutação germinativa KIT^{K509I} foi adquirida *de novo* pela paciente 1 durante a fase embrionária, sendo subsequentemente transmitida para sua filha (caso 2). Zhang e colaboradores (135) descreveram inicialmente a mutação KIT^{K509I} em 2006, em uma família com mastocitose sistêmica, em que a mutação estava presente exclusivamente nos indivíduos doentes. Além disso, eles não observaram esta mutação em um rastreamento em 217 indivíduos normais, sugerindo que KIT^{K509I} se trata de uma mutação, e não de um polimorfismo não descrito. Mais recentemente, Chan e colaboradores caracterizaram as células KIT^{K509I} como células de fenótipo bem diferenciado, com proliferação, granulação e ativação aumentadas (136).

Uma vez que a mastocitose é desencadeada predominantemente pela ativação tirosinoquinase constitutiva de *KIT*, os inibidores de tirosinoquinase são os tratamentos de escolha nestas neoplasias; no entanto, a resposta clínica a estes compostos é variável e está associada à mutação encontrada e à alteração conformacional que eles provocam, afetando ou não o sítio de ligação à droga. Zermati e colaboradores (95) demonstraram que o imatinibe pode inibir a atividade tirosinoquinase de *KIT* selvagem, mas não de *KIT* com a mutação KIT^{D816V} . Nos casos com esta mutação, outros estudos evidenciaram que, embora o dasatinibe apresente atividade *in vitro* contra as células KIT^{D816V} , não houve resposta significativa no tratamento dos pacientes com KIT^{D816V} (95, 137-139). O inibidor de tirosinoquinase PKC412 também apresenta efeitos inibitórios *in vitro* nas células KIT^{D816V} (140), mas as respostas clínicas foram variáveis e não está claro quais grupos de pacientes com mastocitose seriam beneficiados pelo tratamento (80).

Em virtude da heterogeneidade da resposta a drogas nos pacientes com mastocitose, nós avaliamos a sensibilidade das células KIT^{K509I} primárias das pacientes a três inibidores tirosinoquinase. Nossos experimentos evidenciaram redução da ativação da proteína P70S6K, classicamente ativada pelas vias PI3K/Akt/mTOR e MAPK (141), após o tratamento *in vitro* com imatinibe, dasatinibe e PKC412, sugerindo que os compostos testados são capazes de reduzir a proliferação destas células induzida por KIT. Em nossos estudos, imatinibe, dasatinibe e PKC412 foram capazes de induzir a apoptose e reduzir a viabilidade das células com a mutação KIT^{K509I}. Entretanto, os efeitos *in vitro* sobre a apoptose e a viabilidade celular foram mais consistentes com o uso do imatinibe. Algumas hipóteses podem ser levantadas em relação às diferenças na eficácia das drogas testadas: (1) a mutação KIT^{K509I} poderia alterar o sítio de ligação às drogas, como descrito para outras mutações (95, 138, 142, 143); (2) diferenças nas potências das drogas para as doses testadas; (3) ativação de vias alternativas de proliferação celular não afetadas por todas as drogas. Ainda que nas amostras de medula óssea avaliadas houvesse predomínio de mastócitos e que se trate de mutação germinativa, ou seja, que acomete todas as células hematopoéticas, os efeitos do tratamento com os inibidores de tirosinoquinase poderiam ser mais bem avaliados em mastócitos purificados. No entanto, em virtude de dificuldades técnicas na seleção por citometria de fluxo e limitações de tamanho das amostras (células primárias de medula óssea), não pudemos realizar os estudos funcionais em mastócitos neoplásicos purificados. A resposta clínica marcante das pacientes com o uso de imatinibe, entretanto, corrobora nossos resultados *in vitro*.

Estudos recentes descreveram que lesões genéticas adicionais podem estar presentes em pacientes com mastocitose (97, 98). Alterações genéticas ou epigenéticas associadas a mutações em *KIT* podem ser capazes de alterar a susceptibilidade a certas

drogas (97, 98). Nas pacientes estudadas, não observamos mutações nas regiões mais frequentemente mutadas (*hotspots*) de *TET2*, *DNMT3A*, *ASXL1* e *SF3B1*.

O tratamento com imatinibe induziu boa resposta clínica nas duas pacientes estudadas, com melhora completa do quadro cutâneo, além de reduzir os níveis de triptase sérica e reverter a infiltração maciça por mastócitos na medula óssea presente ao diagnóstico. Uma boa resposta clínica nos pacientes com mastocitose sistêmica com *KIT*^{K509I} tratados com imatinibe também foi observada por Zhang e colaboradores (135), colocando esta droga como boa terapia de primeira linha para os casos de mastocitose sistêmica com esta mutação.

A identificação de mutações específicas em *KIT* em pacientes com mastocitose familiar, bem como a avaliação da sensibilidade das células mutadas aos inibidores de tirosinoquinase disponíveis, contribuem para a melhor compreensão dos mecanismos da doença e para a definição de propostas terapêuticas. Embora rara, o rastreamento da mutação *KIT*^{K509I} deve ser considerado em todos os casos de mastocitose sistêmica familiar.

Os resultados gerados no subprojeto 2 resultaram na publicação de um manuscrito (**Anexo VII**).

6. Conclusões

6.1. Conclusões Subprojeto 1 - IRS2 e as neoplasias mieloproliferativas crônicas

Em células HEL JAK2^{V617F}, mas não em células U937 JAK2^{WT}: IRS2 interage com JAK2, e o silenciamento de IRS2 inibe a fosforilação de STAT5, reduz a viabilidade celular e apresenta efeitos pró- apoptóticos, com efeitos aditivos ao ruxolitinibe. A expressão de *IRS2* é significativamente elevada em pacientes com NMP JAK2^{V617F} comparados a JAK2^{WT}. Estes dados indicam a participação de IRS2 na via de sinalização JAK2^{V617F} e a relevância funcional de IRS2 nos mecanismos de sobrevivência celular nestas células. No conceito de terapia com múltiplos alvos, o silenciamento de IRS2 é potencial alvo terapêutico e pode potencializar os efeitos de ruxolitinibe em NMP JAK2^{V617F}.

6.2. Conclusões Subprojeto 2 - Mastocitose sistêmica familiar e as mutações em *KIT*

A mutação KIT^{K509I} está associada a mastocitose sistêmica familiar com fenótipo de mastócitos bem diferenciados. As células mutadas para KIT^{K509I} apresentam sensibilidade *in vitro* ao tratamento com imatinibe, dasatinibe e PKC412. O imatinibe apresentou maior redução de viabilidade celular e indução de apoptose *in vitro*, além de apresentar expressiva resposta clínica nos pacientes tratados. Embora rara, a mutação KIT^{K509I} deve ser considerada e pesquisada nos casos de mastocitose sistêmica familiar.

7. Referências

1. Swerdlow SH, Campo, E., Harris, N.L., Jaffe, E.S., Pileri, S.A., Stein, H., Thiele, J., Vardiman, J.W. WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. 4th ed: WHO Press 2008.
2. Vainchenker W, Delhommeau F, Constantinescu SN, Bernard OA. New mutations and pathogenesis of myeloproliferative neoplasms. *Blood*. 2011 Aug 18;118(7):1723-35.
3. Campbell PJ, Green AR. The myeloproliferative disorders. *N Engl J Med*. 2006 Dec 7;355(23):2452-66.
4. Delhommeau F, Pisani DF, James C, Casadevall N, Constantinescu S, Vainchenker W. Oncogenic mechanisms in myeloproliferative disorders. *Cell Mol Life Sci*. 2006 Dec;63(24):2939-53.
5. Vardiman JW, Arber DA, Le Beau MM, Porwit A, Bloomfield CD, Tefferi A, Thiele J, . Introduction and overview of the classification of the myeloid neoplasms. In: Swerdlow SH, Harris N, Jaffe ES, Pileri SA, Stein H, Thiele J, Vardiman JW, ed. WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. 4th ed. Lyon: International Agency for Research on Cancer (IARC), 2008:18-30.
6. Tefferi A, Barbui T. Polycythemia vera and essential thrombocythemia: 2015 update on diagnosis, risk-stratification and management. *Am J Hematol*. 2015 Feb;90(2):162-73.
7. Gotlib J. JAK inhibition in the myeloproliferative neoplasms: lessons learned from the bench and bedside. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2013;2013:529-37.
8. Thoennissen NH, Krug UO, Lee DH, Kawamata N, Iwanski GB, Lasho T, et al. Prevalence and prognostic impact of allelic imbalances associated with leukemic transformation of Philadelphia chromosome-negative myeloproliferative neoplasms. *Blood*. 2010 Apr 8;115(14):2882-90.
9. Baxter EJ, Scott LM, Campbell PJ, East C, Fourouclas N, Swanton S, et al. Acquired mutation of the tyrosine kinase JAK2 in human myeloproliferative disorders. *Lancet*. 2005 Mar 19-25;365(9464):1054-61.
10. Scott LM, Tong W, Levine RL, Scott MA, Beer PA, Stratton MR, et al. JAK2 exon 12 mutations in polycythemia vera and idiopathic erythrocytosis. *N Engl J Med*. 2007 Feb 1;356(5):459-68.

11. Pietra D, Li S, Brisci A, Passamonti F, Rumi E, Theocharides A, et al. Somatic mutations of JAK2 exon 12 in patients with JAK2 (V617F)-negative myeloproliferative disorders. *Blood*. 2008 Feb 1;111(3):1686-9.
12. Cervantes F, Alvarez-Larran A, Arellano-Rodrigo E, Granell M, Domingo A, Montserrat E. Frequency and risk factors for thrombosis in idiopathic myelofibrosis: analysis in a series of 155 patients from a single institution. *Leukemia*. 2006 Jan;20(1):55-60.
13. Barbui T, Carobbio A, Cervantes F, Vannucchi AM, Guglielmelli P, Antonioli E, et al. Thrombosis in primary myelofibrosis: incidence and risk factors. *Blood*. 2010 Jan 28;115(4):778-82.
14. Passamonti F, Rumi E, Arcaini L, Boveri E, Elena C, Pietra D, et al. Prognostic factors for thrombosis, myelofibrosis, and leukemia in essential thrombocythemia: a study of 605 patients. *Haematologica*. 2008 Nov;93(11):1645-51.
15. Barbui T, Thiele J, Passamonti F, Rumi E, Boveri E, Randi ML, et al. Initial bone marrow reticulin fibrosis in polycythemia vera exerts an impact on clinical outcome. *Blood*. 2012 Mar 8;119(10):2239-41.
16. Wilks AF. Two putative protein-tyrosine kinases identified by application of the polymerase chain reaction. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1989 Mar;86(5):1603-7.
17. Santos FP, Verstovsek S. JAK2 inhibitors: what's the true therapeutic potential? *Blood Rev*. 2011 Mar;25(2):53-63.
18. Leonard WJ, O'Shea JJ. Jaks and STATs: biological implications. *Annu Rev Immunol*. 1998;16:293-322.
19. Winston LA, Hunter T. JAK2, Ras, and Raf are required for activation of extracellular signal-regulated kinase/mitogen-activated protein kinase by growth hormone. *J Biol Chem*. 1995 Dec 29;270(52):30837-40.
20. Mizuguchi R, Noto S, Yamada M, Ashizawa S, Higashi H, Hatakeyama M. Ras and signal transducer and activator of transcription (STAT) are essential and sufficient downstream components of Janus kinases in cell proliferation. *Jpn J Cancer Res*. 2000 May;91(5):527-33.
21. Al-Shami A, Naccache PH. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor-activated signaling pathways in human neutrophils. Involvement of Jak2 in the stimulation of phosphatidylinositol 3-kinase. *J Biol Chem*. 1999 Feb 26;274(9):5333-8.

