

JOÃO AGOSTINHO MACHADO-NETO

**CARACTERIZAÇÃO DA EXPRESSÃO E FUNÇÃO
DE IRS1 E IRS2 NA HEMATOPOESE NORMAL,
MIELODISPLÁSICA E LEUCÊMICA**



UNICAMP

Campinas

2011

JOÃO AGOSTINHO MACHADO-NETO

**CARACTERIZAÇÃO DA EXPRESSÃO E FUNÇÃO
DE IRS1 E IRS2 NA HEMATOPOESE NORMAL,
MIELODISPLÁSICA E LEUCÊMICA**

*Dissertação de Mestrado apresentada à Pós-Graduação da
Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de
Campinas para Obtenção do título de Mestre em Clínica
Médica, Área de Concentração Ciências Básicas.*

Orientadora: Dra. Fabiola Traina

Co-orientadora: Dra Sara T Olalla Saad

Campinas

2011

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS DA UNICAMP**

Bibliotecária: Rosana Evangelista Poderoso – CRB-8ª / 6652

M18c Machado-Neto, João Agostinho
Caracterização da expressão e função de IRS1 e IRS2 na hematopoese normal, mielodisplásica e leucêmica. / João Agostinho Machado-Neto. -- Campinas, SP : [s.n.], 2011.

Orientador : Fabiola Traina
Co-orientador: Sara Teresinha Olalla Saad
Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Ciências Médicas.

1. Leucemia mielóide crônica. 2. Leucemia aguda. 3. Hematopoese. 4. Proliferação celular. 5. Sinalização. I. Traina, Fabiola. II. Saad, Sara Teresinha Olalla. III. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. IV. Título.

Título em inglês: IRS1 and IRS2 function and expression in normal, myelodysplastic, and leukemia hematopoiesis

- Keywords:**
- Chronic myeloid leukemia
 - Acute leukemia
 - Hematopoiesis
 - Cell proliferation
 - Signalling

Titulação: Mestrado em Clínica Médica

Área de concentração: Ciências Básicas

Banca examinadora:

Prof. Dr. Fabiola Traina
Prof. Dr. Carla Roberta de Oliveira Carvalho
Prof. Dr. Kátia Botgia Barbosa Pagnano

Data da defesa: 24-02-2011

Banca examinadora da Dissertação de Mestrado

João Agostinho Machado Neto

Orientador: Prof^a. Dr^a. Fabiola Traina

Membros:

1. Prof^a. Dr^a. Carla Roberta de Oliveira Carvalho

CAOliveira

2. Prof^a. Dr^a. Kátia Borgia Barbosa Pagnano

Kátia B. Barbosa Pagnano

3. Prof^a. Dr^a. Fabiola Traina

Fabiola Traina

Curso de Pós-Graduação em Clínica Médica da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

Data: 24/02/2011

Dedicatória
*Dedico este trabalho a minha mãe, Cristiane,
meu irmão, João Otávio e especialmente a
minha namorada Keli.*

AGRADECIMENTOS

À minha mãe, Cristiane, ao meu irmão, João Otávio e minha namorada, Keli, pelo constante apoio, incentivo, carinho, amizade, compreensão, amor e pela linda família que compomos. Agradeço por compartilharem de minhas conquistas, dos momentos de incertezas e de alegria.

À minha orientadora Dra. Fabiola Traina, por sua orientação na realização deste trabalho. Agradeço a sua compreensão, confiança, as oportunidades oferecidas e o privilégio de trabalhar ao seu lado; um exemplo de pessoa, médica e orientadora. A finalização deste trabalho é mais uma conquista que compartilhamos juntos, fruto de sua orientação.

À Profa. Dra. Sara Saad, pela sua orientação no projeto de iniciação científica e pela co-orientação neste trabalho, pela disponibilidade e apoio em seu laboratório. Agradeço as oportunidades oferecidas e por fazer parte da minha formação.

À minha amiga Patricia Favaro, que teve grande participação na minha formação, pela constante presença e incentivo durante a realização deste trabalho. Agradeço a seus ensinamentos e acima de tudo, agradeço à sua amizade.

Às minhas colaboradoras e amigas, Mariana Lazarini, Adriana e Letícia, que me ajudaram nos experimentos, análises e me deram força para seguir em frente. Muito obrigado pela amizade e a oportunidade de compartilhar as experiências acadêmicas e pessoais.

Aos alunos e a equipe de trabalho da Dra. Sara que me auxiliaram em diferentes momentos durante a realização deste trabalho; em especial à Tereza Sueko, que sempre me incentivou e me guiou, desde a minha iniciação científica na resolução dos mistérios de cada experimento. A todos os alunos, Matheus, João Kleber, Pedro, Gisele, Victor, Thiago, Mariana Baratti, Marina, Samuel, Patrícia Rodrigues, Carol, Rita, Marilisa, Bruna Palodetto, Luciene, Paulo, Isabela, Anamika, Shankar, Daniela, e todos os funcionários, Simone, Lena, Ana Leda, Janine, Renata, Fernanda, Irene, Luís Gustavo, Audrey e Karla, agradeço a oportunidade de compartilhar as experiências e o carinho.

Aos alunos de graduação e amigos Arthur, Bruna, Jean, Karla e Ana Laura, que compartilharam diferentes momentos da realização de diversos trabalhos e me permitiram opinar e aprender durante a realização de seus trabalhos. Agradeço Dra Sara por me conceder a oportunidade do contato com os alunos.

Ao Dr. José Barreto, pela disponibilidade de seu laboratório. Aos alunos Guilherme e Marília, agradeço a excelente recepção e auxílio com as dúvidas nos experimentos.

Aos docentes da disciplina de Hematologia da UNICAMP, Dr. Fernando F. Costa, Dra. Irene Lorand-Metze, Dr. Cármino A. de Souza pelo apoio e estrutura na realização deste trabalho.

Aos pacientes, um agradecimento especial, pois sem eles este trabalho não teria sido idealizado e nem realizado.

À Nicola Conran pelo auxílio na correção ortográfica do inglês.

À Roberto Zulli pelo auxílio estatístico.

À Arlete e ao Leonardo pelo apoio didático durante a realização deste trabalho.

Às secretárias Patrícia e Raquel pela disponibilidade no serviço burocrático e amizade.

À secretária da pós-graduação Adriana pela disponibilidade no serviço burocrático.

Às agências financiadoras, FAPESP, CNPq e INCT do sangue.

Agradeço a Deus a oportunidade da vida, da saúde, de uma família feliz, de ter conhecido todas as pessoas aqui citadas, de ter seguido este caminho e, mais uma vez, conquistar um objetivo.

*“If I have seen a little further it is by
standing on the shoulders of Giants”*

Isaac Newton

RESUMO

A ocorrência da leucemia aguda resulta de uma combinação de mutações e alterações em funções protéicas que conferem a capacidade de proliferação, defeito na diferenciação e apoptose celular. Síndromes mielodisplásicas (SMD) são desordens hematopoéticas resultantes de alterações na célula pluripotente, caracterizadas por hematopoese ineficaz e alta taxa de evolução para leucemia mieloide aguda (LMA). Células leucêmicas expressam uma variedade de receptores de fatores de crescimento e citocinas, como o receptor do Insulin-like growth factor 1 (IGF-1R). A via de sinalização do IGF-1 inicia-se através da ativação de seu receptor e subsequente ativação de seus substratos, como os substratos do receptor de insulina (IRS). Algumas evidências indicam a participação das proteínas IRS em doenças hematológicas: (1) IRS1 foi descrito como constitutivamente fosforilado e associado ao BCR-ABL em células K562; (2) a expressão de IRS1 foi relacionada com pior prognóstico em leucemia linfóide aguda (LLA) BCR-ABL positiva; (3) IRS2 associa-se ao receptor de eritropoetina; (4) a expressão de IRS2 foi modulada durante estímulos com eritropoetina e IGF-1 e em processos de diferenciação em células hematopoéticas normais e leucêmicas.

Neste estudo, foi observada a presença da expressão gênica e protéica de IRS1 e IRS2 em células hematopoéticas normais, mielodisplásicas e leucêmicas, entretanto, o padrão de expressão das duas proteínas foi diferente. Em linhagens celulares de leucemia aguda, IRS1 foi expresso em linhagens de leucemia aguda mieloide (P39, K562, NB4, KG-1, e HL60) e linfóide (MOLT4, Jurkat, Raji e Daudi), enquanto que IRS2 foi expresso preferencialmente em linhagens mieloides. Em células hematopoéticas primárias, não houve diferença na expressão de IRS1 entre células hematopoéticas de pacientes com SMD e LMA e controles normais, e a expressão gênica de IRS1 apresentou-se aumentada em amostras de medula óssea de pacientes com LLA em relação aos controles normais. A expressão de IRS2 foi menor nas amostras de medula óssea de pacientes com SMD, LMA e LLA em relação aos controles normais, e a expressão de IRS2 foi menor em pacientes com SMD de alto risco se comparados com SMD baixo risco, de acordo com a classificação FAB, WHO e com número de citopenias.

A participação de IRS2 na diferenciação eritróide de células hematopoéticas normais e mielodisplásicas foi evidenciada através da avaliação da expressão de IRS2 durante a diferenciação eritroide de células progenitoras de medula óssea de doadores normais e de pacientes com SMD. O estudo evidenciou o aumento da expressão de IRS2 durante a diferenciação eritroide, sendo que nas células mielodisplásicas, IRS2 apresentou um menor aumento se comparado às células hematopoéticas normais.

Em células BCR-ABL positivas, a inibição da expressão de IRS1 (realizada através do uso de shRNA mediado por lentivírus específico para IRS1) resultou em inibição da proliferação celular e crescimento clonal, acúmulo de células na fase G0/G1 e redução de células na fase S do ciclo celular. A inibição de IRS1 resultou na inibição da fosforilação das proteínas Akt, P70S6K e ERK. Entretanto, a inibição de IRS1 não modulou a apoptose e as proteínas BCL2, BAX e BAD, assim como não modulou a fosforilação de BCR-ABL e CRKL e não apresentou sinergismo quando associado ao inibidor de tirosina quinase do BCR-ABL (imatinib). Estes dados indicam que IRS1 participa dos processos celulares de proliferação celular e clonogenicidade em células BCR-ABL positivas, através da modulação de Akt, P70S6K e ERK.

Os achados aqui descritos sugerem que IRS1 é expresso em células hematopoéticas normais, mielodisplásicas e leucêmicas, destacando-se sua elevada expressão em células de LLA e sua participação na via de sinalização BCR-ABL. Estes dados indicam que IRS1 pode ser um alvo terapêutico em LLA e leucemia mieloide crônica (LMC), especialmente nas leucemias BCR-ABL positivas e resistentes a inibidores da atividade tirosina quinase do BCR-ABL. Adicionalmente, IRS2 é expresso em células hematopoéticas, destacando-se a sua expressão reduzida em células mielodisplásicas e leucêmicas quando comparadas às células hematopoéticas normais. A reduzida expressão de IRS2 em células hematopoéticas de pacientes com SMD de alto risco quando comparados aos de baixo risco e o reduzido aumento da expressão de IRS2 na diferenciação eritroide de progenitores de pacientes com SMD sugerem que a expressão de IRS2 participa da fisiopatologia das SMD e pode ser um marcador prognóstico nesta doença.

ABSTRACT

Acute leukemia results from a combination of mutations and changes in protein functions that confer the ability of proliferation, and defect in differentiation and apoptosis. Myelodysplastic syndromes (MDS) are hematopoietic disorders caused by alterations in pluripotent cells, characterized by ineffective hematopoiesis and a high rate of progression towards acute myeloid leukemia (AML). Leukemia cells express a variety of receptors for growth factors and cytokines, such as Insulin-like growth factor 1 (IGF-1R). The signaling pathway is initiated by activating its receptor and subsequent activation of its substrates such as insulin receptor substrate (IRS). There is evidence that suggests an involvement of IRS proteins in hematopoietic disease: (1) IRS1 was described as constitutively phosphorylated and associated with BCR-ABL in K562 cells, (2) the IRS1 expression was associated with a poorer prognosis in BCR-ABL positive acute lymphoblastic leukemia (ALL), (3) IRS2 bind to erythropoietin receptors, (4) IRS2 expression was modulated during stimulation with erythropoietin and IGF-1 during cell differentiation in normal and leukemia hematopoietic cells.

In this study, we observed the presence of the gene and protein of IRS1 and IRS2 in normal hematopoietic, leukemia, and myelodysplastic cells, however, the expression pattern of these proteins was different. In acute leukemia cell lines, IRS1 was expressed in myeloid leukemia cells (P39, K562, NB4, KG-1 e HL60) and lymphoid leukemia cells (MOLT4, Junkat, Raji e Daudi), whereas IRS2 expression was more evident in myeloid cell lines. In primary hematopoietic cells, no difference was observed in IRS1 expression between normal, MDS and AML cells, and the IRS1 expression was increased in bone marrow samples from ALL patients compared to normal controls. IRS2 expression was lower in bone marrow samples from patients with MDS, AML and ALL compared to normal controls, and the IRS2 expression was lower in high risk compared with low risk MDS patients, according to FAB and WHO classification, and number of cytopenias.

The participation of IRS2 in erythroid differentiation of normal and myelodysplastic hematopoietic cells was evidenced by evaluating IRS2 expression during erythroid differentiation of progenitor cells from the bone marrow of normal donors and patients with MDS. The study demonstrated an increase in IRS2 expression

during erythroid differentiation, whereas in myelodysplastic cells, IRS2 showed a smaller increase compared to normal hematopoietic cells.

In BCR-ABL positive cells, IRS1 inhibition (by lentivirus-mediated shRNA specific for IRS1) resulted in inhibition of cell proliferation and clonal growth, accumulation of the cells in G0/G1 phase and reduction of cells in S phase of cell cycle. The IRS1 silencing resulted in inhibition of Akt, P70S6K and ERK phosphorylation. However, IRS1 inhibition did not modulate apoptosis; and the proteins BCL2, BAX and BAD, did not modulate the phosphorylation of BCR-ABL and CRKL, nor did they show synergism when combined with tyrosine kinase inhibitor of BCR-ABL (Imatinib). These data indicate that IRS1 participates in the proliferation and clonogenic of BCR-ABL positive cells by modulation of Akt, P70S6K and ERK.

The findings reported herein suggest that IRS1 is expressed in normal hematopoietic, leukemia and myelodysplastic cells, highlighting its high expression in ALL cells and involvement in the BCR-ABL pathway. These data indicate that IRS1 may be a therapeutic target in ALL and chronic myeloid leukemia (CML), especially in BCR-ABL positive leukemias resistant to inhibitors of tyrosine kinase activity of BCR-ABL. In addition, IRS2 is expressed in hematopoietic cells, highlighting its reduced expression in myelodysplastic and leukemia cells compared to normal hematopoietic cells. The reduced IRS2 expression in high risk when compared to low risk MDS and the lower increase in IRS2 expression during the erythroid differentiation of progenitor cells from MDS patients suggest that the expression of IRS2 participates in the pathophysiology of MDS and may be a prognostic marker in this disease.

LISTA DE ABREVIACÕES:

Akt - *v-akt murine thymoma viral oncogene homolog*
BAD - *BCL2-associated agonist of cell death*
BAX - *BCL2-associated X protein*
BCL2 - *B-cell CLL/lymphoma 2*
BCR-ABL - *Breakpoint cluster region-abelson*
cDNA - *complementary DNA*
CMSP - *Célula mononuclear de sangue periférico*
CRKL - *V-crk sarcoma virus CT10 oncogene homolog (avian)-like*
DNA - *Desoxiribonucleic Acid*
Epo - *eritropoetina*
EpoR - *Receptor de eritropoetina*
ERK - *extracellular signal-regulated kinase*
FAB - *French-American-British*
FITC - *Fluorescein Isothiocyanate*
Grb2 - *growth factor receptor-bound protein 2*
IGF-1 - *Insulin-like growth factor-1*
IGF-1R - *Insulin-like growth factor-1 receptor*
IPSS - *Internacional Prognostic Score System*
IRS - *Insulin Receptor substrate*
LLA - *Leucemia linfóide aguda*
LMA - *Leucemia mieloide aguda*
LMC - *Leucemia mieloide crônica*
MAPK - *mitogen-activated protein kinases*
MOI - *Multiplicity of infection*
MON - *Medula óssea normal*
MTT - *Methylthiazoletetrazolium*
P70S6K - *70 kDa ribosomal protein S6 kinase 1*
PCR - *Polymerase Chain Reaction*
PE - *Phycoeritrine*
PI - *Propidium iodide*
PI3K - *phosphoinositide-3-kinase*
RNA - *Ribonucleic Acid*
shRNA - *short harpin RNA*
siRNA - *RNA interference*
SMD - *Síndrome mielodisplásica*
WHO - *World Health Organization*

LISTA DE TABELAS

Tabela 01. Características dos pacientes com diagnóstico de SMD	62
Tabela 02. Características dos pacientes com diagnóstico de leucemia aguda	63
Tabela 03. Descrição das linhagens leucêmicas.....	64
Tabela 04. Concentração e Sequência dos Iniciadores.....	70
Tabela 05. Efeito do silenciamento de IRS1 nas fases do ciclo celular de células K562.....	93
.....	

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Hipótese das múltiplas etapas da patogênese das SMD. Injúrias iniciais na célula-tronco hematopoética podem ser causadas por reagentes químicos, radiação, drogas citotóxicas ou mutações endógenas. O acúmulo dessas alterações pode afetar o controle do ciclo celular e a transcrição de supressores tumorais, resultando na expansão de clones com SMD, que inicialmente apresentam altas taxas de apoptose. A progressão para LMA, provavelmente não depende da ordem das alterações genéticas, e sim dos genes que são alterados. A etapa final, na transformação leucêmica, pode ocorrer devido ao aumento de proto-oncogenes e/ou por hipermetilação de alvos críticos, resultando na diminuição de apoptose com aumento da proliferação. (adaptado de Nolte *et al.*, 2008(6)) 45
- Figura 2. Representação esquemática da ativação das vias de sinalização por BCR-ABL. Diagrama simplificado das associações entre o BCR-ABL e proteínas de sinalização. (adaptado de Deininger *et al.*, 2000(28) e Kharas e Fruman, 2005(36)) 47
- Figura 3. Representação esquemática da participação de IRS na ativação das cascatas PI3K-Akt/mTOR e MAPK. A ativação de um receptor tirosina quinase, como por exemplo, IGF1-R, resulta na fosforilação em resíduo de tirosina de IRS. A associação de IRS com PI3K resulta na ativação de Akt/mTOR e a associação de IRS com Gbr2 resulta na ativação da cascata MAPK, incluindo ERK. Esses eventos resultam na ativação de síntese protéica, proliferação e sobrevivência. (adaptado de Mardilovich *et al.*, 2009(68))..... 50
- Figura 4. Representação esquemática da estrutura protéica primária de IRS1 e IRS2. Representação esquemática da estrutura primária das proteínas, os domínios conservados PH e PTB e os sítios de interação com os efetores de sinalização PI3K, Gbr2 e SHP2. Note a elevada homologia entre IRS1 e IRS2, e a presença do domínio KRLB em IRS2. (adaptado de Mardilovich *et al.* 2009(68))..... 51
- Figura 5. Representação esquemática das interações de IRS1 em células K562. IRS1 está constitutivamente fosforilado e associado com BCR-ABL, PI3K e Gbr2 em células K562. O tratamento com imatinib resulta na inibição da fosforilação de IRS1. 52
- Figura 6. Gel de agarose denaturante a 1,2% de RNA total. As setas indicam as subunidades 28S e 18S do RNA ribossomal. A presença das subunidades é indicativa do grau de integridade da amostra. 68
- Figura 7. Produtos resultante da PCR para amplificação de $\beta 2$ -*microglobulina* visualizados em gel de agarose. 1: marcador de peso molecular 100 pb, 2: controle negativo, 3 – 8: amplicons. As setas indicam a presença da banda de 300 pb correspondente ao amplicon de $\beta 2$ -*microglobulina*. A presença das bandas é indicativa que a síntese de cDNA foi bem sucedida..... 69
- Figura 8. ΔR_n e ciclos de amplificação do gene *IRS1* (A) e *IRS2* (B). As curvas de amplificação de *IRS1* (A) e *IRS2* são ilustradas na figura. O eixo y indica o ΔR_n (intensidade de fluorescência) e o eixo x indica o número de ciclos..... 77
- Figura 9. Curvas de dissociação do *IRS1* (A) e *IRS2* (B) baseadas na temperatura de anelamento. As temperaturas resultantes da curva de dissociação estão demonstrada na figura. A presença de apenas um pico na curva demonstra a especificidade dos iniciadores..... 78