22. Bouscary D, Pene F, Claessens YE, Muller O, Chretien S, Fontenay-Roupie M, et al. Critical role for PI 3-kinase in the control of erythropoietin-induced erythroid progenitor proliferation. *Blood*. 2003 May 1;101(9):3436-43.
23. Giordanetto F, Kroemer RT. Prediction of the structure of human Janus kinase 2 (JAK2) comprising JAK homology domains 1 through 7. *Protein Eng*. 2002 Sep;15(9):727-37.
24. Saharinen P, Silvennoinen O. The pseudokinase domain is required for suppression of basal activity of Jak2 and Jak3 tyrosine kinases and for cytokine-inducible activation of signal transduction. *J Biol Chem*. 2002 Dec 6;277(49):47954-63.
25. James C, Ugo V, Le Couedic JP, Staerk J, Delhommeau F, Lacout C, et al. A unique clonal JAK2 mutation leading to constitutive signalling causes polycythaemia vera. *Nature*. 2005 Apr 28;434(7037):1144-8.
26. Levine RL, Wadleigh M, Cools J, Ebert BL, Wernig G, Huntly BJ, et al. Activating mutation in the tyrosine kinase JAK2 in polycythemia vera, essential thrombocythemia, and myeloid metaplasia with myelofibrosis. *Cancer Cell*. 2005 Apr;7(4):387-97.
27. Kamishimoto J, Tago K, Kasahara T, Funakoshi-Tago M. Akt activation through the phosphorylation of erythropoietin receptor at tyrosine 479 is required for myeloproliferative disorder-associated JAK2 V617F mutant-induced cellular transformation. *Cell Signal*. 2011 May;23(5):849-56.
28. Kralovics R, Passamonti F, Buser AS, Teo SS, Tiedt R, Passweg JR, et al. A gain-of-function mutation of JAK2 in myeloproliferative disorders. *N Engl J Med*. 2005 Apr 28;352(17):1779-90.
29. Ugo V, Marzac C, Teyssandier I, Larbret F, Lecluse Y, Debili N, et al. Multiple signaling pathways are involved in erythropoietin-independent differentiation of erythroid progenitors in polycythemia vera. *Exp Hematol*. 2004 Feb;32(2):179-87.
30. Witthuhn BA, Quelle FW, Silvennoinen O, Yi T, Tang B, Miura O, et al. JAK2 associates with the erythropoietin receptor and is tyrosine phosphorylated and activated following stimulation with erythropoietin. *Cell*. 1993 Jul 30;74(2):227-36.
31. Socolovsky M, Fallon AE, Wang S, Brugnara C, Lodish HF. Fetal anemia and apoptosis of red cell progenitors in Stat5a^{-/-}5b^{-/-} mice: a direct role for Stat5 in Bcl-X(L) induction. *Cell*. 1999 Jul 23;98(2):181-91.
32. Myklebust JH, Blomhoff HK, Rusten LS, Stokke T, Smeland EB. Activation of phosphatidylinositol 3-kinase is important for erythropoietin-induced erythropoiesis from CD34(+) hematopoietic progenitor cells. *Exp Hematol*. 2002 Sep;30(9):990-1000.

33. Larsen TS, Pallisgaard N, Moller MB, Hasselbalch HC. The JAK2 V617F allele burden in essential thrombocythemia, polycythemia vera and primary myelofibrosis--impact on disease phenotype. *European journal of haematology*. 2007 Dec;79(6):508-15.
34. Koren-Michowitz M LJ, Cohen Y, Rahimi-Levene N, Salomon O, Michael M, Amariglio N, Nagler A. JAK2V617F allele burden is associated with transformation to myelofibrosis. *Leuk Lymphoma*. 2012;53(11):2210-3.
35. Stein BL, Crispino JD, Moliterno AR. Janus kinase inhibitors: an update on the progress and promise of targeted therapy in the myeloproliferative neoplasms. *Current opinion in oncology*. Nov;23(6):609-16.
36. Larsen TS, Christensen JH, Hasselbalch HC, Pallisgaard N. The JAK2 V617F mutation involves B- and T-lymphocyte lineages in a subgroup of patients with Philadelphia-chromosome negative chronic myeloproliferative disorders. *Br J Haematol*. 2007 Mar;136(5):745-51.
37. Anand S, Stedham F, Gudgin E, Campbell P, Beer P, Green AR, et al. Increased basal intracellular signaling patterns do not correlate with JAK2 genotype in human myeloproliferative neoplasms. *Blood*. 2011 Aug 11;118(6):1610-21.
38. Pardanani AD, Levine RL, Lasho T, Pikman Y, Mesa RA, Wadleigh M, et al. MPL515 mutations in myeloproliferative and other myeloid disorders: a study of 1182 patients. *Blood*. 2006 Nov 15;108(10):3472-6.
39. Pikman Y, Lee BH, Mercher T, McDowell E, Ebert BL, Gozo M, et al. MPLW515L is a novel somatic activating mutation in myelofibrosis with myeloid metaplasia. *PLoS Med*. 2006 Jul;3(7):e270.
40. Nangalia J, Massie CE, Baxter EJ, Nice FL, Gundem G, Wedge DC, et al. Somatic CALR mutations in myeloproliferative neoplasms with nonmutated JAK2. *N Engl J Med*. 2013 Dec 19;369(25):2391-405.
41. Chi J, Nicolaou KA, Nicolaidou V, Koumas L, Mitsidou A, Pierides C, et al. Calreticulin gene exon 9 frameshift mutations in patients with thrombocytosis. *Leukemia*. 2014 May;28(5):1152-4.
42. Gibson SE, Schade AE, Szpurka H, Bak B, Maciejewski JP, Hsi ED. Phospho-STAT5 expression pattern with the MPL W515L mutation is similar to that seen in chronic myeloproliferative disorders with JAK2 V617F. *Hum Pathol*. 2008 Jul;39(7):1111-4.

43. Klampfl T, Gisslinger H, Harutyunyan AS, Nivarthi H, Rumi E, Milosevic JD, et al. Somatic mutations of calreticulin in myeloproliferative neoplasms. *N Engl J Med*. 2013 Dec 19;369(25):2379-90.
44. Nangalia J, Green, T.R. The evolving genomic landscape of myeloproliferative neoplasms. In: Anderson KC, Bauer K.A., Tallman, M.S., Crowther, M. A., ed. American Society of Hematology Education Program. Washington, DC, 2014:287-96.
45. Saltiel AR, Kahn CR. Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism. *Nature*. 2001 Dec 13;414(6865):799-806.
46. Velloso LA, Folli F, Perego L, Saad MJ. The multi-faceted cross-talk between the insulin and angiotensin II signaling systems. *Diabetes Metab Res Rev*. 2006 Mar-Apr;22(2):98-107.
47. Saad MJ, Carvalho CR, Thirone AC, Velloso LA. Insulin induces tyrosine phosphorylation of JAK2 in insulin-sensitive tissues of the intact rat. *J Biol Chem*. 1996 Sep 6;271(36):22100-4.
48. Velloso LA, Carvalho CR, Rojas FA, Folli F, Saad MJ. Insulin signalling in heart involves insulin receptor substrates-1 and -2, activation of phosphatidylinositol 3-kinase and the JAK 2-growth related pathway. *Cardiovasc Res*. 1998 Oct;40(1):96-102.
49. Patti ME, Sun XJ, Bruening JC, Araki E, Lipes MA, White MF, et al. 4PS/insulin receptor substrate (IRS)-2 is the alternative substrate of the insulin receptor in IRS-1-deficient mice. *J Biol Chem*. 1995 Oct 20;270(42):24670-3.
50. Yenush L, White MF. The IRS-signalling system during insulin and cytokine action. *Bioessays*. 1997 Jun;19(6):491-500.
51. Dearth RK, Cui X, Kim HJ, Hadsell DL, Lee AV. Oncogenic transformation by the signaling adaptor proteins insulin receptor substrate (IRS)-1 and IRS-2. *Cell Cycle*. 2007 Mar 15;6(6):705-13.
52. Argetsinger LS, Norstedt G, Billestrup N, White MF, Carter-Su C. Growth hormone, interferon-gamma, and leukemia inhibitory factor utilize insulin receptor substrate-2 in intracellular signaling. *J Biol Chem*. 1996 Nov 15;271(46):29415-21.
53. White MF, Kahn CR. The insulin signaling system. *J Biol Chem*. 1994 Jan 7;269(1):1-4.
54. Verdier F, Chretien S, Billat C, Gisselbrecht S, Lacombe C, Mayeux P. Erythropoietin induces the tyrosine phosphorylation of insulin receptor substrate-2. An alternate pathway for

erythropoietin-induced phosphatidylinositol 3-kinase activation. *J Biol Chem.* 1997 Oct 17;272(42):26173-8.

55. Johnston JA, Wang LM, Hanson EP, Sun XJ, White MF, Oakes SA, 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. *J Biol Chem.* 1995 Dec 1;270(48):28527-30.

56. Gibson SL, Ma Z, Shaw LM. Divergent roles for IRS-1 and IRS-2 in breast cancer metastasis. *Cell Cycle.* 2007 Mar 15;6(6):631-7.

57. Sun XJ, Wang LM, Zhang Y, Yenush L, Myers MG, Jr., Glasheen E, et al. Role of IRS-2 in insulin and cytokine signalling. *Nature.* 1995 Sep 14;377(6545):173-7.

58. Uddin S, Yenush L, Sun XJ, Sweet ME, White MF, Platanias LC. Interferon-alpha engages the insulin receptor substrate-1 to associate with the phosphatidylinositol 3'-kinase. *J Biol Chem.* 1995 Jul 7;270(27):15938-41.

59. Platanias LC, Uddin S, Yetter A, Sun XJ, White MF. The type I interferon receptor mediates tyrosine phosphorylation of insulin receptor substrate 2. *J Biol Chem.* 1996 Jan 5;271(1):278-82.

60. Velloso LA, Folli F, Sun XJ, White MF, Saad MJ, Kahn CR. Cross-talk between the insulin and angiotensin signaling systems. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1996 Oct 29;93(22):12490-5.

61. Carnevali JB, Ribeiro EB, Folli F, Velloso LA, Saad MJ. Interaction between leptin and insulin signaling pathways differentially affects JAK-STAT and PI 3-kinase-mediated signaling in rat liver. *Biol Chem.* 2003 Jan;384(1):151-9.

62. Saad MJ, Velloso LA, Carnevali CR. Angiotensin II induces tyrosine phosphorylation of insulin receptor substrate 1 and its association with phosphatidylinositol 3-kinase in rat heart. *Biochem J.* 1995 Sep 15;310 (Pt 3):741-4.