- Figura 10. Curvas de eficiência de *IRS1*(A) e *IRS2* (B). A figura ilustra os 5 pontos obtidos no teste de eficiência. O eixo y indica o Ct e o eixo x a concentração do cDNA utilizado. Ambos os iniciadores apresentaram 100% de eficiência e uma inclinação de -3,32 78
- Figura 11. Testes de Compatibilidade de *IRS1* com *HPRT* (A) e β -*actina* (B). O eixo y indica os valores de Δ Ct obtidos na fórmula Ct de *IRS1* - Ct do controle endógeno, o eixo x indica o log das diluições de cDNA utilizadas no teste. Ao se traçar uma linha de tendência no gráfico se obtém a fórmula $y=ax+b$, que indica o valor de referência para a compatibilidade onde o valor de “a” deve ficar entre -0,1 e 0,1 para ser considerado compatível para análises. O valor de “a” para *HPRT* (A) foi de -0,0024 e para β -*actina* (B) foi de -0,0125 indicando ótima compatibilidade entre ambos os endógenos para análises com *IRS1* 80
- Figura 12. Testes de Compatibilidade de *IRS2* com *HPRT* (A) e β -*actina* (B). O eixo y indica os valores de Δ Ct obtidos na fórmula Ct de *IRS2* - Ct do controle endógeno, o eixo x indica o log das diluições de cDNA utilizadas no teste. Ao se traçar uma linha de tendência no gráfico se obtém a fórmula $y=ax+b$, que indica o valor de referência para a compatibilidade onde o valor de “a” deve ficar entre -0,1 e 0,1 para ser considerado compatível para análises. O valor de “a” para *HPRT* (A) foi de -0,0052 e para β -*actina* (B) foi de -0,0094 indicando ótima compatibilidade entre ambos os endógenos para análises com *IRS2* 80
- Figura 13. Expressão do RNAm de *IRS1* (A) e *IRS2* (B) em linhagens de células leucêmicas. PCRq em tempo real foi realizado a partir de cDNA de diferentes linhagens de células leucêmicas humanas mieloides (KG-1, NB4, K562, P39 e HL60) e linfoides (Jurkat, MOLT4, Raji e Daudi). O eixo “y” representa a intensidade relativa de expressão de *IRS1* (A) ou *IRS2* (B). A linhagem K562 foi utilizada como amostra calibradora. 81
- Figura 14. Expressão do RNAm de *IRS1* em células hematopoéticas de doadores normais e de pacientes com SMD, LMA e LLA. PCRq foi realizado a partir de cDNA de células totais de MO de pacientes com diagnóstico de SMD (n=30), LMA (n=22) e LLA (n=11) ou de doadores normais (n=12). O eixo “y” representa a intensidade relativa de expressão do RNAm de *IRS1*. Uma amostra de doador normal foi utilizada como amostra calibradora. As linhas horizontais representam a mediana. Note que a expressão do RNAm de *IRS1* foi significativamente maior em pacientes com LLA, quando comparadas à expressão em células hematopoéticas normais ($P=0,0317$). 82
- Figura 15. Expressão de *IRS1* em células totais de medula óssea de pacientes com SMD, de acordo com as classificações franco-americana-britânica (FAB) (A) e Organização Mundial da Saúde (*World Health Organization*; WHO) (B) e de acordo com o número de citopenias (C), sistema de índice prognóstico internacional (*International Prognostic Scoring System*, IPSS) (D) e risco citogenético (E). As linhas horizontais representam a mediana. Uma amostra de doador normal foi utilizada como calibradora. Os valores de *P* resultantes da comparação dos dois grupos estão indicados na figura..... 83
- Figura 16. Expressão do RNAm de *IRS2* em células hematopoéticas de doadores normais e de pacientes com SMD, LMA e LLA. PCRq foi realizado a partir de cDNA de células totais de MO de pacientes com diagnóstico de SMD (n=32), LMA (n=22) e LLA (n=11) ou de doadores normais (n=12). O eixo “y” representa a intensidade relativa de expressão do RNAm de *IRS2*. Uma amostra de doador normal foi utilizada como amostra calibradora. As linhas horizontais representam a mediana. Note que a expressão do RNAm de *IRS2* foi significativamente menor em pacientes com SMD($P=0,0002$), LMA($P=0,0031$), e LLA ($P<0,0001$), quando comparadas à expressão em células hematopoéticas normais. 84

- Figura 17. Expressão de *IRS2* em células totais de MO de pacientes com SMD, de acordo com as classificações franco-americana-britânica (FAB) (A) e Organização Mundial da Saúde (*World Health Organization*; WHO) (B) e de acordo com o número de citopenias (C), sistema de índice prognóstico internacional (*International Prognostic Scoring System*, IPSS) (D) e risco citogenético (E). As linhas horizontais representam a mediana. Uma amostra de doador normal foi utilizada como calibradora. Os valores de *P* resultantes da comparação dos dois grupos estão indicados na figura..... 85
- Figura 18: Expressão protéica *IRS1* e *IRS2* em linhagens leucêmicas. Análise por *Western Blot* da expressão das proteínas *IRS1* e *IRS2* em 50 µg de extratos de linhagens leucêmicas linfóides (MOLT4, Jurkat, Raji e Daudi) e mielóides (P39, K562, NB4, KG-1, e HL60). Extratos totais de células foram incubados com anticorpo anti-*IRS1* (185 kDa) ou anti-*IRS2* (170 kDa). Como controle da quantidade protéica aplicada no gel, a mesma membrana foi incubada com anticorpo anti-Actina (42 kDa). Extrato total de K562 e HL60 foi utilizado como controle de expressão de *IRS1* e *IRS2*, respectivamente. A membrana de nitrocelulose foi revelada com *ECL Western Blot Analysis System*. Note a expressão protéica positiva de *IRS1* em todas as linhagens leucêmicas estudadas, enquanto que a expressão protéica de *IRS2* esteve presente nas linhagens mielóides e em apenas uma das linhagens linfóides estudadas..... 86
- Figura 19: Expressão protéica de *IRS1* em células hematopoéticas normais e de pacientes com SMD, LMA e LLA. Análise por *Western Blot* da expressão protéica de *IRS1* em células hematopoéticas normais (NL) [células mononucleares de sangue periférico (CMSP) (n=3), medula óssea normal (MON) (n=01), e células CD34⁺ de sangue periférico de doadores normais (NL) (n=2)] e de pacientes com SMD (n=3), LMA (n=3) e LLA (n=01). Extratos totais de células foram incubados com anticorpo anti-*IRS1* (185 kDa). Como controle da quantidade protéica aplicada no gel, a mesma membrana foi incubada com anticorpo anti-actina (42 kDa). O extrato total de K562 foi utilizado como controle de expressão de *IRS1* no *Western Blot*. A membrana de nitrocelulose foi revelada com *ECL Western Blot Analysis System*. Note a elevada expressão protéica de *IRS1* no paciente com LLA, em CMSP normal e células CD34⁺ de doadores normais. 87
- Figura 20: Expressão protéica de *IRS2* em células hematopoéticas normais e de pacientes com SMD, LMA e LLA. Análise por *Western Blot* da expressão da proteína *IRS2* em células CD34⁺ de sangue periférico de doadores normais (CD34⁺ NL) (n=3) e células mononucleares de medula óssea de pacientes com LLA (n=01), LMA (n=3) e SMD (n=6). Extratos totais de células foram incubados com anticorpo anti-*IRS2* (170 kDa). Como controle da quantidade protéica aplicada no gel, a mesma membrana foi incubada com anticorpo anti-Actina (42 kDa). O extrato total de Jurkat foi utilizado como controle negativo de expressão de *IRS2* no *Western Blot*. A membrana de nitrocelulose foi revelada com *ECL Western Blot Analysis System*. Note uma maior expressão protéica de *IRS2* nas amostras de células CD34⁺ de sangue periférico de doadores normais..... 88
- Figura 21. Diferenciação eritroide de células CD34⁺ de medula óssea de doadores normais e de pacientes com SMD. Imagens obtidas por citospin com coloração panótica e *Dot plot* representativos de um doador normal (A) e um paciente com SMD (B) nos dias 6 e 12 de diferenciação eritroide. (C) Expressão do receptor de superfície da transferrina (CD71) e glicoforina A (GPA) em células de doadores normais e pacientes com SMD nos dias 6 e 12 de diferenciação eritroide. Barras representam a média±DP do percentual de células duplo positivas para CD71/GPA. (D) Análise por PCRq da expressão de *IRS2* em células CD34⁺ de doadores normais e pacientes com

SMD nos dias 6, 8 e 12 da diferenciação eritroide. As linhas horizontais indicam os valores medianos. Os valores de *P* são indicados na figura..... 89

- Figura 22. ShRNA específico para IRS1 mediado por lentivírus resultou no silenciamento efetivo de IRS1 em células K562. A quantificação da expressão de IRS1 nas células shIRS1 em relação a células shControle. Expressão dos níveis de IRS1 foram normalizado pelos controles endógenos *HPRT* (A) e β -actina (B). Os resultados foram analisados usando $2^{-\Delta\Delta CT}$. (C) Análise por *Western Blot* de extratos protéicos de células shIRS1 e shControl. A membrana foi incubada com anticorpos anti-IRS1 (185 kDa) ou anti-Actina (42 kDa) como controle da quantidade de proteína aplicada no gel. A membrana de nitrocelulose foi revelada com *ECL Western Blot Analysis System*. Os gráficos de barras representam a média±DP das intensidades de bandas de 3 experimentos independentes. A expressão protéica de IRS1 foi corrigida pela expressão de actina correspondente (Scion Imagine software). **P*<0.05, teste *t student*..... 90
- Figura 23. O silenciamento de IRS1 reduz a proliferação celular e não tem efeito sinérgico com o tratamento com mesilato de imatinib em células K562. A proliferação celular foi determinada pelo ensaio de MTT após 48 horas de incubação de células shIRS1 e shControle na ausência ou presença de mesilato de imatinib (0,1; 0,5 ou 1 μ M) e normalizado pelas células shControle não tratadas. Os resultados são apresentados como média± DP de seis replicatas e é representativo de 3 experimentos independentes. **P*=0,0002; teste de *Mann-Whitney*. 92
- Figura 24. O silenciamento do IRS1 reduz a clonogenicidade e não tem efeito sinérgico ao tratamento com mesilato de imatinib em células K562. Colônias contendo células viáveis foram detectadas pela adição de MTT após 8 dias de incubação de células shIRS1 e shControle na ausência ou presença de mesilato de imatinib (0,1; 0,5 ou 1 μ M) e normalizados pelas células shControle sem tratamento. Os resultados são apresentados como média±DP de 3 experimentos independentes realizados em duplicatas. * *P*=0,0007; ***P*=0,0008; teste *t student*. 93
- Figura 25. O silenciamento de IRS1 não altera a apoptose e não tem efeito cumulativo com tratamento com mesilato de imatinib em células K562. A apoptose foi detectada por citometria de fluxo em células shControle e shIRS1 incubadas na ausência ou presença de imatinib (0,1; 0,5 e 1 μ M) por 48 horas, utilizando marcação com anexina-V e PI. Os números indicam a porcentagem de células nos quadrantes. O quadrante inferior direito contém a população de células apoptóticas (anexina-V+/PI-). Os resultados são representativos de três experimentos independentes. 94
- Figura 26. O silenciamento de IRS1 não altera a atividade de caspase-3 e não tem efeito cumulativo com tratamento com mesilato de imatinib em células K562. A atividade de caspase-3 foi detectada por citometria de fluxo em células shControle e shIRS1 incubadas na ausência ou presença de imatinib (0,1; 0,5 e 1 μ M) por 48 horas. Os gráficos de barras representam a média±DP de três experimentos independentes.. 95
- Figura 27. O silenciamento de IRS1 diminui a fosforilação de Akt, P70S6K e ERK1/2 em células K562. *Western blot* de extratos protéicos de células shControle e shIRS1 para avaliação da expressão de fosfo-Akt (A), fosfo-P70S6K (B) e fosfo-ERK1/2 (C); as membranas foram re-incubadas com o anticorpo para detecção da proteína total respectiva. Os gráficos de barras representam a média±DP dos níveis de fosforilação das proteínas normalizados pela proteína total respectiva e são representativos de três experimentos independentes. * *P*>0,05; teste *t student*..... 96

- Figura 28. O silenciamento de IRS1 não modula expressão de BCL2 e BAX e a fosforilação de BAD em células K562. *Western blot* de extratos protéicos de células shControle e shIRS1 para avaliação da expressão de BCL2 (A), BAX (B) e fosfo-BAD (C); as membranas foram re-incubadas com o anticorpo para detecção da proteína total respectiva. Os gráficos de barras representam a média±DP dos níveis das proteínas normalizados pela actina para expressão protéica ou proteína total para fosforilação protéica e são representativos de três experimentos independentes. * $P>0,05$; teste t student..... 96
- Figura 29. O silenciamento de IRS1 não modula a fosforilação de BCR-ABL e CRKL em células K562. Lisados de células shControle e shIRS1 contendo quantidades iguais de proteína foram submetidos à imunoprecipitação (IP) com anticorpo anti-ABL e incubados com anti-fosfotirosina (P-Tyr) (A). Extratos celulares totais foram incubados com anti-fosfoCRKL e normalizado pela expressão de CRKL total (B). Os gráficos de barras representam a média±DP dos níveis das proteínas normalizados pela proteína total respectiva, e são representativos de três experimentos independentes..... 97
- Figura 30. Representação esquemática das interações e da suposta função de IRS2 nas células hematopoéticas. IRS2 associa-se com IGF-1R e EpoR. A ativação desses receptores resulta na ativação de IRS2 que por sua vez, atua na sobrevivência e na diferenciação celular..... 102
- Figura 31. Representação esquemática das interações e da suposta função de IRS1 nas células BCR-ABL positiva. IRS1 se associa com BCR-ABL, PI3K e Grb2 em células K562. A inibição de IRS1 resulta na diminuição da fosforilação de Akt, P70S6k e ERK1/2, o que poderia estar atuando na diminuição da proliferação e crescimento clonal. 104

SUMÁRIO

RESUMO.....	xv
ABSTRACT.....	xix
LISTA DE ABREVIACÕES:.....	xxiii
LISTA DE TABELAS	xxv
LISTA DE FIGURAS	xxvii
SUMÁRIO	xxxvii
INTRODUÇÃO	Erro! Indicador não definido.
Síndromes mielodisplásicas e leucemias agudas	43
BCR-ABL e leucemia	46
Substratos do receptor de insulina	47
IRS1 e sua participação em neoplasias.....	51
IRS2 e sua participação em células hematopoéticas	52
OBJETIVOS	55
Objetivo Geral.....	57
Objetivos Específicos.....	57
CASUÍSTICA	59
Células hematopoéticas normais.....	61
Células hematopoéticas de pacientes com diagnóstico de Mielodisplasia e Leucemia Aguda	61
Linhagens celulares.....	63
MÉTODOS	65
Processamento das amostras.....	67
Extração do RNA total	67
Tratamento do RNA total com DNase I.....	68
Transcrição em cDNA.....	68
PCR quantitativo (PCRq)	69
<i>Western Blot</i>	70
Transdução de lentivírus.....	71
Ensaio de Methylthiazoletetrazolium (MTT)	72
Ensaio de formação de colônia	72
Análises do ciclo celular.....	72
Avaliação de apoptose por marcação com anexina-V e PI	73
Ensaio de atividade de Caspase-3	73
Diferenciação eritroide	73
Imunofenotipagem	74
Análise Estatística.....	74

RESULTADOS.....	75
1. Resultados dos estudos de expressão de IRS1 e IRS2 em células hematopoéticas normais, mielodisplásicas e leucêmicas	77
1.1. Padronização dos iniciadores de IRS1 e IRS2 para PCRq	77
1.2. Seleção e Verificação de Compatibilidade entre <i>IRS1</i> , <i>IRS2</i> e controles endógenos para normalização da expressão gênica.....	79
1.3. Análise da expressão gênica de <i>IRS1</i> e <i>IRS2</i> em linhagens leucêmicas, através da técnica de PCRq81	
1.4. Análise da expressão gênica de IRS1 em amostras de MO e de pacientes com SMD, LMA e LLA, através da técnica de PCRq.....	82
1.5. Análise da expressão gênica de IRS2 em amostras de MO e de pacientes com SMD, LMA e LLA, através da técnica de PCRq.....	84
1.6. Análise da expressão protéica de IRS1 e IRS2 em linhagens leucêmicas, através da técnica de <i>Western Blot</i>	86
1.7. Análise da expressão protéica de IRS1 e IRS2 em pacientes com SMD, LMA e LLA, através da técnica de <i>Western Blot</i>	87
1.8. Análise da expressão gênica de <i>IRS2</i> durante a diferenciação eritroide de células CD34+ derivadas de MO de doadores normais e pacientes com SMD.....	88
2. Resultados dos estudos da função de IRS1 em células BCR-ABL positivas	90
2.1. Avaliação do silenciamento do IRS1 em células K562 por shRNA mediado por lentivírus	90
2.2. Avaliação do efeito do silenciamento do IRS1 na proliferação em células K562.....	91
2.3. Avaliação do efeito do silenciamento do IRS1 na formação de colônias em células K562.....	92
2.4. Avaliação do efeito do silenciamento do IRS1 no ciclo celular em células K562.....	93
2.5. Avaliação do efeito do silenciamento do IRS1 na apoptose em células K562.....	94
2.6. Avaliação do efeito do silenciamento do IRS1 nas vias de sinalização mTOR/Akt e MAPK.....	95
2.7. Avaliação do efeito do silenciamento do IRS1 nas vias de apoptose celular	96
2.8. Avaliação do efeito do silenciamento de IRS1 na fosforilação de BCR-ABL e CRKL	97
DISCUSSÃO	99
CONCLUSÃO	107
REFERÊNCIAS.....	111
Anexos I.....	121
Anexo II.....	125
Apêndice I.....	127

INTRODUÇÃO

Proliferação, diferenciação e apoptose de células hematopoéticas normais e leucêmicas são reguladas, dentre outros fatores, por estímulos extracelulares de citocinas e interações com o microambiente. A resposta a estes estímulos é transmitida da membrana celular ao núcleo através de vias de transmissão de sinalização celular, incluindo a via de JAK/STAT, RAS/Raf/MEK/ERK, e PI3K/Akt(1, 2). A alteração da sinalização normal ocorre como resultado de mutações, alteração de expressão ou ativação dos componentes das vias de sinalização, com conseqüente alteração na regulação da proliferação, diferenciação e apoptose celular. A ocorrência de síndrome mielodisplásica e leucemia aguda resulta de uma combinação de mutações e alterações em funções protéicas que conferem a capacidade de proliferação, defeito na diferenciação e apoptose celular(2-4).

Síndromes mielodisplásicas e leucemias agudas

Síndromes mielodisplásicas (SMD) são desordens hematopoéticas resultantes de alterações na célula pluripotente e caracterizadas por hematopoese ineficaz(5). Anormalidades na diferenciação celular provavelmente estão envolvida na patogênese das SMD(6-8) e a eritropoese é gravemente comprometida levando à anemia e à necessidade de transfusão. Os mecanismos que levam à inefetiva eritropoese devem-se aos defeitos no crescimento, diferenciação ou apoptose do progenitor eritroide(9) e defeitos no receptor de eritropoetina (EpoR)(10) ou na transmissão de sinal da via da eritropoetina (Epo).

As SMD primárias foram classificadas em 1982 pelo grupo cooperativo franco-americano-inglês (FAB) nas seguintes categorias: anemia refratária (AR), anemia refratária com sideroblastos em forma de anel (ARSA), anemia refratária com excesso de blastos (AREB), anemia refratária com excesso de blastos em transformação (AREBt), e leucemia mielomonocítica crônica (LMMC), apresentando dentre estas classes um aumento progressivo no número de precursores imaturos na medula (de 5% até 30% de blastos)(11). Em 2001, a Organização Mundial de Saúde (*World Health Organization*, WHO) propôs uma nova classificação, com modificações que melhoram o valor prognóstico da mesma(12), que foi revisada e atualizada em 2008(13). Esta classificação vem sendo aceita pela comunidade científica. As modificações dizem respeito à: 1) diminuição do número de blastos na medula óssea para definir leucemia mieloide aguda (de 30 para 20%), eliminando o subgrupo anemia refratária com excesso

de blastos em transformação; 2) separação dos subgrupos AR e ARSA em 4 entidades, dependendo se há comprometimento único ou múltiplo das linhagens hematopoiéticas, ou se há deleção do cromossomo 5q; 3) subdivisão do subgrupo AREB em duas categorias dependendo do número de blastos na medula óssea (5-9% blastos ou 10-19% blastos) e sangue periférico; 4) transferência do subgrupo LMMC das SMD para um novo grupo de doenças hematológicas. Deste modo, as mielodisplasias são classificadas, segundo a WHO, nas seguintes categorias: anemia refratária com sideroblastos em anel (ARSA), citopenia refratária com displasia unilinear (CRDU), citopenia refratária com displasias multilinear (CRDM), anemia refratária com excesso de blastos-1 e 2 (AREB-1 e AREB-2), síndrome mielodisplásica não classificada (SMD-N) e SMD associada com deleção isolada no cromossomo 5q (SMD-5q-). O Índice de Prognóstico Internacional (*Internacional Prognostic Score System*; IPSS) nas SMDs, derivado da análise de mais que 800 casos, resultou em classificação prognóstica das SMDs a depender do número de citopenias, número de blastos no aspirado de medula óssea e citogenética. Este índice prognóstico prediz com certa precisão a sobrevida e risco de evolução para LMA(14).

As SMD possuem alta taxa de evolução para leucemia mieloide aguda (LMA) (Figura 1) e a identificação de vias de sinalização celular envolvidas na patogênese das SMDs é de grande importância uma vez que a melhor compreensão destas vias de sinalização pode auxiliar no desenvolvimento de drogas para o tratamento das SMDs de forma a induzir à remissão da doença ou retardar a evolução para LMA. A desregulação de vias de sinalização celular em mielodisplasia tem sido recentemente descrita. Martelli e colaboradores(15) identificaram que células mononucleares de pacientes com mielodisplasia de alto risco apresentam elevada expressão de PI3K, elevada fosforilação de Akt e reduzida expressão de PTEN, quando comparadas às células mononucleares de pacientes com mielodisplasia de baixo risco e de indivíduos normais. A desregulação de múltiplas vias de sinalização celular, incluindo PI3K/Akt é também frequente em LMA(1).

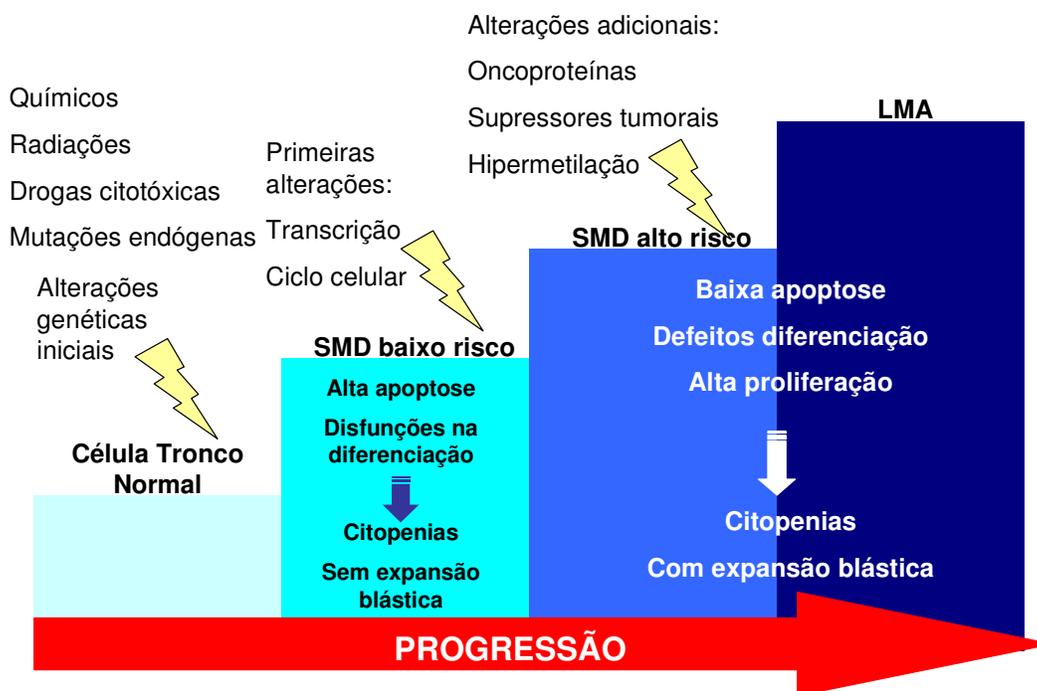


Figura 1. Hipótese das múltiplas etapas da patogênese das SMD. Injúrias iniciais na célula-tronco hematopoética podem ser causadas por reagentes químicos, radiação, drogas citotóxicas ou mutações endógenas. O acúmulo dessas alterações pode afetar o controle do ciclo celular e a transcrição de supressores tumorais, resultando na expansão de clones com SMD, que inicialmente apresentam altas taxas de apoptose. A progressão para LMA, provavelmente não depende da ordem das alterações genéticas, e sim dos genes que são alterados. A etapa final, na transformação leucêmica, pode ocorrer devido ao aumento de proto-oncogenes e/ou por hipermetilação de alvos críticos, resultando na diminuição de apoptose com aumento da proliferação. (adaptado de Nolte *et al.*, 2008(6))

As leucemias agudas constituem um grupo heterogêneo de doenças malignas caracterizadas por defeitos na diferenciação e elevada proliferação de progenitores hematopoéticos, resultando na expansão e acúmulo de blastos(16, 17). Os sintomas mais frequentes são: anemia, neutropenia, trombocitopenia e infiltração de órgãos como fígado, baço, linfonodos, entre outros. As leucemias agudas são subdivididas em leucemia mieloide aguda (LMA) e leucemia linfóide aguda (LLA) dependendo da presença de mieloblastos ou linfoblastos, respectivamente. Em 1976, foi proposta pela FAB uma classificação para LMA em 8 subgrupos, que se baseia em parâmetros morfológicos e citoquímicos(18). As LLAs são subdivididas em 2 grupos, de acordo com características imunológicas: precursor B (LLA-préB) e precursor T (LLA-T), enquanto que as células B maduras são chamadas de linfoma/leucemia de Burkitt (LLA-

B)(19). Adicionalmente, células leucêmicas expressam uma variedade de receptores de fatores de crescimento e citocinas, dentre estes o receptor FLT3(20), c-kit(21), receptor do VEGF (vascular endothelial growth factor receptor-I)(22) e receptor do IGF-1 (Insulin-like growth factor-1)(23).

A via de sinalização do IGF-I é importante no desenvolvimento de diversas neoplasias, como carcinoma de mama, cólon, próstata(24) e mieloma múltiplo(25). A inibição do receptor de IGF1 (IGF1-R) diminui a proliferação de células de mieloma múltiplo “*in vitro*” e “*in vivo*”(25). Recentemente, Chapuis e colaboradores(26) descreveram que a produção autócrina de IGF1 é responsável pela ativação constitutiva de Akt na LMA, contribuindo para o crescimento clonal e proliferação das células leucêmicas. A via de sinalização do IGF-I inicia-se através da ativação de seu receptor e subsequente ativação de seus substratos, como os substratos do receptor de insulina(27).

BCR-ABL e leucemia

A rede de sinalização controlada pela quinase *breakpoint cluster region-abelson* (BCR-ABL) é complexa e altamente redundante(28) (Figura 2), e resulta num fenótipo alterado de casos de LLA Philadelphia positivo (Ph+) e da leucemia mieloide crônica (LMC), uma síndrome mieloproliferativa resultante da proliferação descontrolada das células da medula óssea e inibição da apoptose(29). A presença de BCR-ABL ocorre em 100% dos casos de LMC e em 20-40% dos casos de LLA(30). Esforços significativos estão sendo realizados para a compreensão dos mecanismos moleculares da ação do BCR-ABL, através da identificação das vias de sinalização que são afetadas pela sua atividade tirosina quinase. Inúmeros substratos e ligantes de BCR-ABL têm sido identificados e os esforços atuais estão dirigidos para a investigação dos defeitos patológicos específicos que caracterizam a LMC(31). Apesar da alta expansão na lista das vias de sinalização ativadas por BCR-ABL e da crescente complexidade dessas, todas as funções de transformação pelo BCR-ABL dependem de sua atividade tirosina quinase(32), que é especificamente inibida pelo mesilato de imatinib (Gleevec/Glivec, STI571, Novartis, Basel, Suíça). Mesilato de imatinib é uma pequena molécula inibidora da atividade tirosina da oncoproteína BCR-ABL e induz à parada no crescimento e apoptose em células BCR-ABL positivas(33). No entanto, o desenvolvimento de resistência ao imatinib tem emergido como um problema importante em pacientes com LMC, que na sua maioria se deve à aquisição de mutações no

domínio quinase de BCR-ABL(34, 35). Diferentes estratégias têm sido implementadas para superar essa resistência, incluindo a síntese de novos inibidores ATP-competitivo ou não-ATP-competitivo de BCR-ABL e inibidores tirosina quinase multialvos. Uma abordagem alternativa é o uso de outros compostos que não se ligam diretamente à proteína BCR-ABL, em vez disso, estas moléculas atuam sobre outras proteínas que são reguladas por BCR-ABL e participariam da via de sinalização BCR-ABL e do processo de transformação maligna das células.

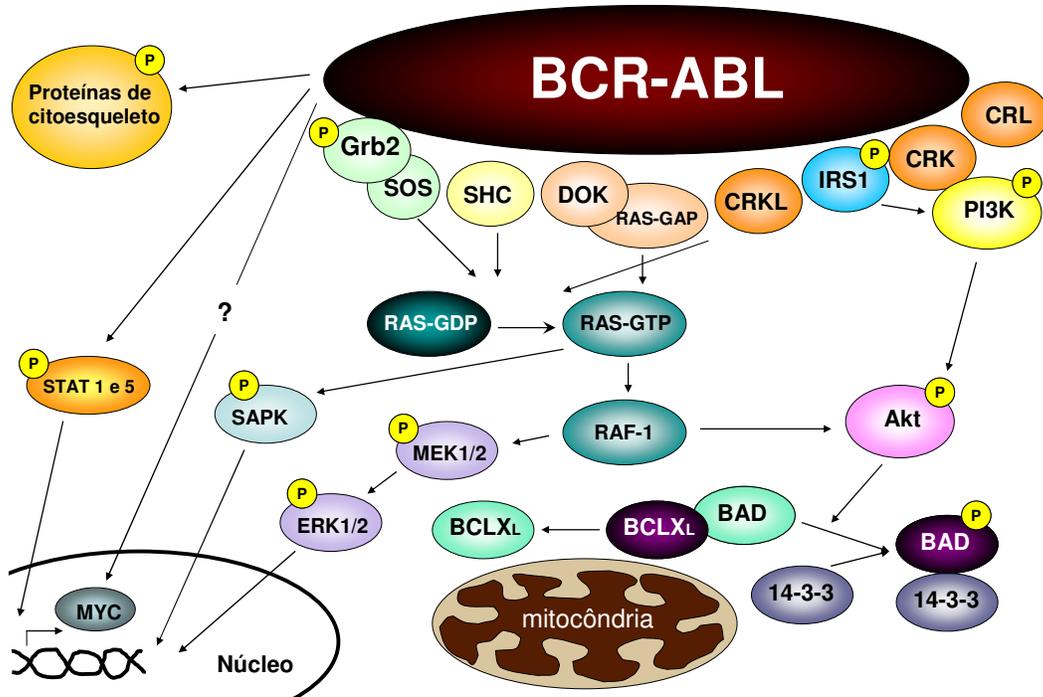


Figura 2. Representação esquemática da ativação das vias de sinalização por BCR-ABL. Diagrama simplificado das associações entre o BCR-ABL e proteínas de sinalização. (adaptado de Deininger *et al.*,2000(28) e Kharas e Fruman, 2005(36))

Substratos do receptor de insulina

Os substratos do receptor de insulina (IRS) são uma família de proteínas citoplasmáticas composta por seis membros (IRS1-6) que atuam como proteínas adaptadoras(37-42). As proteínas IRS integram e coordenam numerosos processos, pois agem intermediando a transmissão dos sinais do meio extracelular ao intracelular através de receptores transmembrana(38). Apesar da proteínas IRS terem sido identificadas pela primeira vez como intermediários de sinalização do receptor de

insulina(38), as proteínas IRS são também as principais moléculas que atuam em resposta ao estímulo de IGF1-R(27, 43). Proteínas IRS regulam uma série de processos como crescimento, metabolismo, sobrevivência e proliferação e respondem a diversos estímulos como, por exemplo, estéroides, citocinas, hormônios e integrinas(44-49).

As proteínas IRS não possuem atividade quinase ou outra atividade enzimática intrínseca, no entanto elas contribuem como adaptadores para organização de complexos de sinalização(38). Os IRS têm níveis elevados de homologia nas regiões N-terminais, que contém dois domínios conservados, que participam no recrutamento por receptores: PH (*pleckstrin homology*) e PTB (*phosphotyrosine binding*). O domínio PH atua em interações proteína-proteína e facilita o recrutamento pelos receptores e proteínas-fosfolipídeos que se localizam na membrana plasmática(50-52). O domínio PTB contém os resíduos de tirosina que interagem com sítios NPXY dos receptores ativados(53, 54).

A ativação das proteínas IRS ocorre após a fosforilação dos resíduos de tirosina na região carboxi-terminal, que contém mais de vinte sítios de tirosina. Uma vez fosforilados, os IRS são capazes de se ligar a várias proteínas contendo domínio SH2, incluindo PI3K, Fyn, Grb2, Nck, Csk e SHP2(42, 55-61). Dessa associação resulta a ativação de múltiplas vias de sinalização, incluindo as importantes vias PI3K-Akt/mTOR e MAPK(55, 62)(Figura 3).

A via de sinalização PI3K desempenha um papel crítico em muitos eventos biológicos incluindo mitogênese, motilidade, metabolismo e sobrevivência celular(63). Existem vários sítios YMXM na região carboxi-terminal das proteínas IRS, que uma vez fosforilados, ligam-se ao domínio SH2 da subunidade p85 da PI3K, com consequente ativação de Akt(48, 55, 62).

A PI3K foi originalmente identificada como um dímero composto de uma subunidade catalítica (p110) e uma subunidade regulatória (p85). A ligação de proteínas fosforiladas ao domínio SH2 da subunidade p85 da PI3K ativa o domínio catalítico associado. A enzima catalisa a fosforilação dos fosfoinosítídeos na posição 3 do anel de inositol produzindo fosfatidilinositol 3,4,5 trifosfato, PI(3,4,5)P3, que ativa substratos intracelulares como a Akt(64). A Akt destaca-se como uma das principais proteínas alvo da PI3K na prevenção da apoptose(65). O efeito antiapoptótico da Akt deve-se à fosforilação de seus substratos, incluindo BAD, caspase 9, NF-kB e a família dos fatores de transcrição tipo forkhead(65). A fosforilação de BAD previne sua interação com BCL-2 e BCL-X, permitindo sua ação antiapoptótica na via mitocondria(66).

As proteínas IRS também se ligam a Grb2, levando à ativação da cascata MAPK, incluindo a proteína ERK. A ativação da cascata MAPK é fundamental para diferenciação e proliferação celular. Além disso, as proteínas IRS podem se ligar a outras proteínas adaptadoras como NCK, CRK, ou Fyn quinase que também resultam na ativação da cascata MAPK(56, 59, 67).

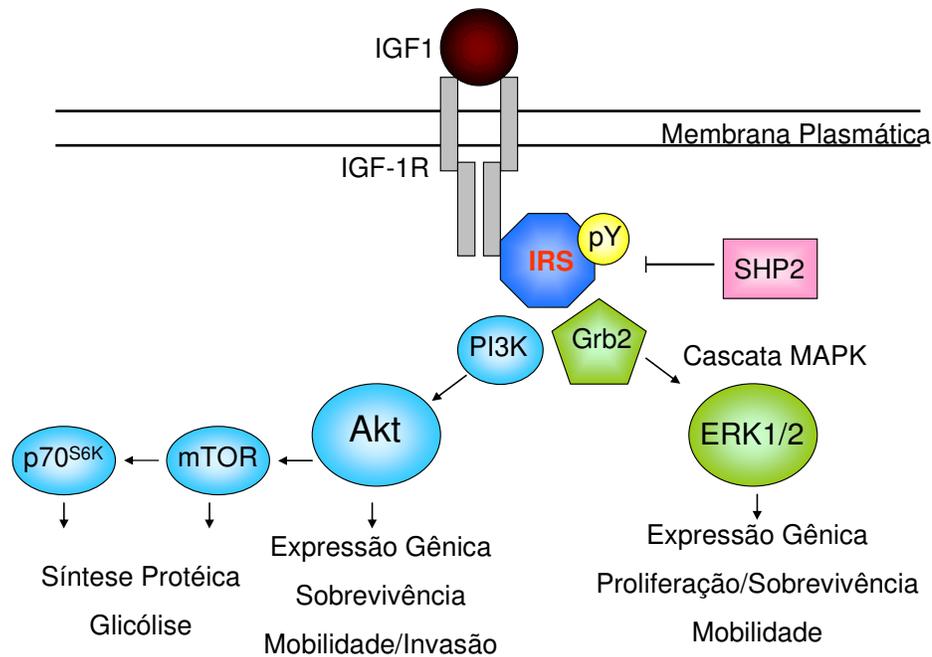


Figura 3. Representação esquemática da participação de IRS na ativação das cascatas PI3K-Akt/mTOR e MAPK. A ativação de um receptor tirosina quinase, como por exemplo, IGF1-R, resulta na fosforilação em resíduo de tirosina de IRS. A associação de IRS com PI3K resulta na ativação de Akt/mTOR e a associação de IRS com Grb2 resulta na ativação da cascata MAPK, incluindo ERK. Esses eventos resultam na ativação de síntese protéica, proliferação e sobrevivência. (adaptado de Mardilovich *et al.*, 2009(68))

IRS1 foi o primeiro membro das proteínas IRS a ser identificado e clonado, está localizado no cromossomo 2 (banda 2q-36-37) e a proteína resultante possui peso molecular de 185 kDa(38). IRS2 está localizado no cromossomo 13 (banda 13q34.1) e a proteína resultante possui peso molecular de 170 kDa(39).

Apesar de IRS1 e IRS2 terem estruturas semelhantes e de ambos interagirem com efetores de sinalizações comuns como PI3K, Grb2 e SHP2, IRS1 tem sido mais frequentemente associado ao crescimento tumoral e proliferação, enquanto IRS2 tem sido associado à motilidade e invasão(68). IRS2 possui um domínio adicional ao IRS1, o domínio KRLB (*kinase regulatory loop binding*) que contribui para o recrutamento por receptores(53, 54, 69) (Figura 4).

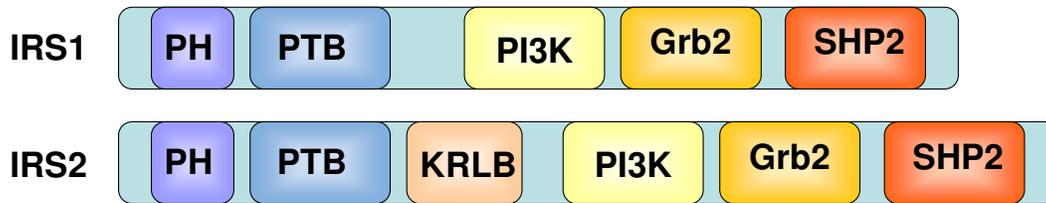


Figura 4. Representação esquemática da estrutura proteica primária de IRS1 e IRS2. Representação esquemática da estrutura primária das proteínas, os domínios conservados PH e PTB e os sítios de interação com os efetores de sinalização PI3K, Grb2 e SHP2. Note a elevada homologia entre IRS1 e IRS2, e a presença do domínio KRLB em IRS2. (adaptado de Mardilovich *et al.* 2009(68))

IRS1 e sua participação em neoplasias

Alguns estudos relatam que as proteínas IRS possuem sua expressão alterada em alguns tipos de câncer, podendo atuar como oncogenes e induzir transformação maligna(68). A maior parte desses estudos focou na expressão de IRS1 e IRS2, visto que são os membros da família IRS que, em condições normais, estão presentes na maioria dos tecidos(70).