63. Folli F, Kahn CR, Hansen H, Bouchie JL, Feener EP. Angiotensin II inhibits insulin signaling in aortic smooth muscle cells at multiple levels. A potential role for serine phosphorylation in insulin/angiotensin II crosstalk. *J Clin Invest.* 1997 Nov 1;100(9):2158-69.

64. Zhao J, Xu Y, Zong Y, Zhang S, Song Y, Yu K, et al. Inhibition of Stat3 expression induces apoptosis and suppresses proliferation in human leukemia HL-60 cells. *Hematology.* 2011 Jul;16(4):232-5.

65. Fuhler GM, Drayer AL, Vellenga E. Decreased phosphorylation of protein kinase B and extracellular signal-regulated kinase in neutrophils from patients with myelodysplasia. *Blood.* 2003 Feb 1;101(3):1172-80.

66. Ratajczak J, Zhang Q, Pertusini E, Wojczyk BS, Wasik MA, Ratajczak MZ. The role of insulin (INS) and insulin-like growth factor-I (IGF-I) in regulating human erythropoiesis. Studies in vitro under serum-free conditions--comparison to other cytokines and growth factors. *Leukemia*. 1998 Mar;12(3):371-81.
67. Zumkeller W, Burdach S. The insulin-like growth factor system in normal and malignant hematopoietic cells. *Blood*. 1999 Dec 1;94(11):3653-7.
68. Tamburini J, Elie C, Bardet V, Chapuis N, Park S, Broet P, et al. Constitutive phosphoinositide 3-kinase/Akt activation represents a favorable prognostic factor in de novo acute myelogenous leukemia patients. *Blood*. 2007 Aug 1;110(3):1025-8.
69. Chapuis N, Tamburini J, Cornillet-Lefebvre P, Gillot L, Bardet V, Willems L, 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*. 2010 Mar;95(3):415-23.
70. Nagle JA, Ma Z, Byrne MA, White MF, Shaw LM. Involvement of insulin receptor substrate 2 in mammary tumor metastasis. *Mol Cell Biol*. 2004 Nov;24(22):9726-35.
71. Traina F, Carnevali JB, Saad MJ, Costa FF, Saad ST. BCR-ABL binds to IRS-1 and IRS-1 phosphorylation is inhibited by imatinib in K562 cells. *FEBS Lett*. 2003 Jan 30;535(1-3):17-22.
72. Machado-Neto JA, Favaro P, Lazarini M, Costa FF, Olalla Saad ST, Traina F. Knockdown of insulin receptor substrate 1 reduces proliferation and downregulates Akt/mTOR and MAPK pathways in K562 cells. *Biochim Biophys Acta*. 2011 Aug;1813(8):1404-11.
73. Garcia-Montero AC, Jara-Acevedo M, Teodosio C, Sanchez ML, Nunez R, Prados A, et al. KIT mutation in mast cells and other bone marrow hematopoietic cell lineages in systemic mast cell disorders: a prospective study of the Spanish Network on Mastocytosis (REMA) in a series of 113 patients. *Blood*. 2006 Oct 1;108(7):2366-72.
74. Sanchez-Munoz L, Alvarez-Twose I, Garcia-Montero AC, Teodosio C, Jara-Acevedo M, Pedreira CE, et al. Evaluation of the WHO criteria for the classification of patients with mastocytosis. *Mod Pathol*. 2011 Sep;24(9):1157-68.
75. Valent P, Horny HP, Escribano L, Longley BJ, Li CY, Schwartz LB, et al. Diagnostic criteria and classification of mastocytosis: a consensus proposal. *Leuk Res*. 2001 Jul;25(7):603-25.

76. Escribano L, Akin C, Castells M, Orfao A, Metcalfe DD. Mastocytosis: current concepts in diagnosis and treatment. *Ann Hematol.* 2002 Dec;81(12):677-90.
77. Valent P, Akin C, Sperr WR, Escribano L, Arock M, Horny HP, et al. Aggressive systemic mastocytosis and related mast cell disorders: current treatment options and proposed response criteria. *Leuk Res.* 2003 Jul;27(7):635-41.
78. Horny HP MD, Bennet JM, Bain BJ. Mastocytosis. In: Swerdlow SH CE, Harris NL, Jaffe ES, Pileri SA, Stein H, Thiele J, Vardiman JW, ed. *WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues.* Lyon, 2008:54-63.
79. Georgin-Lavialle S, Lhermitte L, Dubreuil P, Chandesris MO, Hermine O, Damaj G. Mast cell leukemia. *Blood.* 2013 Feb 21;121(8):1285-95.
80. Pardanani A. Systemic mastocytosis in adults: 2013 update on diagnosis, risk stratification, and management. *Am J Hematol.* 2013 Jul;88(7):612-24.
81. Fowler JF, Jr., Parsley WM, Cotter PG. Familial urticaria pigmentosa. *Arch Dermatol.* 1986 Jan;122(1):80-1.
82. Clark DP, Buescher L, Havey A. Familial urticaria pigmentosa. *Arch Intern Med.* 1990 Aug;150(8):1742-4.
83. Oku T, Hashizume H, Yokote R, Sano T, Yamada M. The familial occurrence of bullous mastocytosis (diffuse cutaneous mastocytosis). *Arch Dermatol.* 1990 Nov;126(11):1478-84.
84. Anstey A, Lowe DG, Kirby JD, Horton MA. Familial mastocytosis: a clinical, immunophenotypic, light and electron microscopic study. *Br J Dermatol.* 1991 Dec;125(6):583-7.
85. Chang A, Tung RC, Schlesinger T, Bergfeld WF, Dijkstra J, Kahn TA. Familial cutaneous mastocytosis. *Pediatr Dermatol.* 2001 Jul-Aug;18(4):271-6.
86. Hartmann K, Wardelmann E, Ma Y, Merkelbach-Bruse S, Preussner LM, Woolery C, et al. Novel germline mutation of KIT associated with familial gastrointestinal stromal tumors and mastocytosis. *Gastroenterology.* 2005 Sep;129(3):1042-6.
87. Wasag B, Niedoszytko M, Piskorz A, Lange M, Renke J, Jassem E, et al. Novel, activating KIT-N822I mutation in familial cutaneous mastocytosis. *Exp Hematol.* 2011 Aug;39(8):859-65 e2.
88. Kunstlinger H, Huss S, Merkelbach-Bruse S, Binot E, Kleine MA, Loeser H, et al. Gastrointestinal stromal tumors with KIT exon 9 mutations: Update on genotype-phenotype

correlation and validation of a high-resolution melting assay for mutational testing. *Am J Surg Pathol*. 2013 Nov;37(11):1648-59.

89. Zanotti R, Simioni L, Garcia-Montero AC, Perbellini O, Bonadonna P, Caruso B, et al. Somatic D816V KIT mutation in a case of adult-onset familial mastocytosis. *J Allergy Clin Immunol*. 2013 Feb;131(2):605-7.

90. Ning ZQ, Li J, Arceci RJ. Signal transducer and activator of transcription 3 activation is required for Asp(816) mutant c-Kit-mediated cytokine-independent survival and proliferation in human leukemia cells. *Blood*. 2001 Jun 1;97(11):3559-67.

91. Rottapel R, Reedijk M, Williams DE, Lyman SD, Anderson DM, Pawson T, et al. The Steel/W transduction pathway: kit autophosphorylation and its association with a unique subset of cytoplasmic signaling proteins is induced by the Steel factor. *Mol Cell Biol*. 1991 Jun;11(6):3043-51.

92. Linnekin D. Early signaling pathways activated by c-Kit in hematopoietic cells. *Int J Biochem Cell Biol*. 1999 Oct;31(10):1053-74.

93. Nagata H, Worobec AS, Oh CK, Chowdhury BA, Tannenbaum S, Suzuki Y, et al. Identification of a point mutation in the catalytic domain of the protooncogene c-kit in peripheral blood mononuclear cells of patients who have mastocytosis with an associated hematologic disorder. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1995 Nov 7;92(23):10560-4.

94. Akin C, Brockow K, D'Ambrosio C, Kirshenbaum AS, Ma Y, Longley BJ, et al. Effects of tyrosine kinase inhibitor STI571 on human mast cells bearing wild-type or mutated c-kit. *Exp Hematol*. 2003 Aug;31(8):686-92.

95. Zermati Y, De Sepulveda P, Feger F, Letard S, Kersual J, Casteran N, et al. Effect of tyrosine kinase inhibitor STI571 on the kinase activity of wild-type and various mutated c-kit receptors found in mast cell neoplasms. *Oncogene*. 2003 Feb 6;22(5):660-4.

96. Ustun C, DeRemer DL, Akin C. Tyrosine kinase inhibitors in the treatment of systemic mastocytosis. *Leuk Res*. 2011 Sep;35(9):1143-52.

97. Traina F, Visconte V, Jankowska AM, Makishima H, O'Keefe CL, Elson P, et al. Single nucleotide polymorphism array lesions, TET2, DNMT3A, ASXL1 and CBL mutations are present in systemic mastocytosis. *PLoS One*. 2012;7(8):e43090.

98. Schwaab J, Schnittger S, Sotlar K, Walz C, Fabarius A, Pffirrmann M, et al. Comprehensive mutational profiling in advanced systemic mastocytosis. *Blood*. 2013 Oct 3;122(14):2460-6.

99. Lanotte M, Martin-Thouvenin V, Najman S, Balerini P, Valensi F, Berger R. NB4, a maturation inducible cell line with t(15;17) marker isolated from a human acute promyelocytic leukemia (M3). *Blood*. 1991 Mar 1;77(5):1080-6.
100. Quentmeier H, MacLeod RA, Zaborski M, Drexler HG. JAK2 V617F tyrosine kinase mutation in cell lines derived from myeloproliferative disorders. *Leukemia*. 2006 Mar;20(3):471-6.
101. ATCC. U-937 (ATCC® CRL-1593.2™). 2014 [cited; Available from: <http://www.atcc.org/Products/All/CRL-1593.2.aspx>
102. ATTC. HEL 92.1.7 (ATCC® TIB-180™). 2014.
103. Quintas-Cardama A, Vaddi K, Liu P, Manshoury T, Li J, Scherle PA, et al. Preclinical characterization of the selective JAK1/2 inhibitor INCB018424: therapeutic implications for the treatment of myeloproliferative neoplasms. *Blood*. 2010 Apr 15;115(15):3109-17.
104. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods*. 2001 Dec;25(4):402-8.
105. Traina F, Visconte V, Elson P, Tabarroki A, Jankowska AM, Hasrouni E, et al. Impact of molecular mutations on treatment response to DNMT inhibitors in myelodysplasia and related neoplasms. *Leukemia*. 2014 Jan;28(1):78-87.
106. Passamonti F, Cervantes F, Vannucchi AM, Morra E, Rumi E, Pereira A, et al. A dynamic prognostic model to predict survival in primary myelofibrosis: a study by the IWG-MRT (International Working Group for Myeloproliferative Neoplasms Research and Treatment). *Blood*. 2010 Mar 4;115(9):1703-8.
107. Vardiman JW BR, Arber DA, Le Beau MM, Porwit A, Bloomfield CD, Tefferi A, Thiele J. Mastocytosis. In: Horny HP MD, Bennett JM, Bain BJ, Akin C, Escibano L, Valent P, ed. *WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues*. 4th ed. Lyon: International Agency for Research on Cancer (IARC), 2008:54-63.
108. Akin C EL, Nuñez R, Garcia-Montero A, Angulo M, Orfao A, Metcalfe DD. Well-differentiated systemic mastocytosis: A new disease variant with mature mast cell phenotype and lack of codon 816 c-Kit mutations. *J Allergy Clin Immunol*. 2013;113 (Suppl.):S327.
109. Valent P, Sotlar K, Sperr WR, Escibano L, Yavuz S, Reiter A, et al. Refined diagnostic criteria and classification of mast cell leukemia (MCL) and myelomastocytic leukemia (MML): a consensus proposal. *Ann Oncol*. 2014 Sep;25(9):1691-700.
110. Miyakawa Y, Rojnuckarin P, Habib T, Kaushansky K. Thrombopoietin induces phosphoinositol 3-kinase activation through SHP2, Gab, and insulin receptor substrate

proteins in BAF3 cells and primary murine megakaryocytes. *J Biol Chem*. 2001 Jan 26;276(4):2494-502.