IRS1 tem sido descrito como altamente expresso e constitutivamente ativado em muitos tipos de câncer, incluindo câncer de mama(71-73), ovário(74), próstata(75), pâncreas(76), mesotelioma(77), hepatoma(78, 79) e meduloblastoma(80), seu potencial na transformação maligna também tem sido relatado(81-83). Interessantemente, IRS1 foi encontrado menos expresso em tumores com baixos índices de diferenciação(73, 84).

Em 2003, nosso grupo de pesquisa descreveu que IRS1 é constitutivamente fosforilado e associado com BCR-ABL em células K562, um modelo de leucemia mieloide crônica (LMC)(85). Nesse estudo, IRS1 foi descrito como associado a PI3K e Grb2, e o tratamento com mesilato de imatinib resultou na diminuição tempo e dose-dependente da fosforilação de IRS1(85) (Figura 5). Esse conjunto de dados sugere a formação de um complexo BCR-ABL/IRS1/Grb2/PI3K, onde o status de fosforilação de IRS1 via BCR-ABL é importante na manutenção da estabilidade do complexo, uma vez que o tratamento com imatinib resultou em diminuição significativa da associação IRS1/PI3K e IRS1/Grb2, com conseqüente atenuação na atividade de PI3K e da via de sinalização MAPK. No entanto, o papel biológico e a função do IRS1 nas vias sinalização de BCR-ABL, Akt e MAPK continuam uma questão a ser esclarecida.

Outro estudo realizado por Juric e colaboradores(30) observou, através de análises computacionais de dados obtidos de *microarray*, que a expressão de *IRS1* foi negativamente correlacionada com a sobrevida, independente da idade e contagem de leucócitos no momento do diagnóstico, em pacientes com LLA BCR-ABL positivos.

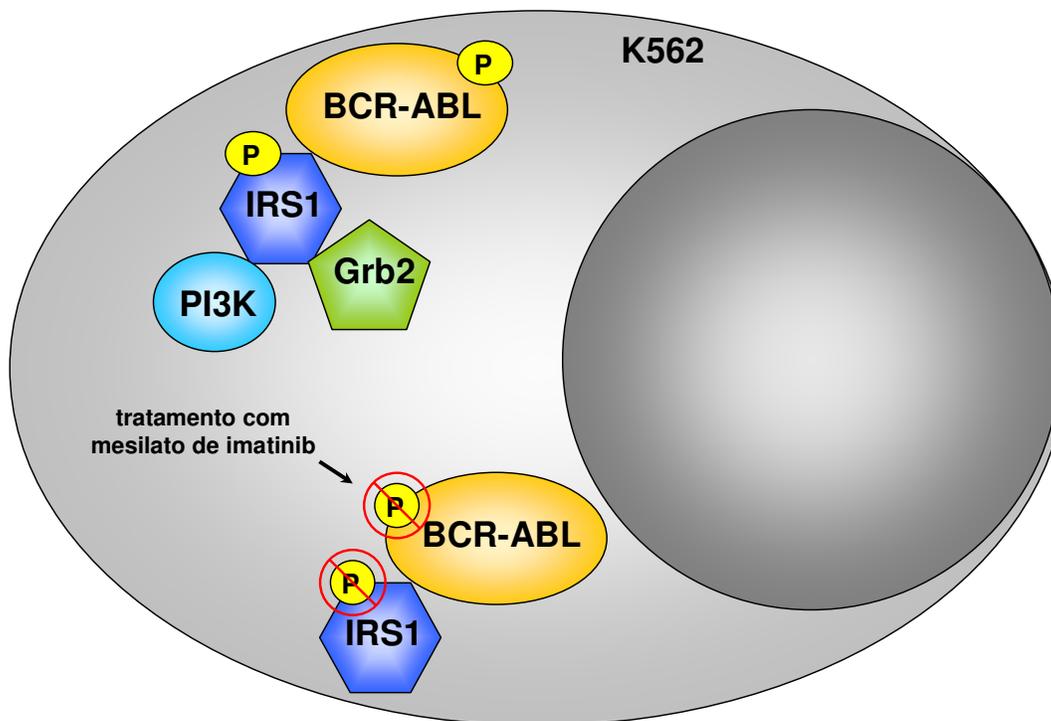


Figura 5. Representação esquemática das interações de IRS1 em células K562. IRS1 está constitutivamente fosforilado e associado com BCR-ABL, PI3K e Grb2 em células K562. O tratamento com imatinib resulta na inibição da fosforilação de IRS1.

IRS2 e sua participação em células hematopoéticas

Assim como IRS1, IRS2 também tem sido descrito como altamente expresso em alguns tipos de câncer(77-79, 86-88). IRS2 é uma proteína adaptadora que se liga ao IGF1-R e ao EpoR (89, 90). A Epo é um fator de crescimento necessário para a sobrevivência, proliferação e diferenciação eritroide(91). A Epo se liga ao EpoR, um membro da superfamília de receptores de citocinas, levando à ativação do receptor e de processos intracelulares associados à JAK2(92). Como resultado da fosforilação em tirosina do EpoR ocorre o recrutamento de várias proteínas contendo o domínio *Src-homology-2* (SH2), como IRS2, levando à ativação de diferentes vias de sinalização(93).

IRS2 é fosforilado em resposta a Epo em células de medula óssea normal e na linhagem leucêmica UT-7(90). Durante a indução de diferenciação granulocítica da

linhagem leucêmica HL60, foi observado um aumento da expressão e fosforilação de IRS2 em resposta à IGF1, sem detecção de expressão de IRS1(94). Esses dados sugerem que IRS2 possa desempenhar um papel na diferenciação de células hematopoéticas.

Em vista dos dados da literatura que indicam a importância de IRS1 e IRS2 no processo de transformação neoplásica e em diferentes processos em células hematopoéticas, como a associação de IRS1 com a oncoproteína BCR-ABL e participação de IRS2 na via de sinalização da Epo, as seguintes perguntas foram formuladas: (1) Estariam IRS1 e IRS2 diferencialmente expressos em células hematopoéticas normais, mielodisplásicas e leucêmicas? (2) Haveria alteração na expressão de IRS2 durante o processo de diferenciação eritroide? (3) Qual seria o papel funcional de IRS1 nas células BCR-ABL positivas? Para responder a estas questões surgem os objetivos deste trabalho.

OBJETIVOS

Objetivo Geral

Caracterizar a expressão gênica e protéica de IRS1 e IRS2 em células hematopoéticas normais e leucêmicas, avaliar a expressão de IRS2 durante a diferenciação de progenitores hematopoéticos e verificar a função de IRS1 em células leucêmicas BCR-ABL positivas.

Objetivos Específicos

1. Caracterizar a expressão gênica e protéica de IRS1 e IRS2 em células hematopoéticas normais e células hematopoéticas de pacientes com SMD, LMA e LLA.
2. Caracterizar a expressão de *IRS2* durante a indução de diferenciação eritroide em doadores normais e em pacientes com SMD.
3. Em células K562:
 - a-) Avaliar os efeitos do silenciamento de IRS1 na proliferação, clonogenicidade, ciclo celular e apoptose.
 - b-) Avaliar os efeitos do silenciamento de IRS1 na vias de sinalização Akt/mTOR e MAPK.
 - c-) Avaliar os efeitos do silenciamento de IRS1 na fosforilação de BCR-ABL e CRKL.

CASUÍSTICA

Células hematopoéticas normais

As células hematopoéticas normais foram obtidas de sangue periférico (n=9) ou de medula óssea (n=17) de doadores normais, incluindo 9 homens e 3 mulheres, com idade mediana de 35 anos (18-56 anos) do Hemocentro da Unicamp com aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa e consentimento informado.

Células hematopoéticas de pacientes com diagnóstico de Mielodisplasia e Leucemia Aguda

As amostras foram obtidas de medula óssea de pacientes atendidos no ambulatório de Hematologia do Hemocentro da Unicamp, com aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa e consentimento informado. As amostras foram coletadas no momento do diagnóstico de mielodisplasia ou de leucemia aguda, antes de qualquer tratamento. Utilizamos neste estudo as amostras que foram coletadas entre o período de Maio de 2001 a Outubro de 2009, que apresentavam os dados hematológicos do diagnóstico, confirmação do diagnóstico de mielodisplasia ou de leucemia aguda através de mielograma, citoquímica e imunofenotipagem, e que apresentavam RNA de boa qualidade no momento da realização dos experimentos. Foi incluído um total de 32 pacientes com diagnóstico de SMD e 33 pacientes com diagnóstico de leucemia aguda, sendo 22 LMA e 11 LLA. As características dos pacientes com SMD e com leucemia aguda estão descritas nas tabelas 1 e 2, respectivamente.

Tabela 01. Características dos pacientes com diagnóstico de SMD

	Número
Pacientes	32
Sexo	
Masculino/Feminino	17/15
Idade (anos), mediana (faixa)	73,3 (17-90)
FAB	
AR/ARSA	14/4
AREB/AREBt	9/5
WHO	
CRDU/ CRDM/ARSA	2/11/4
AREB-1/AREB-2	8/4
LMA com alterações relacionadas com mielodisplasia *	3
Número de Citopenias	
0 ou 1 citopenia	14
2 ou 3 citopenias	18
IPSS	
baixo-risco/ INT-1	8/16
INT-2/ alto-risco	6/2
Citogenética	
Normal	26
Monossomia 7	1
Trisomia 8	1
-Y	1
Complexo	3

Abreviações: SMD: síndrome mielodisplásica; FAB: *French-American-British*, AR: anemia refratária; ARSA: anemia refratária com sideroblastos em anel; AREB: anemia refratária com excesso de blastos; AREBt: anemia refratária com excesso de blastos em transformação; WHO: *World Health Organization*, CRDU: Citopenia refratária com displasia unilinear, CRDM: citopenia refratária com displasia multilinear, ARSA: anemia refratária com sideroblastos em anel, AREB-1: anemia refratária com excesso de blastos-1, AREB-2: anemia refratária com excesso de blastos-2, LMA: leucemia mieloide aguda, IPSS: *International Prognostic Scoring System*, INT-1: intermediário-1, INT-2: intermediário-2.* Excluído das análises da classificação WHO.

Tabela 02 - Características dos pacientes com diagnóstico de leucemia aguda

	Número
Pacientes com LMA	22
Sexo	
Masculino/Feminino	13/9
Idade (anos), mediana (faixa)	52,3 (24-81)
FAB	
M0	1
M1	4
M2	7
M3	2
M4	3
M5	2
M6	1
M7	2
Pacientes com LLA	11
Sexo	
Masculino/Feminino	5/6
Idade (anos), mediana (faixa)	31,5 (20-62)
FAB	
LLA-T	6
LLA-préB	3
LLA-B	2

Abreviações: LMA: leucemia mieloide aguda; FAB: *French-American-British*; LLA: leucemia linfóide aguda.

Linhagens celulares

Linhagens celulares humanas de leucemias agudas foram adquiridas no ATCC, Philadelphia, USA. Foram utilizadas linhagens linfóides (MOLT4, Jurkat, Raji e Daudi) e linhagens mielóides (P39, K562, NB4, KG1, e HL60). A descrição das linhagens leucêmicas está na Tabela 3.

Tabela 3. Descrição das linhagens leucêmicas.

Linhagem	Descrição
MOLT4	LLA T
Jurkat	LLA T
Raji	LLA B/Linfoma de Burkitt
Daudi	LLA B/Linfoma de Burkitt
P39	Leucemia mielomonocítica secundária à mielodisplásia
K562	Leucemia mieloide crônica em fase blástica, t(9;21)
NB4	Leucemia promielocítica aguda, t(15;17)
KG1	Eritroleucemia
HL60	Leucemia mielocítica aguda

MÉTODOS

Processamento das amostras

Para obtenção de RNA, células de medula óssea (MO) foram coletadas em EDTA e submetidas à lise de hemácias com tampão contendo cloreto de amônio. A seguir, as células foram submetidas à extração de RNA.

Para extração protéica, as células mononucleares de MO ou sangue periférico foram obtidas através de gradiente de separação Ficoll-Hypaque (Sigma, St. Louis, MO) e submetidas à extração protéica.

Para separação de progenitores CD34⁺, as células mononucleares de MO ou de sangue periférico foram isoladas em gradiente de Ficoll-Hypaque (Sigma, St. Louis, MO) e separadas através de colunas de imunoafinidade MIDI-MACS, de acordo com as instruções do fabricante (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Alemanha). Após purificação, as células foram submetidas a ensaios de diferenciação ou extração protéica.

Extração do RNA total

O RNA de células foi isolado utilizando Trizol (Life Technologies, USA). O Trizol é um reagente que apresenta uma solução monofásica de fenol e isotiocianato de guanidina. A extração de RNA com esse reagente é uma adaptação do método desenvolvido por Chomczinski e Sacchi(95). Ao precipitado de células, contendo 5×10^6 a 1×10^7 células, foi acrescentado 1 mL de Trizol e a amostra foi homogeneizada até que se tornasse bastante fluida. A purificação do RNA deu-se segundo o protocolo do fabricante. A quantificação do RNA obtido foi realizada através da leitura da densidade óptica (DO) de uma alíquota da amostra em espectrofotômetro com comprimento de onda equivalente a 260 nm, considerando que 1 DO a 260 nm equivale a 40 µg/mL de RNA. A relação entre as leituras realizadas a 260 e 280 nm foi utilizada como parâmetro na estimativa do grau de contaminação do RNA por proteínas, e esse varia normalmente entre 1,6 e 1,8. A qualidade das amostras de RNA obtidas após a extração foi avaliada através de eletroforese em gel de agarose denaturante com formaldeído 1,2% e as bandas 28 e 18S foram visualizadas em luz ultravioleta (Figura 6).

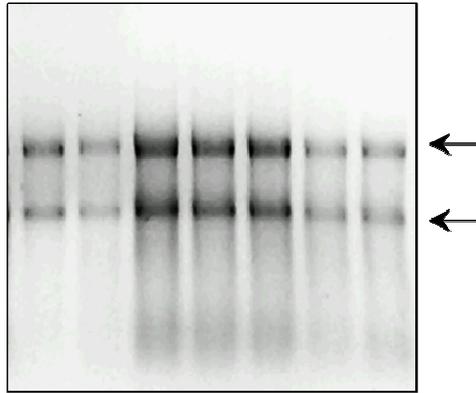


Figura 6. Gel de agarose denaturante a 1,2% de RNA total. As setas indicam as subunidades 28S e 18S do RNA ribossomal. A presença das subunidades é indicativa do grau de integridade da amostra.

Tratamento do RNA total com DNase I

O RNA total de células foi tratado com DNase livre de RNase 1 U/ μ L (Life Technologies), utilizando 1 U da enzima para tratar 5 μ g de RNA por 15 minutos à temperatura ambiente, a fim de eliminar uma possível contaminação deste material com DNA genômico. A reação foi interrompida pela adição de uma solução de EDTA com concentração final de 2 mM. A enzima foi inativada por uma incubação de 10 minutos a 65°C.

Transcrição em cDNA

As amostras de RNA total, contendo 5 μ g de RNA e tratadas com DNase I, foram transcritas reversamente em cDNA (híbrido RNA-cDNA) em uma reação de volume final de 20 μ L (Life Technologies). A reação foi iniciada adicionando aos 5 μ g de RNA tratado 1 μ L de oligonucleotídeo (dT) 500 μ g/mL e 1 μ L da mistura (10 mM) de cada desoxinucleotídeo trifosfato (dATP, dCTP, dTTP, dGTP). Essa mistura foi aquecida por 5 minutos a 65°C, e, em seguida, incubada no gelo. Adicionou-se, então, 4 μ L do tampão de reação 5x, contendo 250 mM Tris-HCl (pH 8,3), 375 mM KCl, 15 mM MgCl₂ e 0,1 M DTT, e 200 U enzima transcriptase reversa SuperScript II, que catalisa a reação de extensão da fita complementar. Essa mistura foi incubada por 50 minutos à 42°C. A seguir, foi feita a desnaturação da reação por 15 minutos a 70°C e finalmente foram adicionadas 40 unidades de Rnase H e a solução incubada por 20 minutos a 37°C. As amostras de cDNA foram quantificadas através do espectrofotômetro de luz ultravioleta (Gene Quant-Pharmacia).

Como controle da transcrição em cDNA foi realizado uma PCR para o gene $\beta 2$ -*microglobulina*. A PCR para amplificação de $\beta 2$ -*microglobulina* foi realizada para um volume final de 50 μ L de reação que contém: 1,5 μ L do cDNA sintetizado, 5 μ L de tampão de reação, 3 μ L $MgCl_2$ 50 mM, 2,5 unidades de Taq polimerase e 200 nM de cada iniciador. Foi realizado um controle negativo, sem adição de cDNA. As sequências dos iniciadores de $\beta 2$ -*microglobulina* utilizados foram: FW: ATGTCTCG CTCCGTGGCCTTAGCT; RV: CCTCCATGATGCTGCTTACATGTC. O programa foi composto de 5 minutos de desnaturação à 94°C, seguido por 35 ciclos de 40 segundos à 94°C, 40 segundos à 55°C e 40 segundos à 72°C, com uma fase final de 72°C por 7 minutos, os fragmentos resultantes contém 300 pb e foram visualizadas em luz ultravioleta em gel de agarose 2%.(Figura 7).

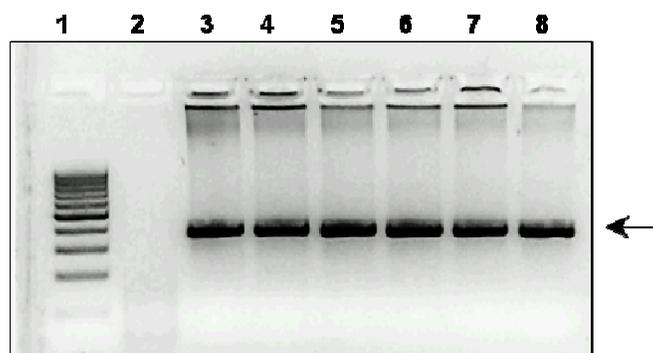


Figura 7. Produtos resultante da PCR para amplificação de $\beta 2$ -*microglobulina* visualizados em gel de agarose. 1: marcador de peso molecular 100 pb, 2: controle negativo, 3 – 8: amplicons. As setas indicam a presença da banda de 300 pb correspondente ao amplicon de $\beta 2$ -*microglobulina*. A presença das bandas é indicativa que a síntese de cDNA foi bem sucedida.

PCR quantitativo (PCRq)

Amplificação em tempo real foi realizada no ABI 7500 Sequence Detector System (Applied Biosystems) utilizando-se SybrGreen PCR Master Mix (Applied Biosystems).

Quarenta ng de cada amostra de cDNA foram utilizados na reação com os iniciadores. As concentrações e as sequências dos iniciadores são descritas na Tabela 4. 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. Cada reação foi repetida três vezes no mesmo experimento. As expressões de *HPRT* ou β -*actina* foram utilizadas como controle endógeno e uma amostra de cDNA de um doador normal foi utilizada como a amostra

calibradora. A quantificação relativa da expressão gênica da *IRS1* e *IRS2* foi calculada utilizando-se a fórmula $2^{-\Delta\Delta CT}$ (96).

Tabela 4. Concentração e Sequência dos Iniciadores.