111. O'Shea JJ, Holland SM, Staudt LM. JAKs and STATs in immunity, immunodeficiency, and cancer. *N Engl J Med*. 2013 Jan 10;368(2):161-70.

112. Levine RL, Pardanani A, Tefferi A, Gilliland DG. Role of JAK2 in the pathogenesis and therapy of myeloproliferative disorders. *Nat Rev Cancer*. 2007 Sep;7(9):673-83.

113. Sathyanarayana P, Dev A, Fang J, Houde E, Bogacheva O, Bogachev O, et al. EPO receptor circuits for primary erythroblast survival. *Blood*. 2008 Jun 1;111(11):5390-9.

114. Hercus TR, Thomas D, Guthridge MA, Ekert PG, King-Scott J, Parker MW, et al. The granulocyte-macrophage colony-stimulating factor receptor: linking its structure to cell signaling and its role in disease. *Blood*. 2009 Aug 13;114(7):1289-98.

115. Yamauchi T, Kaburagi Y, Ueki K, Tsuji Y, Stark GR, Kerr IM, et al. Growth hormone and prolactin stimulate tyrosine phosphorylation of insulin receptor substrate-1, -2, and -3, their association with p85 phosphatidylinositol 3-kinase (PI3-kinase), and concomitantly PI3-kinase activation via JAK2 kinase. *J Biol Chem*. 1998 Jun 19;273(25):15719-26.

116. Duan C, Li M, Rui L. SH2-B promotes insulin receptor substrate 1 (IRS1)- and IRS2-mediated activation of the phosphatidylinositol 3-kinase pathway in response to leptin. *J Biol Chem*. 2004 Oct 15;279(42):43684-91.

117. Ren D, Li M, Duan C, Rui L. Identification of SH2-B as a key regulator of leptin sensitivity, energy balance, and body weight in mice. *Cell Metab*. 2005 Aug;2(2):95-104.

118. Storz P, Doppler H, Pfizenmaier K, Muller G. Insulin selectively activates STAT5b, but not STAT5a, via a JAK2-independent signalling pathway in Kym-1 rhabdomyosarcoma cells. *FEBS Lett*. 1999 Dec 31;464(3):159-63.

119. Ma R, Hu J, Huang C, Wang M, Xiang J, Li G. JAK2/STAT5/Bcl-xL signalling is essential for erythropoietin-mediated protection against apoptosis induced in PC12 cells by the amyloid beta-peptide Abeta25-35. *Br J Pharmacol*. 2014 Jul;171(13):3234-45.

120. Yamaura G, Turoczy T, Yamamoto F, Siddiqui MA, Maulik N, Das DK. STAT signaling in ischemic heart: a role of STAT5A in ischemic preconditioning. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2003 Aug;285(2):H476-82.

121. Zhang F, Wang S, Cao G, Gao Y, Chen J. Signal transducers and activators of transcription 5 contributes to erythropoietin-mediated neuroprotection against hippocampal neuronal death after transient global cerebral ischemia. *Neurobiol Dis*. 2007 Jan;25(1):45-53.

122. Warsch W, Kollmann K, Eckelhart E, Fajmann S, Cerny-Reiterer S, Holbl A, et al. High STAT5 levels mediate imatinib resistance and indicate disease progression in chronic myeloid leukemia. *Blood*. 2011 Mar 24;117(12):3409-20.
123. Gressot LV, Doucette TA, Yang Y, Fuller GN, Heimberger AB, Bogler O, et al. Signal transducer and activator of transcription 5b drives malignant progression in a PDGFB-dependent proneural glioma model by suppressing apoptosis. *Int J Cancer*. 2014 Oct 10.
124. Hoelbl A, Schuster C, Kovacic B, Zhu B, Wickre M, Hoelzl MA, et al. Stat5 is indispensable for the maintenance of bcr/abl-positive leukaemia. *EMBO Mol Med*. 2010 Mar;2(3):98-110.
125. Zhang X, Blaskovich MA, Forinash KD, Sebt SM. Withacnistin inhibits recruitment of STAT3 and STAT5 to growth factor and cytokine receptors and induces regression of breast tumours. *Br J Cancer*. 2014 Aug 26;111(5):894-902.
126. Schafranek L, Nievergall E, Powell JA, Hiwase DK, Leclercq T, Hughes TP, et al. Sustained inhibition of STAT5, but not JAK2, is essential for TKI-induced cell death in chronic myeloid leukemia. *Leukemia*. 2015 Jan;29(1):76-85.
127. Weber A, Borghouts C, Brendel C, Moriggl R, Delis N, Brill B, et al. Stat5 Exerts Distinct, Vital Functions in the Cytoplasm and Nucleus of Bcr-Abl+ K562 and Jak2(V617F)+ HEL Leukemia Cells. *Cancers (Basel)*. 2015;7(1):503-37.
128. Fritsche L, Neukamm SS, Lehmann R, Kremmer E, Hennige AM, Hunder-Gugel A, et al. Insulin-induced serine phosphorylation of IRS-2 via ERK1/2 and mTOR: studies on the function of Ser675 and Ser907. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2011 May;300(5):E824-36.
129. Holgado-Madruga M, Emlet DR, Moscatello DK, Godwin AK, Wong AJ. A Grb2-associated docking protein in EGF- and insulin-receptor signalling. *Nature*. 1996 Feb 8;379(6565):560-4.
130. Araki T, Nawa H, Neel BG. Tyrosyl phosphorylation of Shp2 is required for normal ERK activation in response to some, but not all, growth factors. *J Biol Chem*. 2003 Oct 24;278(43):41677-84.
131. Knight T, Irving JA. Ras/Raf/MEK/ERK Pathway Activation in Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia and Its Therapeutic Targeting. *Front Oncol*. 2014;4:160.
132. Reuveni H, Flashner-Abramson E, Steiner L, Makedonski K, Song R, Shir A, et al. Therapeutic destruction of insulin receptor substrates for cancer treatment. *Cancer Res*. 2013 Jul 15;73(14):4383-94.

133. Ibuki N, Ghaffari M, Reuveni H, Pandey M, Fazli L, Azuma H, et al. The tyrphostin NT157 suppresses insulin receptor substrates and augments therapeutic response of prostate cancer. *Mol Cancer Ther.* 2014 Dec;13(12):2827-39.
134. Oliveira JM, Rebuffat SA, Gasa R, Gomis R. Targeting type 2 diabetes: lessons from a knockout model of insulin receptor substrate 2. *Can J Physiol Pharmacol.* 2014 Aug;92(8):613-20.
135. Zhang LY, Smith ML, Schultheis B, Fitzgibbon J, Lister TA, Melo JV, et al. A novel K509I mutation of KIT identified in familial mastocytosis-in vitro and in vivo responsiveness to imatinib therapy. *Leuk Res.* 2006 Apr;30(4):373-8.
136. Chan EC, Bai Y, Kirshenbaum AS, Fischer ER, Simakova O, Bandara G, et al. Mastocytosis associated with a rare germline KIT K509I mutation displays a well-differentiated mast cell phenotype. *J Allergy Clin Immunol.* 2014 Jul;134(1):178-87.
137. Pagano L, Valentini CG, Caira M, Rondoni M, Van Lint MT, Candoni A, et al. Advanced mast cell disease: an Italian Hematological Multicenter experience. *Int J Hematol.* 2008 Dec;88(5):483-8.
138. Schittenhelm MM, Shiraga S, Schroeder A, Corbin AS, Griffith D, Lee FY, et al. Dasatinib (BMS-354825), a dual SRC/ABL kinase inhibitor, inhibits the kinase activity of wild-type, juxtamembrane, and activation loop mutant KIT isoforms associated with human malignancies. *Cancer Res.* 2006 Jan 1;66(1):473-81.
139. Verstovsek S, Tefferi A, Cortes J, O'Brien S, Garcia-Manero G, Pardanani A, et al. Phase II study of dasatinib in Philadelphia chromosome-negative acute and chronic myeloid diseases, including systemic mastocytosis. *Clin Cancer Res.* 2008 Jun 15;14(12):3906-15.
140. Gleixner KV, Mayerhofer M, Aichberger KJ, Derdak S, Sonneck K, Bohm A, et al. PKC412 inhibits in vitro growth of neoplastic human mast cells expressing the D816V-mutated variant of KIT: comparison with AMN107, imatinib, and cladribine (2CdA) and evaluation of cooperative drug effects. *Blood.* 2006 Jan 15;107(2):752-9.
141. Feng LX, Ravindranath N, Dym M. Stem cell factor/c-kit up-regulates cyclin D3 and promotes cell cycle progression via the phosphoinositide 3-kinase/p70 S6 kinase pathway in spermatogonia. *J Biol Chem.* 2000 Aug 18;275(33):25572-6.
142. Gowney JD, Clark JJ, Adelsperger J, Stone R, Fabbro D, Griffin JD, et al. Activation mutations of human c-KIT resistant to imatinib mesylate are sensitive to the tyrosine kinase inhibitor PKC412. *Blood.* 2005 Jul 15;106(2):721-4.

143. Roberts KG, Odell AF, Byrnes EM, Baleato RM, Griffith R, Lyons AB, et al. Resistance to c-KIT kinase inhibitors conferred by V654A mutation. *Mol Cancer Ther.* 2007 Mar;6(3):1159-66.

8. Anexos

Anexo I



**FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA**

 www.fcm.unicamp.br/fcm/pesquisa

CEP, 22/11/11
(Grupo III)

PARECER CEP: Nº 1129/2011 (Este nº deve ser citado nas correspondências referente a este projeto).
CAAE: 1028.0.146.000-11

I - IDENTIFICAÇÃO:

PROJETO: “ESTUDO DAS BASES MOLECULARES DAS NEOPLASIAS MIELOPROLIFERATIVAS CRÔNICAS: NOVAS MUTAÇÕES, INTERAÇÕES PROTÉICAS E SINALIZAÇÃO CELULAR”.

PESQUISADOR RESPONSÁVEL: Paula de Melo Campos

INSTITUIÇÃO: Hemocentro/UNICAMP

APRESENTAÇÃO AO CEP: 07/11/2011

APRESENTAR RELATÓRIO EM: 22/11/12 (O formulário encontra-se no site acima).

II – OBJETIVOS.

Contribuir na elucidação de mecanismos envolvidos na fisiopatologia das neoplasias mieloproliferativas crônicas (Policitemia Vera, Trombocitemia Essencial e Mielofibrose Primária).

III – SUMÁRIO.

O estudo tem por finalidade Tese de Doutorado e consiste em um estudo experimental e prospectivo. A pesquisadora pretende analisar amostras de sangue de 200 sujeitos, sendo que destes, 100 sujeitos integrarão o grupo-controle. Indivíduos provenientes do ambulatório do Hemocentro da Unicamp serão convidados a participar da pesquisa, bem como doadores voluntários de sangue periférico e de medula óssea no Hemocentro. Pacientes e doadores voluntários de sangue periférico que aceitarem participar da pesquisa fornecerão 20 ml a mais de sangue no momento da punção a que serão submetidos para a coleta de exames de rotina no dia ou para fim de doação de sangue. No caso das amostras de medula óssea, alíquotas extras de 20 ml de sangue de medula serão coletadas de pacientes submetidos a punção de medula óssea a critério clínico da equipe médica do Hemocentro ou a título de doação de medula. Sendo assim, não serão realizadas punções de medula óssea ou de sangue periférico para fins exclusivos da pesquisa. A coleta das amostras, a realização dos experimentos e a coleta dos dados clínicos dar-se-ão integralmente no Hemocentro da Unicamp.

IV - COMENTÁRIOS DOS RELATORES.

O Termo de Consentimento Livre e Esclarecido encontra-se adequado a resolução 196/96 e suas complementares. A pesquisadora apresenta o orçamento do projeto, cuja fonte de financiamento é o Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia do Sangue. No projeto consta a ciência do chefe do Centro de Hemoterapia e Hematologia da Unicamp.

Comitê de Ética em Pesquisa - UNICAMP
Rua: Tessália Vieira de Camargo, 126
Caixa Postal 6111
13083-887 Campinas – SP

FONE (019) 3521-8936
FAX (019) 3521-7187
cep@fcm.unicamp.br

- 1 -



V - PARECER DO CEP.

O Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP, após acatar os pareceres dos membros-relatores previamente designados para o presente caso e atendendo todos os dispositivos das Resoluções 196/96 e complementares, resolve aprovar sem restrições o Protocolo de Pesquisa, o Termo do Consentimento Livre e Esclarecido, bem como todos os anexos incluídos na pesquisa supracitada.

O conteúdo e as conclusões aqui apresentados são de responsabilidade exclusiva do CEP/FCM/UNICAMP e não representam a opinião da Universidade Estadual de Campinas nem a comprometem.

VI - INFORMAÇÕES COMPLEMENTARES.

O sujeito da pesquisa tem a liberdade de recusar-se a participar ou de retirar seu consentimento em qualquer fase da pesquisa, sem penalização alguma e sem prejuízo ao seu cuidado (Res. CNS 196/96 – Item IV.1.f) e deve receber uma cópia do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, na íntegra, por ele assinado (Item IV.2.d).

Pesquisador deve desenvolver a pesquisa conforme delineada no protocolo aprovado e descontinuar o estudo somente após análise das razões da descontinuidade pelo CEP que o aprovou (Res. CNS Item III.1.z), exceto quando perceber risco ou dano não previsto ao sujeito participante ou quando constatar a superioridade do regime oferecido a um dos grupos de pesquisa (Item V.3.).

O CEP deve ser informado de todos os efeitos adversos ou fatos relevantes que alterem o curso normal do estudo (Res. CNS Item V.4.). É papel do pesquisador assegurar medidas imediatas adequadas frente a evento adverso grave ocorrido (mesmo que tenha sido em outro centro) e enviar notificação ao CEP e à Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA – junto com seu posicionamento.

Eventuais modificações ou emendas ao protocolo devem ser apresentadas ao CEP de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificada e suas justificativas. Em caso de projeto do Grupo I ou II apresentados anteriormente à ANVISA, o pesquisador ou patrocinador deve enviá-las também à mesma junto com o parecer aprovatório do CEP, para serem juntadas ao protocolo inicial (Res. 251/97, Item III.2.e).

Relatórios parciais e final devem ser apresentados ao CEP, de acordo com os prazos estabelecidos na Resolução CNS-MS 196/96.

VII – DATA DA REUNIÃO.

Homologado na XI Reunião Ordinária do CEP/FCM, em 22 de novembro de 2011.

/ Prof. Dr. Carlos Eduardo Steiner
PRESIDENTE do COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA
FCM / UNICAMP

Anexo II



HEMOCENTRO – UNICAMP



TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE) (Pacientes)

Título da pesquisa: “Estudo das bases moleculares das Neoplasias Mieloproliferativas Crônicas: novas mutações, interações protéicas e sinalização celular”.

Pesquisadora responsável: Dra. Paula de Melo Campos
Orientadora: Dra. Fabíola Traina

Objetivo da pesquisa: Entender melhor as causas do desenvolvimento das doenças mieloproliferativas crônicas. Sabemos que nessas doenças ocorrem alterações na função de diversas proteínas, levando a uma proliferação descontrolada das células (células brancas, vermelhas ou plaquetas). Isso pode trazer várias consequências para o paciente, como, por exemplo, falência da medula óssea (causando anemia, queda de plaquetas e de glóbulos brancos) e até mesmo transformação para leucemia. Iremos estudar algumas proteínas que podem estar envolvidas no desenvolvimento dessas doenças (chamadas de “IRS1” e “IRS2”) e procurar novas mutações em genes que poderiam levar ao aparecimento dessas doenças. Isso é importante na busca de novos tratamentos para essas doenças.

Sendo um paciente portador de Síndrome Mieloproliferativa, estamos pedindo a sua colaboração para a realização desta pesquisa. A sua participação não é obrigatória e, caso você não queira participar, isso não mudará em nada o seu atendimento no Hemocentro ou no Hospital de Clínicas da Unicamp.

Se você concordar em participar, leia com atenção o texto abaixo e assine as duas vias deste termo de consentimento. Uma cópia ficará com você.

Para participar da pesquisa será necessária a sua autorização para que a pesquisadora possa ver a sua pasta médica e será necessário coletar 20 ml de sangue periférico ou sangue de medula óssea (quatro colheres de chá). A coleta de sangue periférico será feita pela enfermagem do Hemocentro ou, no caso da medula óssea, pelo médico do Hemocentro, juntamente com a coleta dos exames de rotina e não será necessária outra punção (serão coletados todos os tubos em uma só picada). Os riscos desta coleta são os mesmos de qualquer coleta para exames de rotina: a dor da picada da agulha e às vezes um hematoma (mancha roxa) no local da picada.

As suas informações serão mantidas em sigilo pela pesquisadora e o material coletado será congelado em nosso laboratório para a realização dos experimentos. Os seus dados serão usados apenas para esta pesquisa e, quando o trabalho for publicado, o seu nome e outras informações que possam te identificar não serão revelados.

Você não terá nenhuma vantagem em participar desta pesquisa e não receberá nenhum resultado de exame. Você estará nos ajudando a entender melhor as doenças

mieloproliferativas crônicas e a encontrar alvos para o desenvolvimento de novos tratamentos.

Você pode desistir de participar da pesquisa a qualquer momento. Mesmo após ter coletado o sangue. Basta avisar os pesquisadores e os seus dados serão retirados do projeto.

Se você tiver alguma dúvida sobre a sua participação neste estudo você poderá ligar para a Dra Paula de Melo Campos (3521-8734), pesquisadora responsável pelo estudo, ou para a Dra Fabíola Traina (3521-8734), orientadora do estudo, ambas do Hemocentro Unicamp. Qualquer reclamação sobre a pesquisa pode ser feita ao Comitê de Ética em Pesquisa da UNICAMP (Rua Tessália Vieira de Camargo, 126, Caixa Postal 6111 13083-887, Campinas – SP, Tel. (19) 3521-8936, Fax (19) 3521-7187, E-mail: cep@fem.unicamp.br).

Consentimento de Participação:

Eu li/ouvi o conteúdo deste termo de consentimento e recebi as orientações necessárias e esclarecimentos das minhas dúvidas. Entendi o objetivo da pesquisa, os riscos que eu corro ao participar dela e o que terei que fazer para participar e para minhas informações serem utilizadas. Com todas estas informações, aceito participar desta pesquisa.

Nome: _____

Idade: _____

HC: _____

() Concordo que o material coletado para essa pesquisa e armazenado no laboratório de Biologia Molecular do Hemocentro possa ser utilizado para outros estudos no futuro, desde que eles sejam antes aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Instituição.

() Desejo que o material coletado seja utilizado apenas para essa pesquisa, e que não seja utilizado para outras pesquisas futuras.

Data

Assinatura do paciente (ou responsável)

Data

Assinatura do pesquisador



HEMOCENTRO – UNICAMP



TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE)
(Controles Sadios)

Título da pesquisa: “Estudo das bases moleculares das Neoplasias Mieloproliferativas Crônicas: novas mutações, interações protéicas e sinalização celular”.

Pesquisadora responsável: Dra. Paula de Melo Campos

Orientadora: Dra. Fabíola Traina

Objetivo da pesquisa: Entender melhor as causas do desenvolvimento das doenças mieloproliferativas crônicas. Sabemos que nessas doenças ocorrem alterações na função de diversas proteínas, levando a uma proliferação descontrolada das células (células brancas, vermelhas ou plaquetas). Isso pode trazer várias consequências para o paciente, como, por exemplo, fálência da medula óssea (causando anemia e queda de plaquetas e de glóbulos brancos) e até mesmo transformação para leucemia. Iremos estudar algumas proteínas que podem estar envolvidas no aparecimento dessas doenças (chamadas de “IRS1” e “IRS2”) e procurar novas mutações em genes, que poderiam levar ao aparecimento dessas doenças. Isso é importante na busca de novos tratamentos para os pacientes com este tipo de doença.

Mesmo você não tendo a doença, estamos pedindo a sua colaboração para a realização desta pesquisa. Usaremos os seus resultados como grupo-controle sadio, para comparação com o grupo dos pacientes. A sua participação não é obrigatória e, caso você não queira participar, isso não mudará em nada o seu atendimento no Hemocentro ou no Hospital de Clínicas da Unicamp.

Se você concordar em participar, leia com atenção o texto abaixo e assine as duas vias deste termo de consentimento. Uma cópia ficará com você.

Para participar da pesquisa será necessária a sua autorização para coletar 20 mL de sangue periférico ou sangue de medula óssea (quatro colheres de chá). No caso da doação de sangue periférico, a coleta será feita pela enfermagem do Hemocentro, juntamente com a coleta dos exames necessários para a doação de sangue e não será necessária outra punção. Os riscos desta coleta são os mesmos de qualquer coleta de sangue para exames: a dor da picada da agulha e, às vezes, um hematoma (mancha roxa) no local da picada. No caso da coleta de medula óssea, a coleta será feita pelos médicos do Hemocentro, juntamente com a coleta da medula óssea para sua doação e não será necessária outra punção. Os riscos desta coleta são os mesmos de qualquer coleta de medula óssea, e a coleta dos 20 mL para o estudo não adiciona riscos para você.