Gene	Concentração	Sequência dos Iniciadores
<i>IRS1</i>	600 nM	FW: 5' TGA CCA TGC AGA TGA GTT GTC C 3' RW: 5' CGC ATG TCA GCA TAG CTT ACA G 3'
<i>IRS2</i>	300 nM	FW: 5' GAGTGCACCCGTACCTATGGAA 3' RW: 5' GAAATCCGGCTTTACCTTGA ACT G 3'
<i>β-Actina</i>	150 nM	FW: 5' AGG CCA ACC GCG AGA AG 3' RW: 5' ACA GCC TGG ATA GCA ACG TAC A 3'
<i>HPRT</i>	150 nM	FW: 5' GAA CGT CTT GCT CGA GAT GTG A 3' RW: 5' TCC AGC AGG TCA GCA AAG AAT 3'

Western Blot

Ao precipitado celular contendo 5×10^6 a 1×10^7 células foi acrescentado tampão de extração de proteínas contendo 100 mM Tris (pH 7.6), 1% Triton X-100, 150 mM NaCl, 0,1 mg Aprotinina, 35 mg PMSF/mL, 10 mM Na_3VO_4 , 100 mM NaF, 10 mM $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$, e 4 mM EDTA. As amostras foram homogeneizadas até que se tornassem bastante fluidas. Após 30 minutos a 4°C, essas amostras passaram por um processo de centrifugação a 4°C durante 20 minutos para remoção dos restos celulares. Ao produto do extrato total proteico, adicionou-se tampão de Laemmli contendo 100 mmol/L de ditioneitol e aqueceu-se em água fervente por 4 minutos. Após isso, as amostras foram submetidas à eletroforese ou armazenadas a -80°C. Para produção de imunoprecitado adicionou-se às alíquotas o anticorpo de interesse e proteína A-Sepharose 6MB. Após o término da incubação e da lavagem, os precipitados foram ressuspensos em tampão de Laemmli contendo 100 mmol/L de ditioneitol e aquecidas em água fervente por 4 minutos. Em seguida, as proteínas imunoprecipitadas foram submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida 8%-SDS-PAGE em aparelho de eletroforese (Mini-Protean, Bio-Rad Laboratories, Richmond, Ca). A eletrotransferência das proteínas do gel para a membrana foi realizada em 90 minutos a 120 V (constante) em aparelho miniaturizado de transferência da Bio-Rad. A ligação dos anticorpos a proteínas não-específicas foi reduzida por pré-incubação da membrana por 1 hora com tampão de bloqueio (5% leite em pó magro, 10 mmol/L Tris, 150 mmol/L NaCl, e 0.02% Tween 20) a 4°C. A

membrana de nitrocelulose foi então incubada com anticorpos específicos diluídos em tampão de bloqueio (0.3% de leite em pó magro) por 12 horas a 4°C e então lavadas 3 vezes com solução basal (10 mmol/L Tris, 150 mmol/L NaCl, and 0.02% Tween 20). Os anticorpos primários utilizados foram obtidos da Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA): anticorpos monoclonais que reconhecem o fosfotirosina (p-Tyr) (sc-508), ABL (sc-23), p-ERK (sc-7383), P70S6K (sc-8418), CRKL (sc-319), BAX (sc-20067) e anticorpos policlonais que reconhecem actina (sc-1616), IRS1 (sc-559), Akt1/2 (sc-8312), p-P70S6K (sc-7984), BCL2 (sc-492), p-BAD (sc-7999) e BAD (sc-943). Anticorpos monoclonais que reconhecem p-Akt (9271) and p-CRKL (3181) foram obtidos da Cell Signaling Technology (Cell Signaling, Danvers, MA, USA) e Anti-ERK1/2 (13-6200) da Zymed (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). O sistema de revelação usado foi baseado em quimioluminêscencia, e realizado de acordo com orientações do fabricante, ECLTM *Western Blot Analysis System* (Amersham Pharmacia Biotech, UK). Em suma, as membranas foram incubadas por 1 hora com o anticorpo secundário, conjugado à HRP (Horseradish peroxidase), lavadas novamente, e então submetidas ao substrato da enzima, resultando em um produto luminescente, detectado por autoradiografias em filmes Kodak XAR (Eastman Kodak, Rochester, NY). Análises quantitativas da intensidade das bandas de proteínas foram determinadas utilizando-se o *Scion Image software* (ScionCorp, Frederick, MD, USA). A intensidade de expressão protéica foi normalizada pela expressão da actina e a intensidade da fosforilação protéica foi normalizada pela expressão da proteína correspondente.

Transdução de lentivírus

Células K562 foram transduzidas com lentivírus contendo *short hairpin RNA* controle não específico (sc-108080) ou shRNA alvo IRS1 (sc-29376) da Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA) e nomeadas como células shControle e shIRS1, respectivamente. Resumidamente, 2×10^5 células foram transduzidas com lentivírus através da técnica de inoculação através da centrifugação, que consiste em centrifugar as células por 30 minutos à 800g na presença de 3 µg/mL de polibrene (Sigma, St. Louis, MO, EUA). O número de partículas virais por célula (multiplicity of infection; MOI) foi igual a 0,5. Após a transdução as células foram selecionadas com 1,75 µg/mL de puomicina (Sigma, St. Louis, MO, EUA) por 15 dias antes dos experimentos.

Ensaio de Methylthiazoletetrazolium (MTT)

O crescimento celular foi mensurado pelo ensaio de Methylthiazoletetrazolium (MTT; Sigma, St. Louis, MO, EUA). Células shControle e shIRS1 foram submetidas à privação de soro fetal bovino (SFB) à 0.5% por 12 horas. Um total de 5×10^4 células por poço foram plaqueadas em uma placa de 96 poços em meio RPMI 10% SFB na ausência ou presença de diferentes concentrações de mesilato de imatinib (0,1; 0,5 ou 1 μM) por 48 horas. Em resumo, 10 μL de uma solução à 5mg/mL de MTT foram adicionadas nos poços e incubadas à 37°C por 4 horas. A reação foi parada pela adição de 100 μL de 0,1N HCl em isopropanol. O crescimento celular foi avaliado pela mensuração da absorbância à 570 nm, utilizando um leitor automático de placas. Todas as condições foram testadas em seis replicatas.

Ensaio de formação de colônia

A formação de colônias foi realizada em meio semissólido de metilcelulose ($0,5 \times 10^3$ células/mL; MethoCult 4230; StemCell Technologies Inc., Vancouver, BC, Canada). As colônias foram detectadas após 8 dias de cultura pela adição de 1mg/mL de reagente MTT e as contagens foram realizada com o auxílio do *Image J quantification software* (U.S. National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA). Células shControle e shIRS1 foram submetidas ao ensaio de formação de colônias na ausência ou presença de mesilato de imatinib (0,1; 0,5 ou 1 μM). Todas as condições foram testadas em duplicatas.

Análises do ciclo celular

As células foram fixadas em etanol 70%, por pelo menos 2 horas à 4°C antes das análises e incubadas com 20 $\mu\text{g/mL}$ de iodeto de propídio (propidium iodide; PI) contendo 10 $\mu\text{g/mL}$ de RNase A por 30 minutos à temperatura ambiente. As análises da fluorescência celular foram realizadas com um FACSCalibur (Becton–Dickinson, CA, USA). Os resultados das distribuições do DNA foram analisados pelo Modifit (Verify Software House Inc., Topsham, ME, USA) para se determinar as proporções de células nas fases do ciclo celular.

Avaliação de apoptose por marcação com anexina-V e PI

Células shControle e shIRS1 foram semeadas em placas de 12 poços e tratadas com diferentes concentrações de mesilato de imatinib (0,1; 0,5 ou 1 μ M) por 48 horas. As células foram então lavadas duas vezes com PBS gelado e ressuspensas em tampão de ligação contendo 1 μ g/mL de PI e 1 μ g/mL de FITC anexina-V (Becton–Dickinson, CA, USA). Após incubação no escuro durante 15 minutos em temperatura ambiente, todas as amostras foram analisadas em um FACSCalibur. Dez mil eventos foram adquiridos para cada amostra.

Ensaio de atividade de Caspase-3

A atividade da caspase-3 foi medida conforme as instruções recomendadas pelo fabricante (Calbiochem, LaJolla, CA, EUA). Células shControle e shIRS1 foram semeadas em placa de 6 poços e tratadas ou não com diferentes concentrações de mesilato de imatinib (0,1; 0,5 ou 1 μ M) por 48 horas. As células (10^6 células/mL) foram incubadas com FITC-DEVD-FMK (1:300) em meio não suplementado durante 40 minutos a 37°C em atmosfera húmida de 5% de CO₂. As células foram então lavadas, ressuspensas em meio não suplementado e analisadas por FACS usando o canal FL-1.

Diferenciação eritroide

Para a diferenciação eritroide, amostras de MO foram coletadas de quatro pacientes com SMD (IPSS: risco baixo e intermediário-1; FAB: AR; WHO: CRDM; citogenética normal) e quatro doadores normais. Células CD34⁺ foram semeadas em placas de cultura de plástico contendo meio de metilcelulose com eritropoietina (Epo) (3 IU/mL) (Janssen-Cilag), *Stem Cell Factor* (50 ng/mL) (Peprotec, Colonia Banjidal, México) e Interleucina 3 (30 IU/mL) (Peprotec) e foram incubadas a 37°C em uma atmosfera de 5% de dióxido de carbono durante 6 dias. As células resultantes (unidades formadoras de colônias eritroides e proeritroblastos) foram então cultivadas em alfa-MEM (Gibco BR, Carisbad, CA, EUA), contendo 30% SFB (Sigma, St. Louis, MO, EUA), 10^{-5} M 2-mercaptoetanol (Sigma), 2 IU/mL EPO, 300 mg/mL holotransferrina (Sigma), e 1% de albumina de soro bovino (Calbiochem, Darmstadt, Alemanha) por mais oito dias. Após 6, 8 e 12 dias de cultura, as células foram coletadas e submetidas a PCRq. Após 6 e 12 dias de cultura, as células foram também submetidas à imunofenotipagem.

Imunofenotipagem

Para investigar a maturação das células eritroides, a expressão de marcadores de superfície celular foi avaliada por dupla marcação com anticorpo antireceptor de transferrina conjugado com FITC (CD71) e anti-Glicoforina-A conjugado com PE (GPA) (Dako, Ely, Reino Unido) que foram incubados junto com as células por 30 minutos, à 4°C, no escuro. As células foram lavadas com PBS (*Phosphate buffered saline*) e ressuspensas em paraformaldeído 1%. Dez mil eventos foram adquiridos com um FACSCalibur (Becton–Dickinson, CA, USA) e analisados através do CellQuest Software (Becton-Dickinson, San Jose, CA, EUA). A marcação não específica foi criada a partir do controle isotípico correspondente e subtraída do percentual de população correspondente positivo.

Análise Estatística

A comparação dos valores da quantidade relativa de expressão do RNAm de *IRS1* e *IRS2* entre os pacientes e doadores normais foi realizada através do teste estatístico de Mann-Whitney U. Nos estudos comparando células K562 submetidas ou não a inibição de IRS1, as comparações entre dois grupos ou condições foram realizadas através dos testes estatístico de Mann-Whitney U ou Student t. Valor de $P < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo.

RESULTADOS

1. Resultados dos estudos de expressão de *IRS1* e *IRS2* em células hematopoéticas normais, mielodisplásicas e leucêmicas

1.1. Padronização dos iniciadores de *IRS1* e *IRS2* para PCRq

Para a verificação da concentração ideal dos iniciadores para *IRS1* e *IRS2*, diferentes concentrações dos iniciadores (150 nM, 300 nM, 400 nM, 600 nM e 800 nM) foram testadas, com o objetivo de identificar a concentração que apresentasse o menor Ct (ciclo de amplificação) e o maior ΔRn (intensidade de fluorescência). Para tanto, foi utilizada a amostra de cDNA da linhagem leucêmica K562, pois a expressão de *IRS1* já havia sido brevemente descrita nesta linhagem celular(85). A concentração escolhida para os genes *IRS1* e *IRS2* foram 600 e 300 nM, respectivamente (Figuras 8 e 9). As reações de PCRq foram realizadas no 7500 Real Time PCR System (Applied Biosystems).

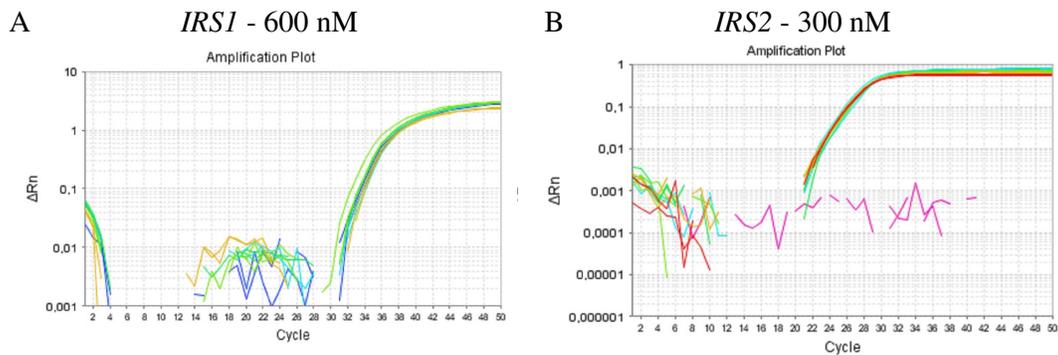


Figura 8. ΔRn e ciclos de amplificação do gene *IRS1* (A) e *IRS2* (B). As curvas de amplificação de *IRS1* (A) e *IRS2* são ilustradas na figura. O eixo y indica o ΔRn (intensidade de fluorescência) e o eixo x indica o número de ciclos.

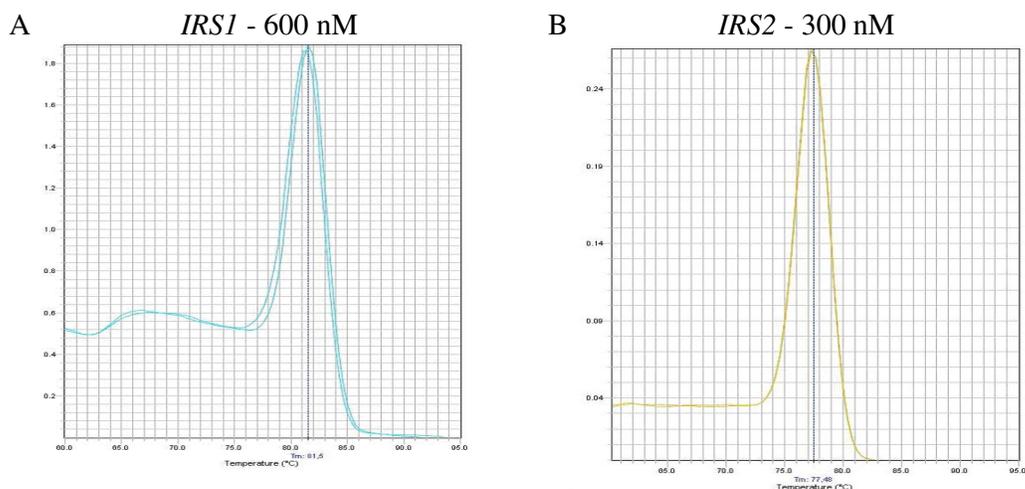


Figura 9. Curvas de dissociação do *IRS1* (A) e *IRS2* (B) baseadas na temperatura de anelamento. As temperaturas resultantes da curva de dissociação estão demonstrada na figura. A presença de apenas um pico na curva demonstra a especificidade dos iniciadores.

A eficiência dos iniciadores para *IRS1* e *IRS2* foi verificada através de uma curva de diluição na ordem de 1:2 com 5 pontos. O experimento foi realizado em duplicata e a concentração inicial da amostra foi de 240 ng. A eficiência ideal é de 100 % com valores toleráveis de 10 % a mais ou a menos, com uma inclinação em torno de -3,32. Após análise, os iniciadores foram considerados com ótima eficiência, a curva de eficiência e a inclinação dos iniciadores *IRS1* e *IRS2* são ilustradas na Figura 10.

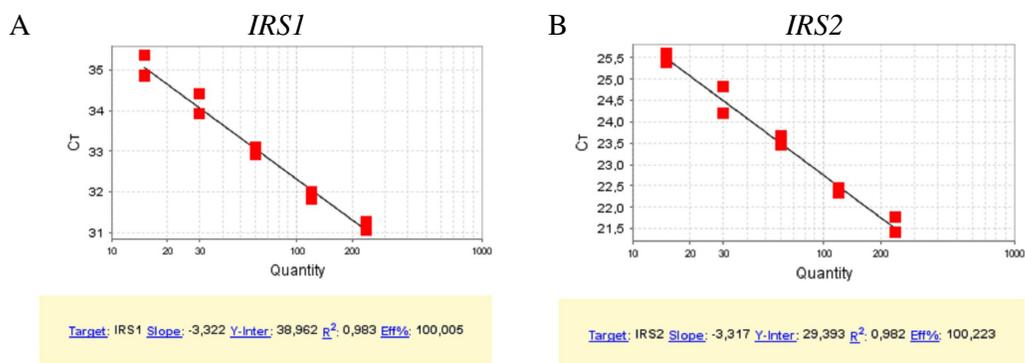


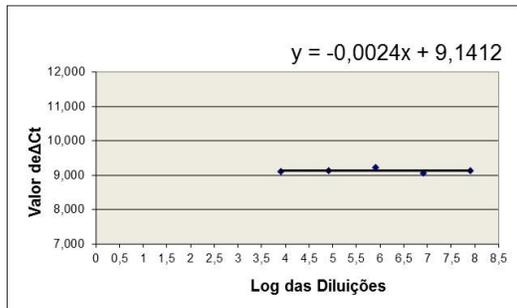
Figura 10. Curvas de eficiência de *IRS1*(A) e *IRS2* (B). A figura ilustra os 5 pontos obtidos no teste de eficiência. O eixo y indica o Ct e o eixo x a concentração do cDNA utilizado. Ambos os iniciadores apresentaram 100% de eficiência e uma inclinação de -3,32.

1.2. Seleção e Verificação de Compatibilidade entre *IRS1*, *IRS2* e controles endógenos para normalização da expressão gênica

O teste de compatibilidade entre controles endógenos com *IRS1* e *IRS2* foi realizado conforme recomendando pela Applied Biosystems, para se verificar qual gene endógeno apresenta a melhor cinética de reação em relação aos genes *IRS1* e *IRS2*. Os controles endógenos testados foram *HPRT* e *β -Actina*, as sequências dos iniciadores são descritas na Tabela 4.

Ambos os genes endógenos *HPRT* e *β -actina* apresentaram ótima cinética de reação com *IRS1* e *IRS2* (Figura 11 e 12). O gene *HPRT* tem sido utilizado com frequência na análise da expressão de genes por PCRq, inclusive em doenças oncohematológicas(97, 98), além disso, o gene *HPRT* apresentou um Ct de expressão muito próximo aos dos genes alvo e teve a menor variação entre as amostras, e foi o gene escolhido para normalização de expressão relativa de *IRS1* e *IRS2*.

A



B

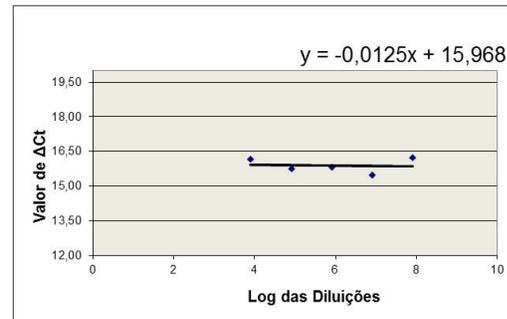
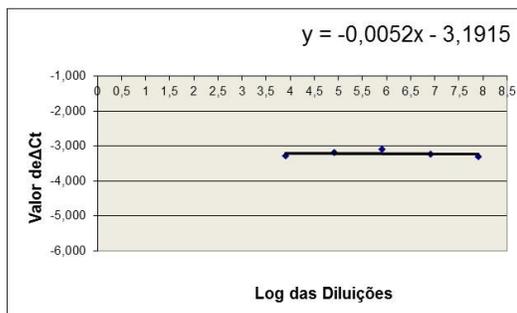


Figura 11. Testes de Compatibilidade de *IRS1* com *HPRT* (A) e β -actina (B). O eixo y indica os valores de ΔCt obtidos na fórmula Ct de *IRS1* - Ct do controle endógeno, o eixo x indica o log das diluições de cDNA utilizadas no teste. Ao se traçar uma linha de tendência no gráfico se obtém a fórmula $y=ax+b$, que indica o valor de referência para a compatibilidade onde o valor de “a” deve ficar entre -0,1 e 0,1 para ser considerado compatível para análises. O valor de “a” para *HPRT* (A) foi de -0,0024 e para β -actina (B) foi de -0,0125 indicando ótima compatibilidade entre ambos os endógenos para análises com *IRS1*.

A



B

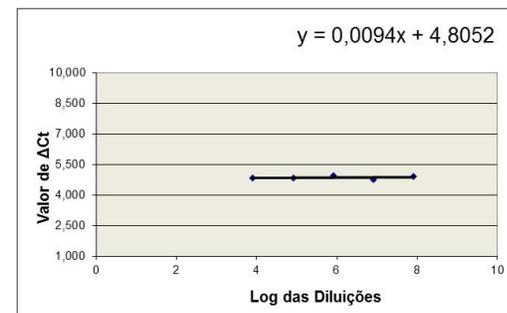


Figura 12. Testes de Compatibilidade de *IRS2* com *HPRT* (A) e β -actina (B). O eixo y indica os valores de ΔCt obtidos na fórmula Ct de *IRS2* - Ct do controle endógeno, o eixo x indica o log das diluições de cDNA utilizadas no teste. Ao se traçar uma linha de tendência no gráfico se obtém a fórmula $y=ax+b$, que indica o valor de referência para a compatibilidade onde o valor de “a” deve ficar entre -0,1 e 0,1 para ser considerado compatível para análises. O valor de “a” para *HPRT* (A) foi de -0,0052 e para β -actina (B) foi de -0,0094 indicando ótima compatibilidade entre ambos os endógenos para análises com *IRS2*.

1.3. Análise da expressão gênica de *IRS1* e *IRS2* em linhagens leucêmicas, através da técnica de PCRq

O estudo através de PCRq em tempo real revelou que a expressão *IRS1* foi evidente em todas as linhagens leucêmicas estudadas, incluindo linhagens linfóides (MOLT4, Jurkat, Raji e Daudi) e mielóides (P39, K562, NB4, KG-1, e HL60) (Figura 13A). A expressão de *IRS2* foi evidente nas linhagens mielóides P39, NB4 e HL60, entretanto a expressão de *IRS2* foi baixa ou ausente em todas as linhagens linfóides estudadas. (Figura 13B)

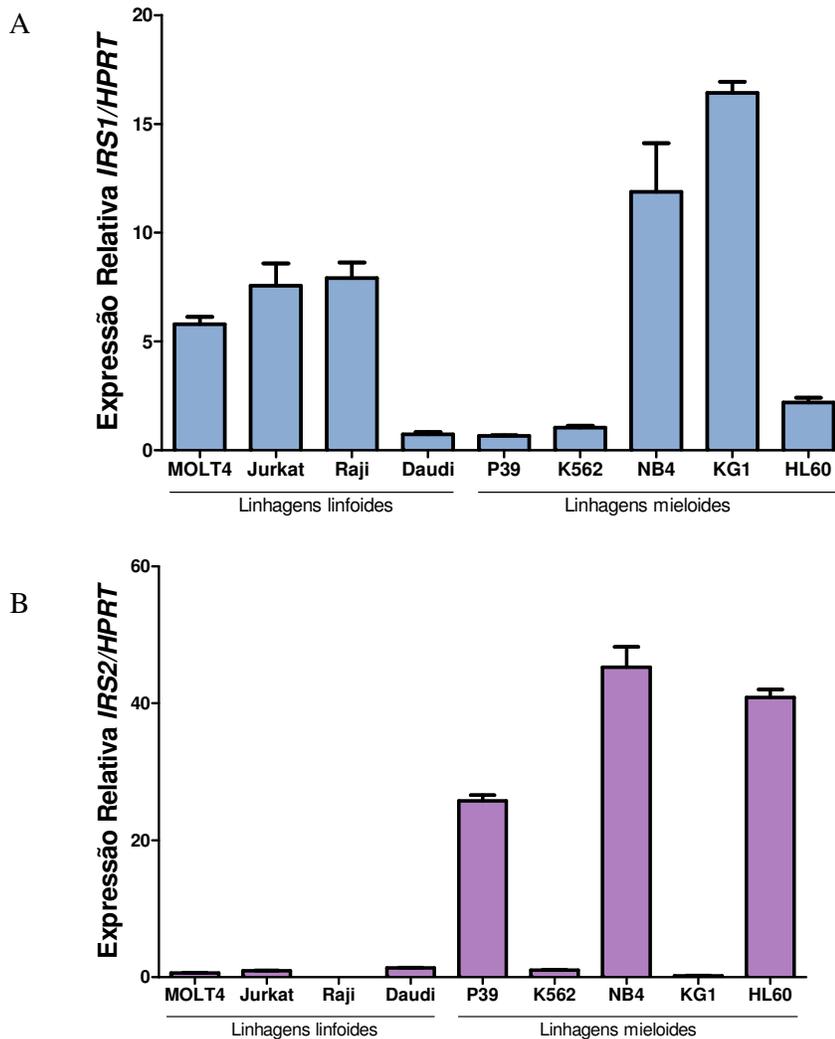


Figura 13. Expressão do RNAm de *IRS1* (A) e *IRS2* (B) em linhagens de células leucêmicas. PCRq em tempo real foi realizado a partir de cDNA de diferentes linhagens de células leucêmicas humanas mielóides (KG-1, NB4, K562, P39 e HL60) e linfóides (Jurkat, MOLT4, Raji e Daudi). O eixo “y” representa a intensidade relativa de expressão de *IRS1* (A) ou *IRS2* (B). A linhagem K562 foi utilizada como amostra calibradora.

1.4. Análise da expressão gênica de *IRS1* em amostras de MO e de pacientes com SMD, LMA e LLA, através da técnica de PCRq

O RNAm de *IRS1* apresentou-se altamente expresso em amostras de MO de pacientes com diagnóstico de LLA, quando comparadas às amostras de células hematopoéticas normais (0,10 [0,006 - 1,41] *versus*(*vs.*) 0,73 [0,09 - 11,64], $P=0,002$). Não foi observada diferença na expressão de *IRS1* em pacientes com SMD e LMA quando comparado às células hematopoéticas normais (Figura 14). Entre os pacientes com diagnóstico de SMD, não foram observadas diferenças na expressão de *IRS1* entre os pacientes SMD baixo e SMD alto risco de acordo com as classificações FAB e WHO, IPSS, número de citopenias e risco de citogenético (Figura 15). Os resultados são apresentados como mediana [máximo - mínimo]

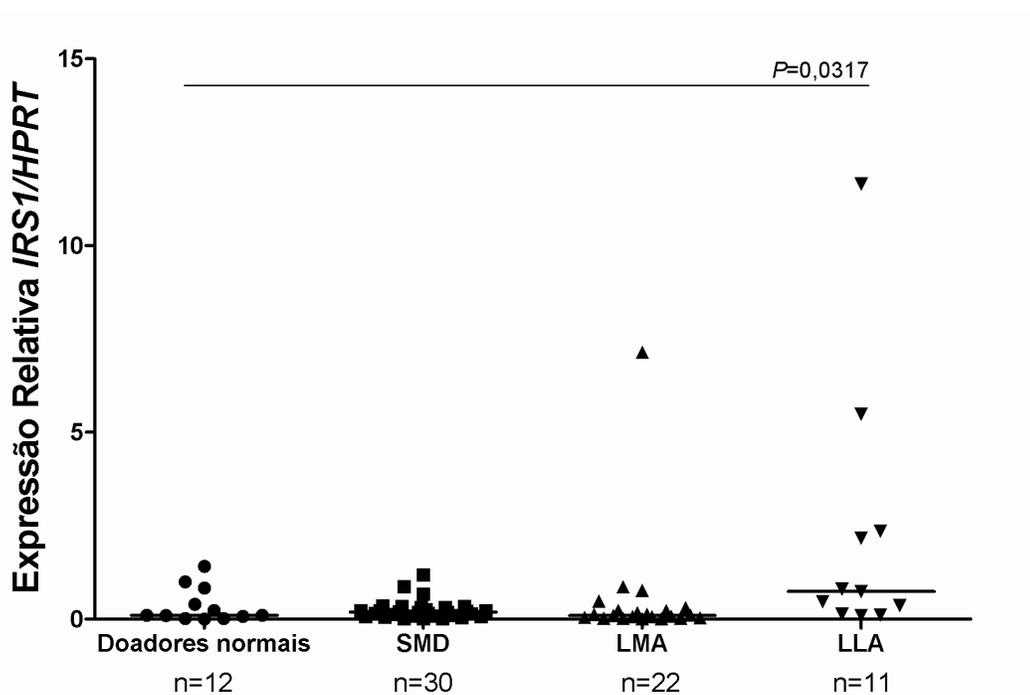


Figura 14. Expressão do RNAm de *IRS1* em células hematopoéticas de doadores normais e de pacientes com SMD, LMA e LLA. PCRq foi realizado a partir de cDNA de células totais de MO de pacientes com diagnóstico de SMD (n=30), LMA (n=22) e LLA (n=11) ou de doadores normais (n=12). O eixo “y” representa a intensidade relativa de expressão do RNAm de *IRS1*. Uma amostra de doador normal foi utilizada como amostra calibradora. As linhas horizontais representam a mediana. Note que a expressão do RNAm de *IRS1* foi significativamente maior em pacientes com LLA, quando comparadas à expressão em células hematopoéticas normais ($P=0,0317$).

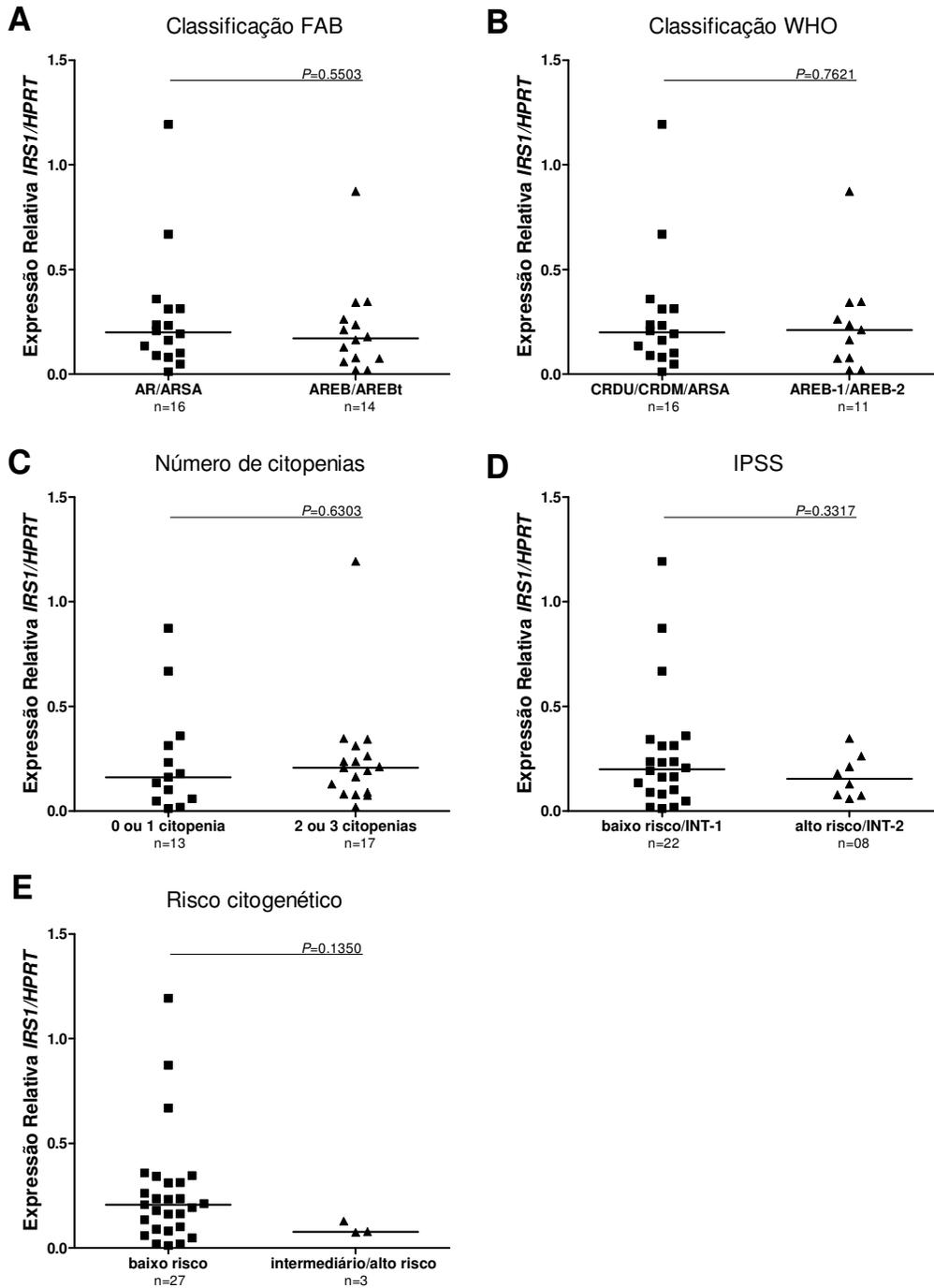


Figura 15. Expressão de *IRS1* em células totais de medula óssea de pacientes com SMD, de acordo com as classificações franco-americana-britânica (FAB) (A) e Organização Mundial da Saúde (*World Health Organization*; WHO) (B) e de acordo com o número de citopenias (C), sistema de índice prognóstico internacional (*International Prognostic Scoring System*, IPSS) (D) e risco citogenético (E). As linhas horizontais representam a mediana. Uma amostra de doador normal foi utilizada como calibradora. Os valores de *P* resultantes da comparação dos dois grupos estão indicados na figura.

1.5. Análise da expressão gênica de *IRS2* em amostras de MO e de pacientes com SMD, LMA e LLA, através da técnica de PCRq

Análises de PCRq mostraram que a expressão de *IRS2* foi significativamente reduzida em pacientes com SMD, LMA e LLA em comparação com os doadores normais (0,74 [0,12 - 4,06]; 0,98 [0,10 - 4,35]; 0,12 [0,01 - 0,53]; 4,70 [0,66 - 11,77], respectivamente, $P < 0,05$) (Figura 16). Nos pacientes com SMD, a expressão de *IRS2* foi significativamente menor em amostras de pacientes com SMD alto risco, quando comparado com SMD baixo risco de acordo com as classificações FAB e WHO, e número de citopenias: FAB (0,34 [0,15–1,56] alto risco vs. 1,13 [0,19–4,06] baixo risco; $P = 0,0031$; Figura 17A), WHO (0,30 [0,12–1,44] vs. 1,12 [0,19–4,06]; $P = 0,0037$; Figura 17B) e número de citopenias (0,35 [0,12–1,91] vs. 1,13 [0,34–4,06]; $P = 0,0053$; Figura 17C). Não foram observadas diferenças entre o grupo de SMD de alto e baixo risco de acordo com IPSS e risco citogenético (Figura 17D e 17E). Os resultados são apresentados como mediana [máximo-mínimo].

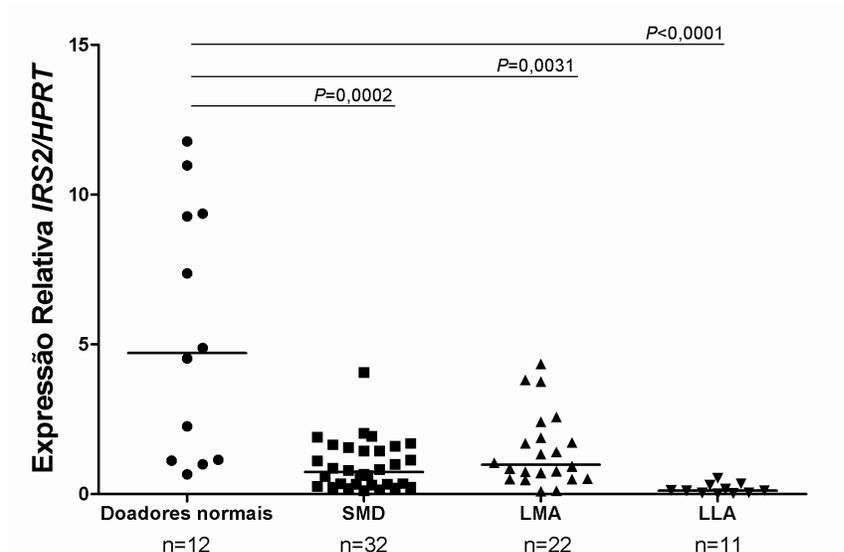


Figura 16. Expressão do RNAm de *IRS2* em células hematopoéticas de doadores normais e de pacientes com SMD, LMA e LLA. PCRq foi realizado a partir de cDNA de células totais de MO de pacientes com diagnóstico de SMD (n=32), LMA (n=22) e LLA (n=11) ou de doadores normais (n=12). O eixo “y” representa a intensidade relativa de expressão do RNAm de *IRS2*. Uma amostra de doador normal foi utilizada como amostra calibradora. As linhas horizontais representam a mediana. Note que a expressão do RNAm de *IRS2* foi significativamente menor em pacientes com SMD ($P = 0,0002$), LMA ($P = 0,0031$), e LLA ($P < 0,0001$), quando comparadas à expressão em células hematopoéticas normais.

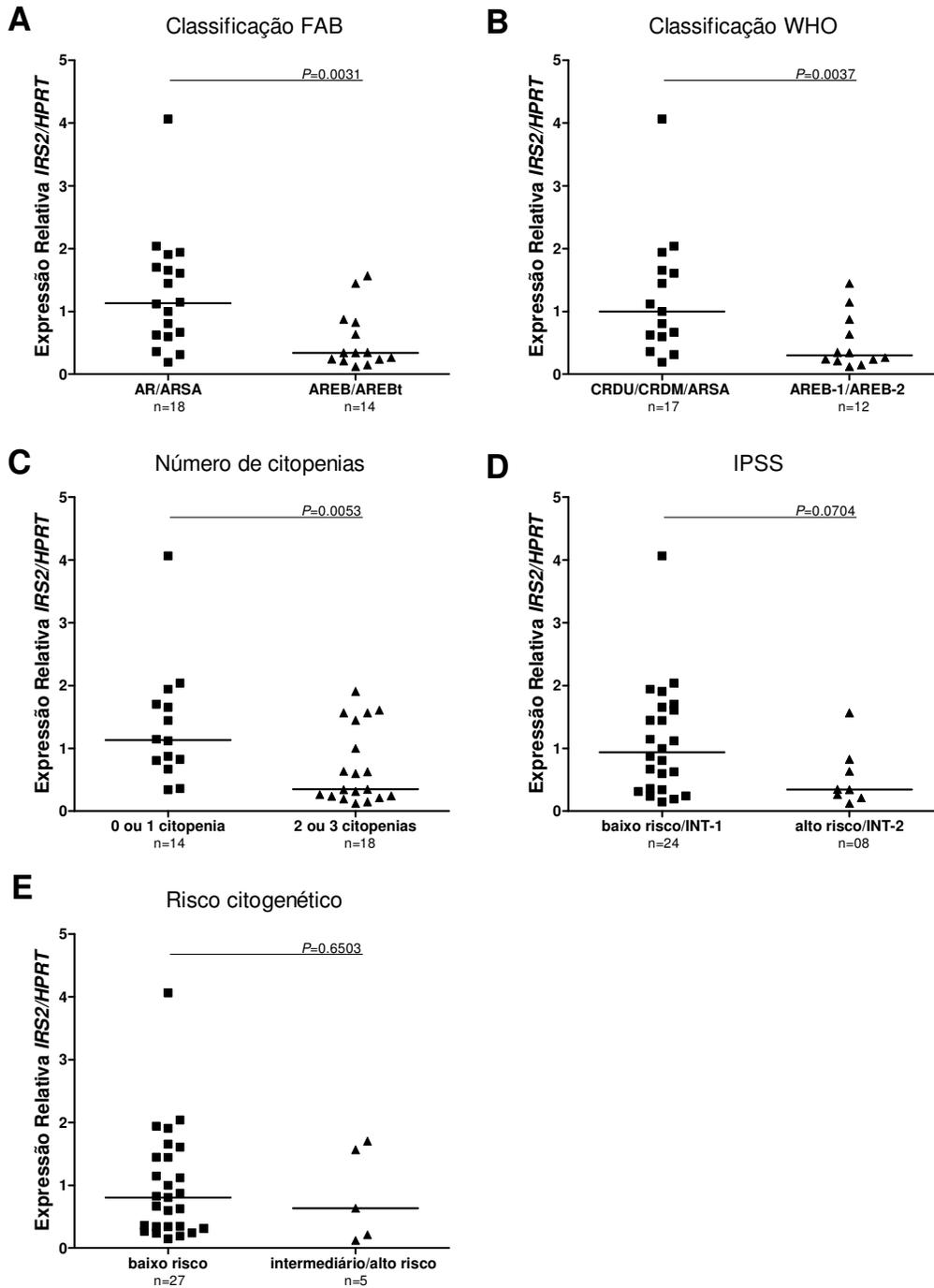


Figura 17. Expressão de *IRS2* em células totais de MO de pacientes com SMD, de acordo com as classificações franco-americana-britânica (FAB) (A) e Organização Mundial da Saúde (*World Health Organization*; WHO) (B) e de acordo com o número de citopenias (C), sistema de índice prognóstico internacional (*International Prognostic Scoring System*, IPSS) (D) e risco citogenético (E). As linhas horizontais representam a mediana. Uma amostra de doador normal foi utilizada como calibradora. Os valores de *P* resultantes da comparação dos dois grupos estão indicados na figura.