As suas informações serão mantidas em sigilo pela pesquisadora e o material coletado será congelado em nosso ambulatório para a realização dos experimentos. Os seus dados serão usados apenas para esta pesquisa e, quando o trabalho for publicado, o seu nome e outras informações que possam te identificar não serão revelados.

Você não terá nenhuma vantagem em participar desta pesquisa e não receberá nenhum resultado de exame. Você estará nos ajudando a entender melhor as doenças mieloproliferativas crônicas e a encontrar alvos para o desenvolvimento de novos tratamentos.

Você pode desistir de participar da pesquisa a qualquer momento, mesmo após ter coletado o sangue. Basta avisar aos pesquisadores e os seus dados serão retirados do projeto.

Se você tiver alguma dúvida sobre a sua participação neste estudo você poderá ligar para a Dra Paula de Melo Campos (3521-8734), pesquisadora responsável pelo estudo, ou para a Dra Fabíola Traina (3521-8734), orientadora do estudo, ambas do Hemocentro Unicamp. Qualquer reclamação sobre a pesquisa pode ser feita ao Comitê de Ética em Pesquisa da UNICAMP (Rua Tessália Vieira de Camargo, 126, Caixa Postal 6111 13083-887, Campinas – SP, Tel. (19) 3521-8936, Fax (19) 3521-7187, E-mail: cep@fcm.unicamp.br).

Consentimento de Participação:

Eu li/ouvi o conteúdo deste termo de consentimento e recebi as orientações necessárias e esclarecimentos das minhas dúvidas. Entendi o objetivo da pesquisa, os riscos que eu corro ao participar dela e o que terei que fazer para participar e para minhas informações serem utilizadas. Com todas estas informações, aceito participar desta pesquisa.

Nome: _____

Idade: _____

() Concordo que o material coletado para essa pesquisa e armazenado no laboratório de Biologia Molecular do Hemocentro possa ser utilizado para outros estudos no futuro, desde que eles sejam antes aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Instituição.

() Desejo que o material coletado seja utilizado apenas para essa pesquisa, e que não seja utilizado para outras pesquisas futuras.

Data

Assinatura do paciente (ou responsável)

Data

Assinatura do pesquisador

Anexo III



CEP, 27/11/12.

FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

www.fcm.unicamp.br/pesquisa/etica/index.html

PARECER

I – IDENTIFICAÇÃO:

PROJETO: “USO COMPASSIVO PARA MESILATO DE IMATINIBE EM UM ÚNICO PACIENTE COM MASTOCITOSE SISTÊMICA AGRESSIVA” (RS).

PESQUISADORA RESPONSÁVEL: Dra. Fabíola Traina

INSTITUIÇÃO: Hemocentro/UNICAMP

APRESENTAÇÃO AO CEP: 09/10/2012

II - PARECER DO CEP.

O Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP tomou ciência e aprovou o Protocolo de Uso Compassivo (datado de 01/10/12) e o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – Uso Compassivo GLIVEC (datado de 01/10/12 – Hemocentro/UNICAMP).

O conteúdo e as conclusões aqui apresentados são de responsabilidade exclusiva do CEP/FCM/UNICAMP e não representam a opinião da Universidade Estadual de Campinas nem a comprometem.

III - DATA DA REUNIÃO.

Homologado na XI Reunião Ordinária do CEP/FCM, em 27 de novembro de 2012.

Prof. Dr. Carlos Eduardo Steiner
PRESIDENTE DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA
FCM / UNICAMP



CEP, 27/11/12.

PARECER

I – IDENTIFICAÇÃO:

PROJETO: “USO COMPASSIVO PARA MESILATO DE IMATINIBE EM UM ÚNICO PACIENTE COM MASTOCITOSE SISTÊMICA AGRESSIVA” (CSE).
PESQUISADORA RESPONSÁVEL: Dra. Fabíola Traina
INSTITUIÇÃO: Hemocentro/UNICAMP
APRESENTAÇÃO AO CEP: 09/10/2012

II - PARECER DO CEP.

O Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP tomou ciência e aprovou o Protocolo de Uso Compassivo (datado de 01/10/12) e o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – Uso Compassivo GLIVEC (datado de 01/10/12 – Hemocentro/UNICAMP).

O conteúdo e as conclusões aqui apresentados são de responsabilidade exclusiva do CEP/FCM/UNICAMP e não representam a opinião da Universidade Estadual de Campinas nem a comprometem.

III - DATA DA REUNIÃO.

Homologado na XI Reunião Ordinária do CEP/FCM, em 27 de novembro de 2012.


Prof. Dr. Carlos Eduardo Steiner
PRESIDENTE DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA
FCM / UNICAMP

Anexo IV

Anexo IV. Características clínicas e moleculares de pacientes com policitemia vera, trombocitemia essencial e mielofibrose primária																					
	Diagnóstico	Sexo	Idade	Hb	Leuco	Neutro	Plt	Grau fibrose MO *	% Blastos MO	Cariótipo ^a	Esplenomegalia*	Hepatomegalia*	Sintomas constitucionais [#]	JAK2 ^{V617F} †	% JAK2 ^{V617F}	JAK2 ^{e12} †	CALR ^{MUT} †	ER IRS2†	Transformação LMA	Progressão Fibrose	Óbito
1	PV	F	66,5	17,1	11130	6900	409000	1	2	46, XX	NÃO	NÃO	NÃO	PRESENTE	31,20%	NA	NEGATIVA	0,21	NÃO	NÃO	NÃO
2	TE	F	44,0	12,8	13700	5480	2065000	NA	0	SEM METÁFASES	NÃO	NÃO	SIM	NEGATIVA		WT	PRESENTE	0,45	NÃO	NÃO	NÃO
3	TE	F	51,8	15,5	8630	5340	1042000	NA	1	46, XX	NÃO	NÃO	NÃO	NEGATIVA		WT	NEGATIVA	0,57	NÃO	NÃO	NÃO
4	PV	F	47,8	12,8	6280	7021	1070000	NA	1	46, XX	NÃO	NÃO	NÃO	PRESENTE	27,70%	NA	NEGATIVA	0,54	NÃO	NÃO	NÃO
5	TE	F	43,9	13,9	12700	8540	930700	1	0	46, XX	NÃO	NÃO	SIM	HETEROZIGOTO	11,80%	NA	NEGATIVA	0,46	NÃO	NÃO	NÃO
6	TE	M	51,5	11,3	17800	15100	1132000	1	0	NR	SIM	SIM	NÃO	NEGATIVA		WT	PRESENTE	1,45	NÃO	NÃO	NÃO
7	MFP	M	53,9	19,9	20210	17178	481000	2	0,5	46, XY	SIM	SIM	NÃO	PRESENTE		NA	NEGATIVA	2,11	NÃO	SIM	SIM
8	MFP	F	77,7	9,1	11840	467	129000	3	0	NR	SIM	NÃO	SIM	PRESENTE		NA	NEGATIVA	0,00	SIM	SIM	SIM
9	PV	F	61,5	17,1	8300	5146	386000	NA	0	NR	NÃO	NÃO	NÃO	HETEROZIGOTO	34,80%	NA	NEGATIVA	0,20	NÃO	NÃO	NÃO
10	PV	M	61,7	22,7	18200	15830	658000	NA	0	46, XY	SIM	SIM	SIM	HETEROZIGOTO		NA	NEGATIVA	0,80	NÃO	NÃO	NÃO
11	PV	M	80,2	20	11500	8970	1052000	NA	1	NR	NÃO	NÃO	NÃO	HETEROZIGOTO		NA	NEGATIVA	0,17	NÃO	NÃO	NÃO
12	PV	F	73,7	19	8600	6800	272000	NA	0	NR	SIM	SIM	SIM	PRESENTE	45,40%	NA	NEGATIVA	2,27	NÃO	NÃO	NÃO
13	TE	F	56,8	14,1	7920	4752	938000	2	2	46, XX	NÃO	NÃO	NÃO	NEGATIVA		WT	PRESENTE	0,78	NÃO	NÃO	NÃO
14	MFP	F	50,2	9,4	2400	1000	108000	4	0	SEM METÁFASES	SIM	NÃO	SIM	NEGATIVA		WT	PRESENTE	0,25	NÃO	SIM	NÃO
15	MFP	F	87,1	8,1	8690	4345	244000	3	0,5	46, XX	SIM	SIM	SIM	HETEROZIGOTO		NA	NEGATIVA	1,24	NÃO	SIM	SIM
16	TE	F	19,7	9,7	15170	12490	601000	NA	0,5	SEM METÁFASES	SIM	NÃO	NÃO	NEGATIVA		WT	PRESENTE	0,63	NÃO	NÃO	NÃO
17	PV	M	68,0	18,5	11700	7488	621000	NA	NR	46, XY	NÃO	NÃO	SIM	HETEROZIGOTO	3,02%	NA	NEGATIVA	11,24	NÃO	NÃO	NÃO
18	MFP	M	80,4	11	9430	6230	310000	2	0	SEM METÁFASES	SIM	NÃO	NÃO	NEGATIVA		WT	PRESENTE	0,17	NÃO	SIM	NÃO
19	MFP	M	38,3	12,5	13300	7182	818000	4	3	46, XY	SIM	NÃO	NÃO	NEGATIVA		WT	PRESENTE	0,15	NÃO	SIM	NÃO
20	PV	M	35,1	20,3	6690	4180	203000	NA	0,5	46, XY	NÃO	NÃO	NÃO	PRESENTE		NA	NEGATIVA	0,61	NÃO	NÃO	NÃO
21	TE	F	55,3	14,6	14310	6780	1340000	NA	0,5	46, XX	NÃO	NÃO	SIM	HETEROZIGOTO	8,89%	NA	NEGATIVA	0,39	NÃO	NÃO	NÃO
22	MFP	M	74,6	15	13640	9860	1897000	2	2	46, XY	NA	NA	NA	NEGATIVA		WT	NEGATIVA	0,52	NÃO	SIM	NÃO
23	TE	M	48,1	16	16710	12031	1213000	3	0,5	46, XY	NÃO	NÃO	NÃO	PRESENTE	4,99%	NA	NEGATIVA	1,94	NÃO	NÃO	NÃO
24	MFP	F	42,5	10,6	10020	6890	859000	2	1	46, XX	NÃO	NÃO	NÃO	PRESENTE		NA	NEGATIVA	1,61	NÃO	SIM	NÃO
25	PV	M	52,5	18,3	13590	10056	1161000	NA	2	46, XY	NÃO	NÃO	SIM	PRESENTE	10,30%	NA	NEGATIVA	1,09	NÃO	NÃO	NÃO
26	TE	M	83,1	14,5	6400	4810	878000	NA	1	46, XY	NÃO	NÃO	NÃO	HETEROZIGOTO		NA	NEGATIVA	0,92	NÃO	NÃO	NÃO
27	MFP	F	56,2	13,7	8500	5695	994000	1	0,5	46, XX	NÃO	NÃO	NÃO	PRESENTE	3,60%	NA	NEGATIVA	0,42	NÃO	SIM	NÃO
28	PV	F	75,2	18,2	11800	8460	738000	1	1,5	46, XX, 11p+	NÃO	NÃO	NÃO	HETEROZIGOTO	12,50%	NA	NEGATIVA	1,67	NÃO	NÃO	NÃO
29	PV	M	51,1	22,7	13000	10700	464000	NA	0	46, XY	NÃO	NÃO	SIM	HOMOGIGOTO		NA	PRESENTE	1,37	NÃO	NÃO	NÃO
30	TE	F	57,4	13,7	8320	3902	601000	NA	0	SEM METÁFASES	NÃO	NÃO	NÃO	HETEROZIGOTO	3,98%	NA	NEGATIVA	0,84	NÃO	NÃO	NÃO
31	MFP	F	49,8	13,1	11520	8470	908000	2	0,5	46, XX	NÃO	NÃO	NÃO	PRESENTE		NA	NEGATIVA	1,08	NÃO	SIM	NÃO
32	MFP	M	59,8	14,1	7840	6630	414000	1	0	SEM METÁFASES	NÃO	NÃO	NÃO	PRESENTE		NA	NEGATIVA	1,35	NÃO	SIM	NÃO
33	MFP	M	75,2	12,3	14500	10295	1606000	2	0	SEM METÁFASES	NÃO	NÃO	SIM	HETEROZIGOTO		NA	NEGATIVA	1,33	NÃO	SIM	NÃO
34	PV	M	49,5	18,3	11050	7560	797000	NA	0	46, XY	SIM	NÃO	NÃO	PRESENTE	16,70%	NA	NEGATIVA	1,14	NÃO	NÃO	NÃO
35	PV	M	69,4	19,1	14500	11300	984000	NA	0	NR	NÃO	NÃO	NÃO	PRESENTE	1,65%	NA	NEGATIVA	1,09	SIM	NÃO	SIM
36	TE	F	55,6	13,2	10300	7004	617000	1	3,5	46, XX	NÃO	NÃO	SIM	NEGATIVA		WT	NEGATIVA	0,76	NÃO	NÃO	NÃO
37	MFP	F	77,9	15	8380	4540	953000	3	3,5	46, XX	NÃO	NÃO	NÃO	HETEROZIGOTO		NA	NEGATIVA	0,62	NÃO	SIM	NÃO
38	MFP	M	61,8	13,5	17000	13600	661000	3	1,5	SEM METÁFASES	SIM	NÃO	NÃO	HETEROZIGOTO	37,90%	NA	NEGATIVA	0,98	NÃO	SIM	SIM
39	PV	F	66,5	14,2	11560	9310	380000	NA	0	46, XX, inv(9)	NÃO	NÃO	SIM	PRESENTE	5,78%	NA	NEGATIVA	1,92	NÃO	NÃO	NÃO
40	TE	F	67,0	13,4	6050	4350	899000	1	1	SEM METÁFASES	NÃO	NÃO	NÃO	NEGATIVA		WT	PRESENTE	0,62	NÃO	NÃO	NÃO
41	TE	F	69,5	13,5	9000	5800	882000	NA	0	NR	NÃO	NÃO	NÃO	PRESENTE		NA	NEGATIVA	1,15	NÃO	NÃO	NÃO
42	TE	F	55,0	13,7	4510	2530	541000	NA	DILUIDO	46, XX	NÃO	NÃO	NÃO	HETEROZIGOTO	1,32%	NA	NEGATIVA	1,94	NÃO	NÃO	NÃO
43	TE	F	61,1	13,8	6740	3572	682000	NA	0,5	SEM METÁFASES	NÃO	NÃO	NÃO	NEGATIVA		WT	PRESENTE	1,63	NÃO	NÃO	NÃO
44	TE	F	58,0	13,1	5650	3330	1025000	NA	0	SEM METÁFASES	NÃO	SIM	NÃO	NEGATIVA		WT	PRESENTE	0,67	NÃO	NÃO	NÃO
45	TE	F	81,6	12,2	3030	2110	593000	NR	NR	NR	NÃO	NÃO	NÃO	NEGATIVA		WT	PRESENTE	0,62	NÃO	NÃO	NÃO
46	PV	F	83,3	17,2	14400	11088	3090000	NA	0	46, XX	NÃO	NÃO	NÃO	HETEROZIGOTO		NA	NA	0,17	NÃO	NÃO	NÃO
47	MFP	M	61,6	10,3	6580	4480	567000	3	13,5	46, XY	NÃO	NÃO	NÃO	NEGATIVA		NA	PRESENTE	0,27	NÃO	SIM	NÃO
48	MFP	F	53,9	16	8700	6800	292000	4	0	46, XX	SIM	NÃO	NÃO	PRESENTE	14%	NA	NEGATIVA	0,34	NÃO	SIM	NÃO
49	TE	M	73,4	13,4	12100	9680	1041000	1	0	46, XY	NÃO	NÃO	NÃO	HETEROZIGOTO		NA	NEGATIVA	1,00	NÃO	SIM	SIM