1.6. Análise da expressão protéica de IRS1 e IRS2 em linhagens leucêmicas, através da técnica de *Western Blot*

A expressão protéica de IRS1 foi analisada em extrato total de linhagens de células leucêmicas humanas linfoides (MOLT4, Jurkat, Raji e Daudi) e mieloides (P39, K562, NB4, KG-1, e HL60). Através de *Western Blot*, observou-se que a expressão de *IRS1* esteve presente em todas as linhagens leucêmicas analisadas, enquanto que a expressão de *IRS2* esteve presente nas linhagens mieloides e em apenas uma das linhagens linfoides testadas (Daudi). Esses achados corroboram os resultados encontrados no PCRq (Figura 18).

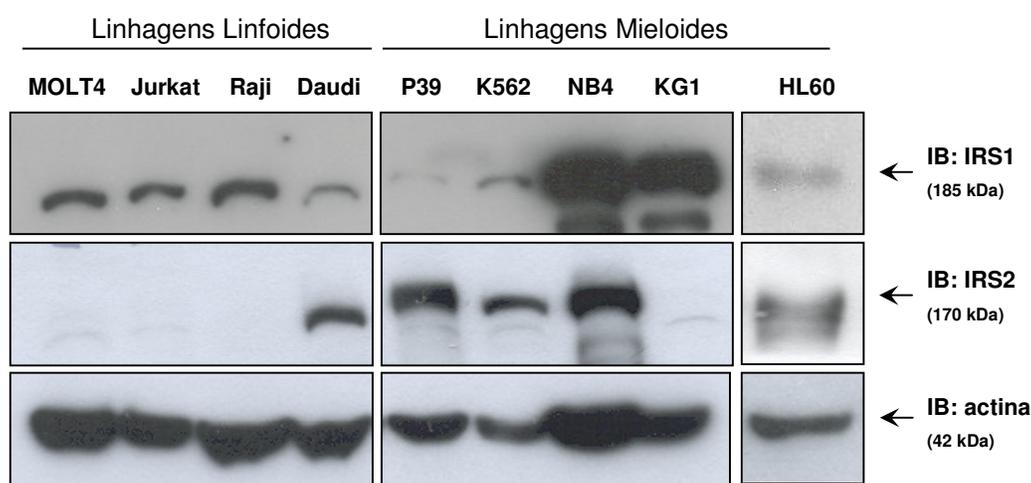


Figura 18: Expressão protéica IRS1 e IRS2 em linhagens leucêmicas. Análise por *Western Blot* da expressão das proteínas IRS1 e IRS2 em 50 μ g de extratos de linhagens leucêmicas linfoides (MOLT4, Jurkat, Raji e Daudi) e mieloides (P39, K562, NB4, KG-1, e HL60). Extratos totais de células foram incubados com anticorpo anti-IRS1 (185 kDa) ou anti-IRS2 (170 kDa). Como controle da quantidade protéica aplicada no gel, a mesma membrana foi incubada com anticorpo anti-Actina (42 kDa). Extrato total de K562 e HL60 foi utilizado como controle de expressão de IRS1 e IRS2, respectivamente. A membrana de nitrocelulose foi revelada com *ECL Western Blot Analysis System*. Note a expressão protéica positiva de IRS1 em todas as linhagens leucêmicas estudadas, enquanto que a expressão protéica de IRS2 esteve presente nas linhagens mieloides e em apenas uma das linhagens linfoides estudadas.

1.7. Análise da expressão protéica de IRS1 e IRS2 em pacientes com SMD, LMA e LLA, através da técnica de *Western Blot*

O estudo da expressão protéica de IRS1 em células hematopoéticas normais de MO e leucêmicas revelou a expressão de IRS1 em uma amostra de LLA (n=1) e ausência de expressão em células mononucleares de MO de doador normal (MON) (n=01), de pacientes com SMD (n=13) e de pacientes com LMA (n=6). Estes dados corroboram os resultados obtidos através de PCRq. Células mononucleares (n=6) e células CD34⁺ (n=2) de sangue periférico de doadores normais apresentaram expressão de IRS1 (Figura 19)

A expressão de IRS2 foi evidente em células CD34⁺ (n=3) de sangue periférico normal. Células de MO de pacientes com diagnóstico de SMD (n=13), LMA (n=3) e LLA (n=01) apresentaram baixa expressão de IRS2 (Figura 20)

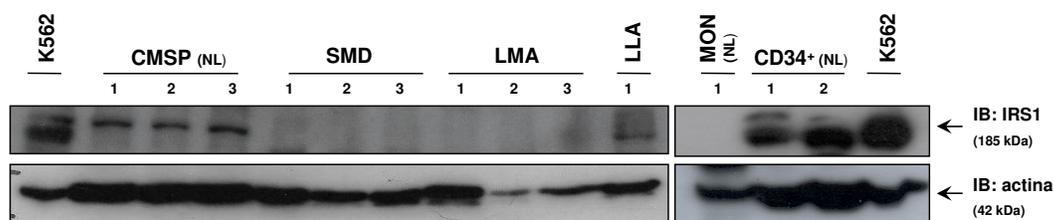


Figura 19: Expressão protéica de IRS1 em células hematopoéticas normais e de pacientes com SMD, LMA e LLA. Análise por *Western Blot* da expressão protéica de IRS1 em células hematopoéticas normais (NL) [células mononucleares de sangue periférico (CMSP) (n=3), medula óssea normal (MON) (n=01), e células CD34⁺ de sangue periférico de doadores normais (NL) (n=2)] e de pacientes com SMD (n=3), LMA (n=3) e LLA (n=01). Extratos totais de células foram incubados com anticorpo anti-IRS1 (185 kDa). Como controle da quantidade protéica aplicada no gel, a mesma membrana foi incubada com anticorpo anti-actina (42 kDa). O extrato total de K562 foi utilizado como controle de expressão de IRS1 no *Western Blot*. A membrana de nitrocelulose foi revelada com ECL *Western Blot* Analysis System. Note a elevada expressão protéica de IRS1 no paciente com LLA, em CMSP normal e células CD34⁺ de doadores normais.

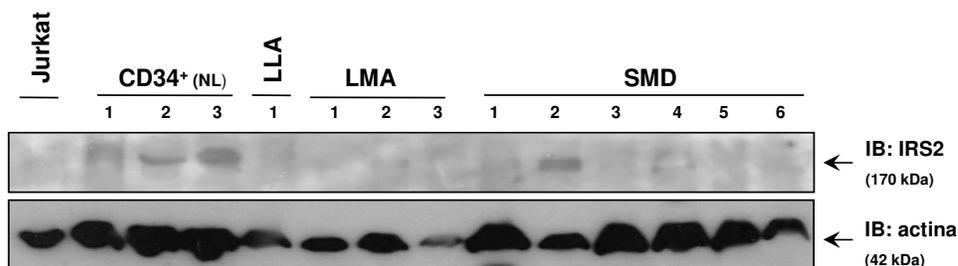


Figura 20: Expressão protéica de IRS2 em células hematopoéticas normais e de pacientes com SMD, LMA e LLA. Análise por *Western Blot* da expressão da proteína IRS2 em células CD34⁺ de sangue periférico de doadores normais (CD34⁺ NL) (n=3) e células mononucleares de medula óssea de pacientes com LLA (n=01), LMA (n=3) e SMD (n=6). Extratos totais de células foram incubados com anticorpo anti-IRS2 (170 kDa). Como controle da quantidade protéica aplicada no gel, a mesma membrana foi incubada com anticorpo anti-Actina (42 kDa). O extrato total de Jurkat foi utilizado como controle negativo de expressão de IRS2 no *Western Blot*. A membrana de nitrocelulose foi revelada com ECL *Western Blot* Analysis System. Note uma maior expressão protéica de IRS2 nas amostras de células CD34⁺ de sangue periférico de doadores normais.

1.8. Análise da expressão gênica de *IRS2* durante a diferenciação eritroide de células CD34⁺ derivadas de MO de doadores normais e pacientes com SMD

Células CD34⁺ de MO de doadores normais (n=4) e de pacientes com SMD de baixo risco (n=4) foram submetidas à diferenciação eritroide e análise da expressão de *IRS2*. A diferenciação eritroide foi determinada por citometria de fluxo, e os níveis de transcritos *IRS2* foram avaliados por PCRq. A diferenciação eritroide foi semelhante em células de doadores normais e de pacientes com SMD como evidenciado pela expressão de Glicoforina A (GPA) e transferrina (CD71) que são marcadores da diferenciação eritroide (Figura 21). A expressão de *IRS2* foi avaliada nos dias 6, 8 e 12 da diferenciação eritroide. Interessantemente, no dia 12 de cultura houve um aumento de 8,25 vezes na expressão de *IRS2* nas células de doadores normais enquanto que as células de pacientes com SMD apresentaram um aumento de apenas 3,89 vezes na expressão de *IRS2*. Ou seja, o aumento na expressão de *IRS2* foi menor nas células derivadas de pacientes com SMD se comparados com doadores normais, durante a diferenciação eritroide.

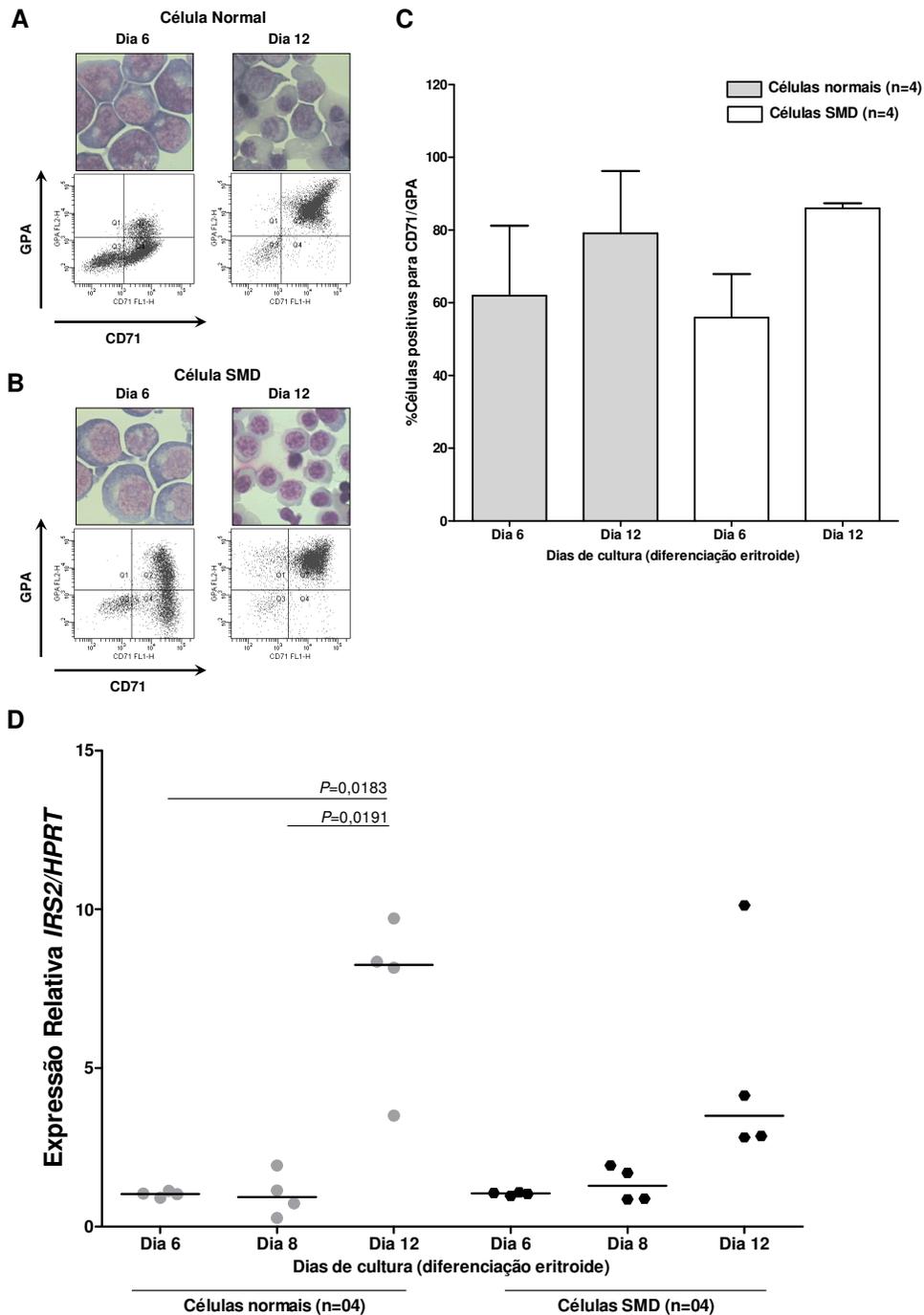


Figura 21. Diferenciação eritróide de células CD34+ de medula óssea de doadores normais e de pacientes com SMD. Imagens obtidas por citospin com coloração panótica e *Dot plot* representativos de um doador normal (A) e um paciente com SMD (B) nos dias 6 e 12 de diferenciação eritróide. (C) Expressão do receptor de superfície da transferrina (CD71) e glicoforina A (GPA) em células de doadores normais e pacientes com SMD nos dias 6 e 12 de diferenciação eritróide. Barras representam a média±DP do percentual de células duplo positivas para CD71/GPA. (D) Análise por PCRq da expressão de *IRS2* em células CD34⁺ de doadores normais e pacientes com SMD nos dias 6, 8 e 12 da diferenciação eritróide. As linhas horizontais indicam os valores medianos. Os valores de *P* são indicados na figura.

2. Resultados dos estudos da função de IRS1 em células BCR-ABL positivas

2.1. Avaliação do silenciamento do IRS1 em células K562 por shRNA mediado por lentivírus

Com o objetivo de avaliar os efeitos do silenciamento de IRS1 em um modelo de células BCR-ABL positivas, células K562 foram transduzidas com shRNA mediado por lentivírus específico para IRS1 (shIRS1) ou controle adequado (shControl). Após a seleção por puromicina, a expressão de IRS1 foi determinada por PCRq e Western blot. Redução significativa na expressão gênica ($84 \pm 2\%$) e protéica ($74\% \pm 9\%$) de IRS1 foi detectada nas células shIRS1 quando comparados com shControl. (Figura 22)

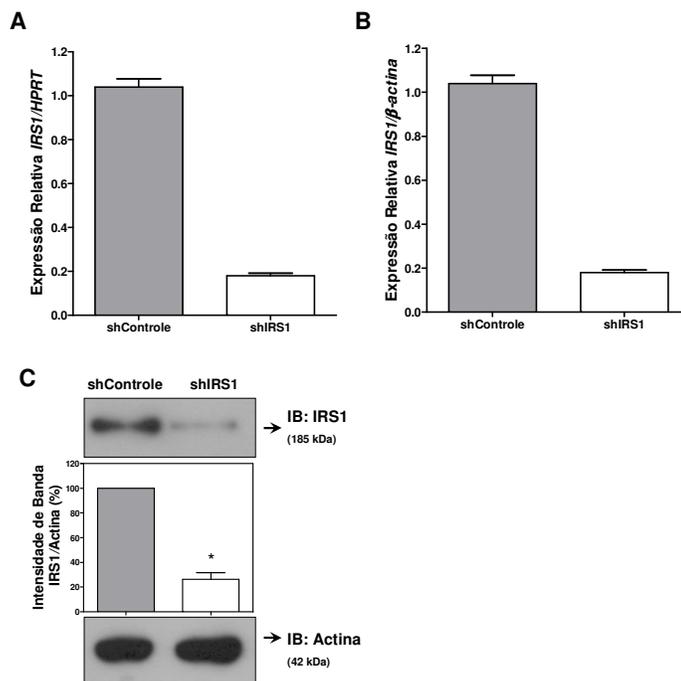


Figura 22. ShRNA específico para IRS1 mediado por lentivírus resultou no silenciamento efetivo de IRS1 em células K562. A quantificação da expressão de IRS1 nas células shIRS1 em relação a células shControl. Expressão dos níveis de *IRS1* foram normalizados pelos controles endógenos *HPRT* (A) e *β-actina* (B). Os resultados foram analisados usando $2^{-\Delta\Delta CT}$. (C) Análise por *Western Blot* de extratos protéicos de células shIRS1 e shControl. A membrana foi incubada com anticorpos anti-IRS1 (185 kDa) ou anti-Actina (42 kDa) como controle da quantidade de proteína aplicada no gel. A membrana de nitrocelulose foi revelada com *ECL Western Blot Analysis System*. Os gráficos de barras representam a média \pm DP das intensidades de bandas de 3 experimentos independentes. A expressão protéica de IRS1 foi corrigida pela expressão de actina correspondente (Scion Imagine software). * $P < 0.05$, teste *t student*.

2.2. Avaliação do efeito do silenciamento do IRS1 na proliferação em células K562

O efeito do silenciamento de IRS1 na proliferação de células K562 foi avaliado por MTT. Após 48 horas de cultura, a proliferação foi significativamente reduzida nas células shIRS1 quando comparadas com shControle ($40\pm 5\%$, $P=0,002$) (Figura 23). O inibidor da atividade tirosina quinase do BCR-ABL, mesilato de imatinib, sabidamente induz a redução da proliferação celular(33). Dessa forma, células K562 foram submetidas ao tratamento com imatinib associado ou não ao silenciamento do IRS1. O tratamento com imatinib teve dois objetivos: controle positivo da eficiência do método de proliferação celular e avaliação do efeito sinérgico entre a inibição da atividade tirosina quinase do BCR-ABL e a inibição de IRS1. Como esperado, após 48 horas de tratamento com 0,1; 0,5 ou 1 μM de mesilato de imatinib, foi observado um efeito dose-resposta na diminuição do crescimento celular nas células K562. Quando as células foram expostas a 0,1 μM de imatinib, a capacidade do silenciamento do IRS1 na redução da proliferação foi mais evidente que o tratamento com imatinib em comparação a células shControle ($P=0,002$). Quando as células foram expostas a 0,5 ou 1 μM de mesilato de imatinib, a inibição da proliferação celular foi similar nas células apenas expostas ao imatinib ou ao imatinib associado ao silenciamento de IRS1, de forma que não foi observado sinergismo na ação de ambos (Figura 23). Portanto, o silenciamento do IRS1 reduziu a proliferação de células K562 sem um efeito adicional com o tratamento com imatinib.

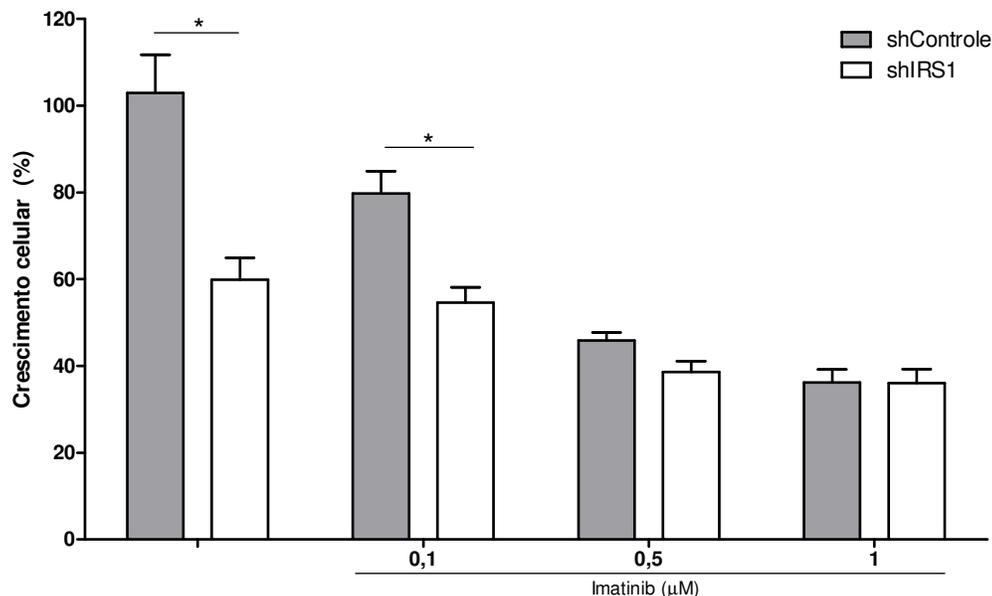


Figura 23. O silenciamento de IRS1 reduz a proliferação celular e não tem efeito sinérgico com o tratamento com mesilato de imatinib em células K562. A proliferação celular foi determinada pelo ensaio de MTT após 48 horas de incubação de células shIRS1 e shControle na ausência ou presença de mesilato de imatinib (0,1; 0,5 ou 1 μM) e normalizado pelas células shControle não tratadas. Os resultados são apresentados como média± DP de seis replicatas e é representativo de 3 experimentos independentes. *P=0,0002; teste de *Mann-Whitney*.