Anexo IV. Características clínicas e moleculares de pacientes com policitemia vera, trombocitemia essencial e mielofibrose primária																					
	Diagnóstico	Sexo	Idade	Hb	Leuco	Neutro	Plt	Grau fibrose MO *	% Blastos MO	Cariótipo ^a	Esplenomegalia *	Hepatomegalia *	Sintomas constitucionais [#]	JAK2 ^{V617F} †	% JAK2 ^{V617F}	JAK2 ^{e12} †	CALR ^{MUT} †	ER IRS2†	Transformação LMA	Progressão Fibrose	Óbito
50	TE	F	21,9	9,7	5200	3100	874000	NA	0	46, XX	NÃO	NÃO	NÃO	NEGATIVA		WT	PRESENTE	0,63	NÃO	NÃO	NÃO
51	MFP	M	64,5	13,6	22620	14703	209000	4	0	46, XY	SIM	NÃO	NÃO	HETEROZIGOTO	25,10%	NA	NEGATIVA	0,87	NÃO	SIM	SIM
52	MFP	M	53,2	13	19300	13000	692000	4	6	46, XY	SIM	NÃO	NÃO	NEGATIVA		WT	PRESENTE	0,21	NÃO	SIM	NÃO
53	TE	M	54,0	16,4	5700	3859	652000	NA	0	46, XY	SIM	NÃO	NÃO	PRESENTE	15,70%	NA	NEGATIVA	1,26	NÃO	NÃO	NÃO
54	TE	M	52,6	17	9400	7140	749000	NA	1	46, XY	NÃO	NÃO	NÃO	PRESENTE	49,40%	NA	NEGATIVA	2,52	NÃO	NÃO	NÃO
55	MFP	M	65,6	17	11070	8966	727000	NA	0	46, XY	NÃO	NÃO	NÃO	HETEROZIGOTO	20,50%	NA	NEGATIVA	1,56	NÃO	SIM	NÃO
56	PV	M	72,5	17,7	11300	7550	616000	1	0	NR	NÃO	NÃO	NÃO	HETEROZIGOTO	1,95%	NA	NEGATIVA	0,00	NÃO	NÃO	NÃO
57	TE	F	80,2	12,2	4290	2180	608000	NA	1,5	46, XX	NÃO	NÃO	NÃO	AUSENTE		NA	PRESENTE	0,45	NÃO	NÃO	NÃO
58	TE	F	79,0	11	13830	7700	1803000	1	2	46, XX	NÃO	NÃO	NÃO	AUSENTE		NA	PRESENTE	0,65	NÃO	NÃO	NÃO
59	PV	M	39,6	15,3	13100	11280	405000	NA	1,5	SEM METÁFASES	SIM	NÃO	SIM	PRESENTE		NA	NEGATIVA	2,69	NÃO	NÃO	NÃO
60	MFP	F	57,6	12,5	20920	16200	1603000	2	DILUÍDO	SEM METÁFASES	SIM	SIM	SIM	PRESENTE		NA	NEGATIVA	1,43	NÃO	SIM	SIM
61	MFP	M	50,4	16,9	9800	7080	972000	2	3	SEM METÁFASES	NÃO	NÃO	NÃO	HETEROZIGOTO	7,38%	NA	NEGATIVA	4,31	NÃO	SIM	NÃO
62	MFP	F	74,6	13,5	6160	4250	1290000	1	0,5	46, XY	NÃO	NÃO	NÃO	NEGATIVA		NA	PRESENTE	0,62	NÃO	SIM	NÃO
63	TE	M	72,6	13,8	4220	3030	436000	NA	1	46, XX	NÃO	NÃO	NÃO	NEGATIVA		WT	PRESENTE	1,09	NÃO	NÃO	NÃO
64	PV	F	65,5	17,7	25540	20190	860000	1	0	NR	NÃO	NÃO	NÃO	HETEROZIGOTO	3,10%	NA	NEGATIVA	0,37	NÃO	NÃO	NÃO
65	TE	F	84,1	14	14970	12300	898000	1	0,5	SEM METÁFASES	NÃO	NÃO	SIM	PRESENTE		NA	NEGATIVA	1,85	NÃO	NÃO	NÃO
66	PV	F	57,7	19	16820	14020	301000	1	0	46, XX	NÃO	NÃO	SIM	PRESENTE		NA	NEGATIVA	0,84	NÃO	NÃO	NÃO
67	TE	F	65,3	11,7	7370	4770	1215000	NA	0,5	NÃO	NÃO	NÃO	SIM	PRESENTE	10,80%	NA	NEGATIVA	0,73	NÃO	NÃO	NÃO
68	MFP	F	78,8	11,6	35700	22500	320000	4	0	46, XX	SIM	NÃO	NÃO	NEGATIVA		WT	PRESENTE	0,99	NÃO	SIM	NÃO
69	TE	F	55,6	14,7	10100	4300	657000	1	1	46, XX	NÃO	NÃO	NÃO	HETEROZIGOTO		NA	NA	4,31	NÃO	NÃO	NÃO
70	PV	M	54,3	19,8	7890	4880	786000	NA	5,5	46, XY	SIM	NÃO	NÃO	HETEROZIGOTO	11,60%	NA	NEGATIVA	0,77	NÃO	NÃO	NÃO
71	PV	F	74,8	17	9400	6830	764000	2	2	46, XX	NÃO	NÃO	SIM	HETEROZIGOTO	11,60%	NA	NEGATIVA	5,97	NÃO	NÃO	NÃO
72	MFP	F	26,5	11,9	5290	3760	1716000	4	0,5	46, XX	NÃO	NÃO	NÃO	NEGATIVA		WT	PRESENTE	0,24	NÃO	SIM	NÃO
73	TE	F	18,9	12,3	9000	5500	737000	NA	0	46, XX	NÃO	NÃO	NÃO	NEGATIVA		WT	NEGATIVA	0,17	NÃO	NÃO	NÃO
74	MFP	F	62,6	15,2	11950	12900	924000	NA	1	SEM METÁFASES	NÃO	NÃO	NÃO	PRESENTE		NA	NEGATIVA	0,20	NÃO	SIM	NÃO
74	TE	M	74,2	13,5	7190	5540	1606000	NA	0	SEM METÁFASES	NÃO	NÃO	NÃO	NEGATIVA		WT	PRESENTE	0,38	NÃO	NÃO	NÃO
76	PV	M	68,5	22	10870	8360	406000	3	0	46, XY	NÃO	NÃO	SIM	PRESENTE	20,30%	NA	NEGATIVA	2,03	NÃO	NÃO	NÃO
77	MFP	F	82,0	14,2	8760	5770	695000	3	0	SEM METÁFASES	NÃO	NÃO	SIM	HETEROZIGOTO	7,80%	NA	NEGATIVA	0,55	NÃO	SIM	NÃO
78	TE	M	56,8	14,7	9470	7180	1053000	3	1,5	NR	NÃO	NÃO	NÃO	NEGATIVA		WT	PRESENTE	0,36	NÃO	NÃO	NÃO
79	TE	F	51,9	14,8	9470	6280	629000	NA	0	46, XX	NÃO	NÃO	NÃO	PRESENTE	6,73%	NA	NEGATIVA	0,43	NÃO	NÃO	NÃO
80	TE	M	42,9	14,3	9420	6710	1274000	NA	0,5	46, XY	NÃO	NÃO	NÃO	NEGATIVA		WT	NEGATIVA	1,09	NÃO	NÃO	NÃO
81	TE	M	35,3	13,4	6400	4032	974000	NA	2	46, XY	NÃO	NÃO	NÃO	NEGATIVA		NA	PRESENTE	0,60	NÃO	NÃO	NÃO
82	MFP	M	71,4	15,6	14000	10900	1582000	3	0,5	46, XY	NÃO	NÃO	NÃO	AUSENTE		WT	NEGATIVA	0,90	NÃO	SIM	NÃO
83	TE	F	65,5	13,3	11930	8460	1137000	NA	0,5	46, XX	NÃO	SIM	NÃO	HETEROZIGOTO		NA	NEGATIVA	0,72	NÃO	NÃO	NÃO
84	TE	F	46,3	13,2	6170	3480	851000	NA	0	SEM METÁFASES	NÃO	NÃO	NÃO	NEGATIVA		WT	PRESENTE	0,18	NÃO	NÃO	NÃO
85	TE	F	35,6	14,3	9000	5610	1143000	NA	0,5	46, XX	SIM	NÃO	SIM	NEGATIVA		WT	NEGATIVA	0,28	NÃO	NÃO	NÃO
86	PV	F	65,0	18	11000	8800	598000	NA	NR	NR	NÃO	NÃO	NÃO	PRESENTE		NA	NEGATIVA	0,16	NÃO	NÃO	NÃO
87	PV	M	76,6	17,6	8110	5380	317000	1	1	46, XY	NÃO	NÃO	NÃO	HETEROZIGOTO		NA	NEGATIVA	0,33	NÃO	NÃO	NÃO
88	PV	F	47,6	18,6	11400	7752	530000	1	0	46, XX	NÃO	NÃO	NÃO	HOMOZIGOTO	67,60%	NA	NEGATIVA	0,26	NÃO	NÃO	NÃO
89	MFP	M	78,0	12,2	13200	9700	921000	2	1,5	46, XY	NÃO	NÃO	NÃO	HETEROZIGOTO	3,23%	NA	NEGATIVA	0,29	NÃO	SIM	NÃO
90	TE	F	42,4	14,6	5010	3240	711000	2	2	46, XX	NÃO	NÃO	NÃO	NEGATIVA		WT	NEGATIVA	1,65	NÃO	NÃO	NÃO
91	MFP	F	57,1	13,5	10000	7790	676000	NA	0	NR	NÃO	NÃO	NÃO	NEGATIVA		WT	PRESENTE	0,01	NÃO	SIM	NÃO
92	PV	F	52,6	18,3	12850	10090	471000	1	3	46, XX	SIM	NÃO	NÃO	PRESENTE	67,70%	NA	NEGATIVA	0,09	NÃO	NÃO	NÃO
93	MFP	F	78,2	13,2	43260	38330	581000	1	0	SEM METÁFASES	SIM	NÃO	NÃO	PRESENTE	21,80%	NA	NEGATIVA	0,11	NÃO	SIM	NÃO
94	PV	M	65,3	19	7020	3540	248000	NA	0	SEM METÁFASES	NÃO	NÃO	NÃO	NEGATIVA		WT	NEGATIVA	0,03	NÃO	NÃO	NÃO
95	PV	M	47,6	16,4	7120	4940	284000	NA	0	NR	NÃO	NÃO	NÃO	NEGATIVA		WT	NEGATIVA	0,02	NÃO	NÃO	NÃO
96	PV	F	68,9	16,8	9430	6190	864000	NA	1	46, XX	NÃO	NÃO	NÃO	HETEROZIGOTO		NA	NEGATIVA	0,35	NÃO	NÃO	NÃO
97	PV	F	68,1	21,4	11580	8530	483000	1	1,5	46, XX	NÃO	NÃO	NÃO	HETEROZIGOTO		NA	NEGATIVA	2,17	NÃO	NÃO	NÃO
98	MFP	M	54,5	13,6	13700	10412	1252000	1	2,5	46, XY	NÃO	NÃO	NÃO	HETEROZIGOTO		NA	NEGATIVA	1,34	NÃO	SIM	NÃO
99	MFP	F	49,4	20,4	15670	13162	497000	3	0,5	NR	NÃO	NÃO	NÃO	PRESENTE		NA	NEGATIVA	1,39	NÃO	SIM	NÃO

Informações complementares ao Anexo IV

Abreviações e Unidades

PV: policitemia vera; TE: trombocitemia essencial; MFP: mielofibrose primária

Sexo: (M) masculino / (F) feminino

§ Hb: Hemoglobina, g/dL

§ Leuco: Leucócitos, $\times 10^9/L$

§ Neutro: Neutrófilos, $\times 10^9/L$

§ Plt: Plaquetas, $\times 10^9/L$

§ % Blastos MO: porcentagem de blastos na medula óssea

§ Grau fibrose MO: grau de fibrose reticulínica observada através de biópsia de medula óssea

NA: não avaliado; NR: não realizado

§ dados obtidos ao diagnóstico

Símbolos

^Δ Cariótipo: citogenética avaliada em 20 metáfases;

* Esplenomegalia e hepatomegalia avaliadas através do exame físico ou exame de imagem;

Sintomas constitucionais: perda de peso (ao menos 10% do peso em ≤ 6 meses), sudorese, fadiga

† Presença de mutações: $JAK2^{V617F}$, JAK^{e12} (mutações no éxon 12 de JAK2) e $CALR^{MUT}$ (mutações em *CALR*)

‡ ER IRS2: Expressão relativa de *IRS2* em células CD34+ de sangue periférico de pacientes com PV, TE e MFP

Anexo V

RHH-2761; No. of Pages 4

ARTICLE IN PRESS

REV BRAS HEMATOL HEMOTER 2015;xxx(xx):xxx-xxx



Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia
Brazilian Journal of Hematology and Hemotherapy

www.rbhh.org



Letter to the Editor

Somatic mutations of calreticulin in a Brazilian cohort of patients with myeloproliferative neoplasms

João Agostinho Machado-Neto¹, Paula de Melo Campos¹,
Dulcinéia Martins de Albuquerque, Fernando Ferreira Costa,
Irene Lorand-Metze, Sara Terezinha Olsila Saad,
Fabiola Traina*
Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Campinas, SP,
Brazil

*Corresponding author at: Rua Carlos Chagas, 480, 13083-878
Campinas, SP, Brazil.
E-mail addresses: ftraina@fmrp.usp.br,
fabiolatrains@gmail.com (F. Traina).

¹ Both authors contributed equally to this work.

Received 19 September 2014

Accepted 25 February 2015

1516-8484/© 2015 Associação Brasileira de Hematologia,
Hemoterapia e Terapia Celular. Published by Elsevier Editora
Ltda. All rights reserved.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.bjhh.2015.03.012>

Available online xxx

Anexo VI

Manuscrito em fase de submissão

IRS2 silencing increases apoptosis and potentiates the effects of ruxolitinib in JAK2^{V617F}-positive myeloproliferative neoplasms

Paula De Melo Campos¹, João A. Machado-Neto¹, Christopher A. Eide²⁻³, Samantha L. Savage², Patrícia Favaro^{1,*}, Irene Lorand-Metze¹, Fernando F. Costa¹, Cristina E. Tognon²⁻³, Brian J. Druker²⁻³, Sara T. Olalla Saad¹ and Fabiola Traina^{1,#}.

¹Hematology and Hemotherapy Center - University of Campinas/Hemocentro- Unicamp, Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia do Sangue, Campinas, São Paulo, Brazil; ²Knight Cancer Institute, Oregon Health & Science University, Portland, Oregon, USA; ³Howard Hughes Medical Institute, Portland, Oregon, USA; *Currently at Department of Biological Sciences, Federal University of São Paulo, Diadema, São Paulo, Brazil; #Currently at Department of Internal Medicine, University of São Paulo at Ribeirão Preto Medical School, Ribeirão Preto, São Paulo, Brazil

Anexo VII

Leukemia Research 38 (2014) 1245–1251



Contents lists available at ScienceDirect

Leukemia Research

journal homepage: www.elsevier.com/locate/leukres



Familial systemic mastocytosis with germline KIT K509I mutation is sensitive to treatment with imatinib, dasatinib and PKC412



Paula de Melo Campos^a, João A. Machado-Neto^a, Renata Scopim-Ribeiro^a, Valeria Visconte^b, Ali Tabarroki^b, Adriana S.S. Duarte^a, Flávia F.C. Barra^c, José Vassalo^c, Heesun J. Rogers^d, Irene Lorand-Metze^a, Ramon V. Tiu^b, Fernando F. Costa^a, Sara T. Olalla Saad^a, Fabiola Traina^{a,e,*}

^a Hematology and Hemotherapy Center, University of Campinas/Hemocentro – Unicamp, Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia do Sangue, Campinas, São Paulo, Brazil

^b Department of Translational Hematology and Oncology Research, Taussig Cancer Institute, Cleveland Clinic, Cleveland, OH, USA

^c Laboratory of Investigative and Molecular Pathology, CIPED, School of Medical Sciences, University of Campinas, Campinas, São Paulo, Brazil

^d Department of Clinical Pathology, Cleveland Clinic, Cleveland, OH, USA

^e Department of Internal Medicine, University of São Paulo at Ribeirão Preto Medical School, Ribeirão Preto, São Paulo, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 7 February 2014

Received in revised form 23 July 2014

Accepted 24 July 2014

Available online 1 August 2014

Keywords:

Familial mastocytosis

K509I KIT mutation

Tyrosine kinase inhibitors

Imatinib

Dasatinib

PKC412

ABSTRACT

Mastocytosis are myeloproliferative neoplasms commonly related to gain-of-function mutations involving the tyrosine kinase domain of KIT. We herein report a case of familial systemic mastocytosis with the rare KIT K509I germ line mutation affecting two family members: mother and daughter. *In vitro* treatment with imatinib, dasatinib and PKC412 reduced cell viability of primary mast cells harboring KIT K509I mutation. However, imatinib was more effective in inducing apoptosis of neoplastic mast cells. Both patients with familial systemic mastocytosis had remarkable hematological and skin improvement after three months of imatinib treatment, suggesting that it may be an effective front line therapy for patients harboring KIT K509I mutation.

© 2014 Elsevier Ltd. All rights reserved.