2.3. Avaliação do efeito do silenciamento do IRS1 na formação de colônias em células K562

O ensaio de formação de colônias foi utilizado para determinar se o silenciamento de IRS1 altera o crescimento clonal de células K562. Células shControle e shIRS1 foram cultivadas em meio de metilcelulose e as colônias foram detectadas após 8 dias de cultura. Houve uma diminuição significativa no número de colônias nas células shIRS1 em comparação às células shControle (redução de 61±14%, $P=0,0007$) (Figura 24). O tratamento com imatinib resultou em uma inibição dose-dependente da formação de colônias de células K562. Na menor dose de imatinib (0,1 μM), um efeito proeminente do silenciamento de IRS1 na formação de colônia ainda foi observado, quando comparado com as células shControle ($P=0,0008$). Não houve efeito sinérgico entre o tratamento com mesilado de imatinib e o silenciamento de IRS1. Estes resultados indicam que o silenciamento de IRS1 em células K562 resulta na diminuição da clonogenicidade.

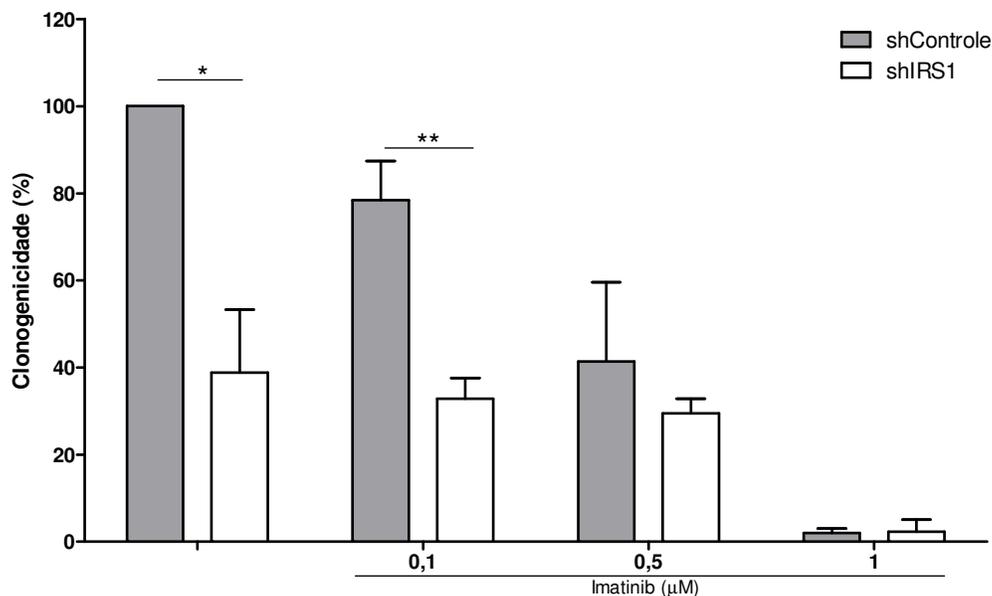


Figura 24. O silenciamento do IRS1 reduz a clonogenicidade e não tem efeito sinérgico ao tratamento com mesilato de imatinib em células K562. Colônias contendo células viáveis foram detectadas pela adição de MTT após 8 dias de incubação de células shIRS1 e shControle na ausência ou presença de mesilato de imatinib (0,1; 0,5 ou 1 µM) e normalizados pelas células shControle sem tratamento. Os resultados são apresentados como média±DP de 3 experimentos independentes realizados em duplicatas. * P=0,0007; **P=0,0008; teste *t student*.

2.4. Avaliação do efeito do silenciamento do IRS1 no ciclo celular em células K562

As análises por citometria de fluxo revelaram acúmulo significativo de células K562 em G₀/G₁, com conseqüente diminuição das células na fase S do ciclo celular em células shIRS1, quando comparadas às células shControle (Tabela 5). O silenciamento de IRS1 em células K562 induziu à uma parada na fase G₀/G₁ e impediu a entrada das células na fase S. Estes dados corroboram os achados de que a inibição do IRS1 induziu à uma diminuição da proliferação e formação de colônias em células K562.

Tabela 5. Efeito do silenciamento de IRS1 nas fases do ciclo celular de células K562

Célula K562	Fases do ciclo celular (%)		
	G ₀ /G ₁	S	G ₂ /M
shControle	39±7	39±12	22±6
shIRS1	46±5*	29±9*	25±4

Fases do ciclo celular detectadas por citometria de fluxo. Resultados são expressos como porcentagem do total de células. Três experimentos independentes foram realizados e a média±DP são apresentadas, * $P < 0,05$; teste *t student*.

2.5. Avaliação do efeito do silenciamento do IRS1 na apoptose em células K562

Para investigar os efeitos do silenciamento de IRS1 sobre a apoptose celular, a taxa de apoptose foi avaliada por citometria de fluxo após incubação de células com anexina-V/PI, ou com FITC-DEVD-FMK para medir a atividade de caspase-3. Não houve diferença na porcentagem de células apoptóticas entre as células shIRS1 e shControle, tanto pela apoptose foi avaliada por anexina-V/PI (Figura 25) ou ativação de caspase-3 (Figura 26). O tratamento com imatinib, conforme esperado, teve efeito dose-resposta na indução da apoptose. No entanto, não houve efeito cumulativo com o silenciamento de IRS1.

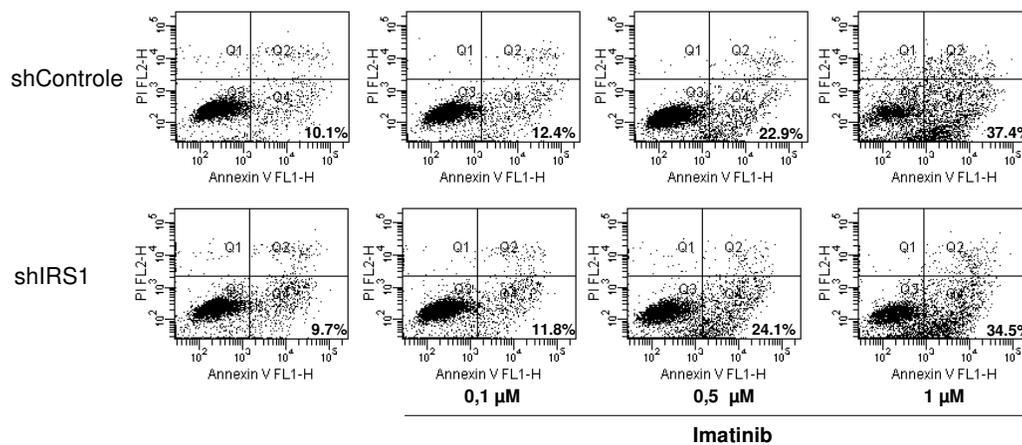


Figura 25. O silenciamento de IRS1 não altera a apoptose e não tem efeito cumulativo com tratamento com mesilato de imatinib em células K562. A apoptose foi detectada por citometria de fluxo em células shControl e shIRS1 incubadas na ausência ou presença de imatinib (0,1; 0,5 e 1μM) por 48 horas, utilizando marcação com anexina-V e PI. Os números indicam a porcentagem de células nos quadrantes. O quadrante inferior direito contém a população de células apoptóticas (anexina-V+/PI-). Os resultados são representativos de três experimentos independentes.

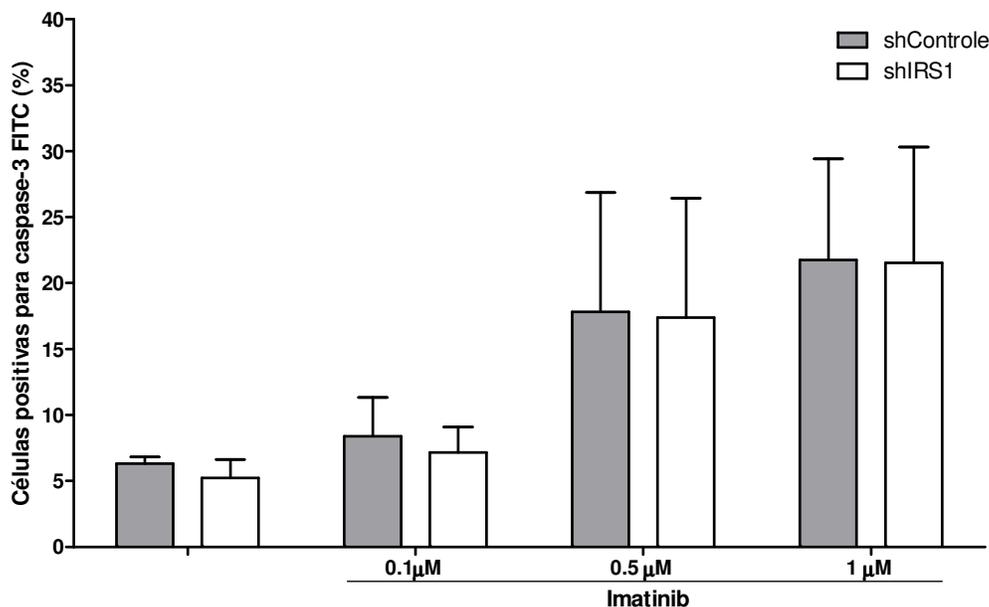


Figura 26. O silenciamento de IRS1 não altera a atividade de caspase-3 e não tem efeito cumulativo com tratamento com mesilato de imatinib em células K562. A atividade de caspase-3 foi detectada por citometria de fluxo em células shControle e shIRS1 incubadas na ausência ou presença de imatinib (0,1; 0,5 e 1μM) por 48 horas. Os gráficos de barras representam a média±DP de três experimentos independentes.

2.6. Avaliação do efeito do silenciamento do IRS1 nas vias de sinalização mTOR/Akt e MAPK

Duas importantes vias de sinalização têm sido descritas como ativadas por IRS1, PI3K-Akt/mTOR e Ras/MAPK(70). Dessa forma, o efeito do silenciamento do IRS1 na ativação das vias PI3K-Akt/mTOR e Ras/MAPK foi avaliado em células K562, que são BCR-ABL positivas. A fosforilação de Akt e P70S6K foi diminuída significativamente nas células shIRS1, quando comparada às células shControle, redução de 55±3% e de 59±14%, $P < 0,05$, respectivamente (Figura 27). Houve também diminuição significativa na fosforilação de ERK1/2 nas células shIRS1 quando comparadas às células shControle (redução de 67±11%, $P = 0,0083$) (Figura 27). A diminuição na fosforilação das proteínas Akt, P70S6K e ERK1/2 estão de acordo com os resultados observados nos experimentos funcionais, que evidenciaram diminuição da proliferação celular nas células silenciadas para IRS1.

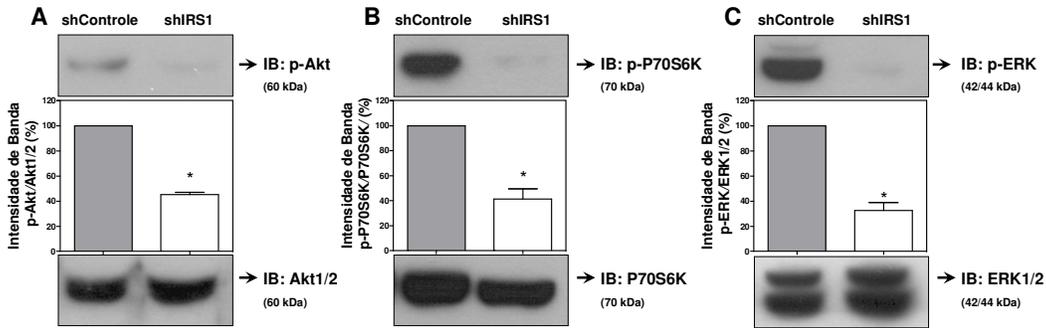


Figura 27. O silenciamento de IRS1 diminui a fosforilação de Akt, P70S6K e ERK1/2 em células K562. Western blot de extratos protéicos de células shControle e shIRS1 para avaliação da expressão de fosfo-Akt (A), fosfo-P70S6K (B) e fosfo-ERK1/2 (C); as membranas foram re-incubadas com o anticorpo para detecção da proteína total respectiva. Os gráficos de barras representam a média±DP dos níveis de fosforilação das proteínas normalizados pela proteína total respectiva e são representativos de três experimentos independentes. * $P > 0,05$; teste t student.

2.7. Avaliação do efeito do silenciamento do IRS1 nas vias de apoptose celular

O nível de expressão de BCL2, uma proteína anti-apoptótica e BAX, uma proteína pró-apoptótica e os níveis de fosforilação da proteína pró-apoptótica BAD não foram modulados em células submetidas à inibição de IRS1 se comparadas às células controles (Figura 28). Estes dados corroboram os resultados obtidos nos ensaios funcionais, que não evidenciaram modulação da apoptose celular em células shIRS1.

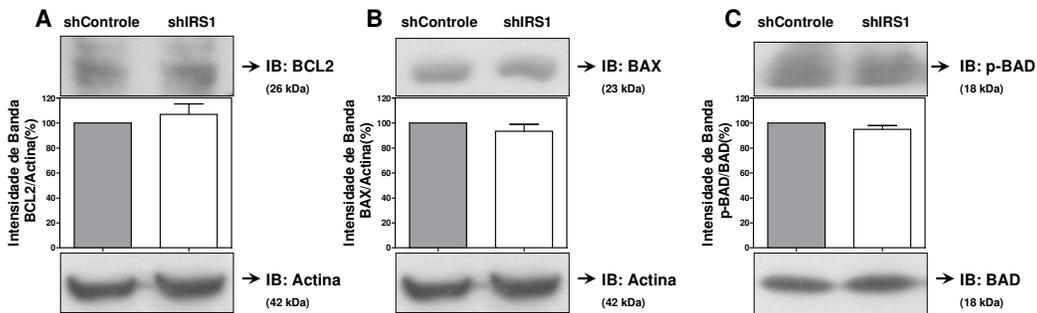


Figura 28. O silenciamento de IRS1 não modula expressão de BCL2 e BAX e a fosforilação de BAD em células K562. Western blot de extratos protéicos de células shControle e shIRS1 para avaliação da expressão de BCL2 (A), BAX (B) e fosfo-BAD (C); as membranas foram re-incubadas com o anticorpo para detecção da proteína total respectiva. Os gráficos de barras representam a média±DP dos níveis das proteínas normalizados pela actina para expressão protéica ou proteína total para fosforilação protéica e são representativos de três experimentos independentes. * $P > 0,05$; teste t student.

2.8. Avaliação do efeito do silenciamento de IRS1 na fosforilação de BCR-ABL e CRKL

Não foi observada modulação nos níveis de fosforilação do BCR-ABL ou CRKL nas células shIRS1 quando comparadas com as células shControle (Figura 29).

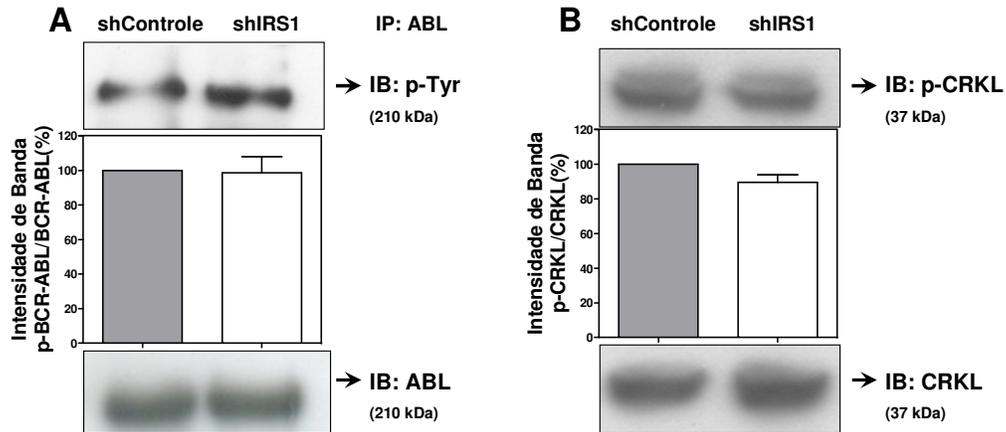


Figura 29. O silenciamento de IRS1 não modula a fosforilação de BCR-ABL e CRKL em células K562. Lisados de células shControle e shIRS1 contendo quantidades iguais de proteína foram submetidos à imunoprecipitação (IP) com anticorpo anti-ABL e incubados com anti-fosfotirosina (P-Tyr) (A). Extratos celulares totais foram incubados com anti-fosfoCRKL e normalizado pela expressão de CRKL total (B). Os gráficos de barras representam a média \pm DP dos níveis das proteínas normalizados pela proteína total respectiva, e são representativos de três experimentos independentes.

DISCUSSÃO

A alteração da sinalização normal ocorre como resultado de mutações, de alteração de expressão ou de ativação dos componentes das vias de sinalização, com consequente alteração na regulação da proliferação, da diferenciação e da apoptose celular. Dessa forma, o objetivo inicial desse trabalho foi estudar a expressão de IRS1 e IRS2 em células hematopoéticas normais, mielodisplásicas e leucêmicas. IRS1 foi expresso em linhagens celulares de leucemia aguda mieloide e linfóide. Em células hematopoéticas primárias, alta expressão de IRS1 foi observada em amostras de pacientes com LLA quando comparadas às de indivíduos normais. Não houve diferença na expressão de IRS1 entre LMA, SMD e células normais. As alterações na expressão de IRS1 têm sido descritas e relacionadas com diabetes e alguns tipos de câncer (mama, ovário, próstata, pâncreas, mesotelioma, hepatoma e meduloblastoma) (70).

Diferentemente, a expressão de IRS2 foi predominante nas linhagens mielóides em relação às linhagens linfóides. Em células hematopoéticas primárias, IRS2 esteve menos expresso em amostras de MO de pacientes com SMD e leucemia aguda, quando comparamos com as amostras de MO de doadores normais. A diminuição da expressão de IRS2 nas amostras de SMD está de acordo com estudo prévio de *microarray* que demonstra baixos níveis de IRS2 em células mononucleares de pacientes com SMD quando comparadas com células de doadores normais(99). Adicionalmente, entre os pacientes com diagnóstico de SMD, a expressão de *IRS2* foi reduzida em pacientes de alto risco quando comparados aos de baixo risco de acordo com as classificações FAB e WHO e de acordo com o número de citopenias.

IRS2 é uma proteína adaptadora que se liga ao IGF-1R e EpoR(89, 90) (Figura 30). A Epo é um hormônio responsável pela diferenciação eritroide, pela viabilidade e proliferação de células progenitoras durante a eritropoese(91). Similarmente, a via de sinalização de IGF-1R está envolvida na eritropoese, granulopoiese e linfopoiese normal, assim como em processos de neoplasias hematológicas(100). Interessantemente, nós demonstramos que a expressão de *IRS2* aumenta durante a diferenciação eritroide de células CD34⁺ de doadores normais e que nos pacientes com SMD ocorre uma falha no aumento da expressão de *IRS2* nos mesmos níveis que nos doadores normais. O conjunto desses dados indica uma possível participação de IRS2 na hematopoese ineficaz característica das SMD.

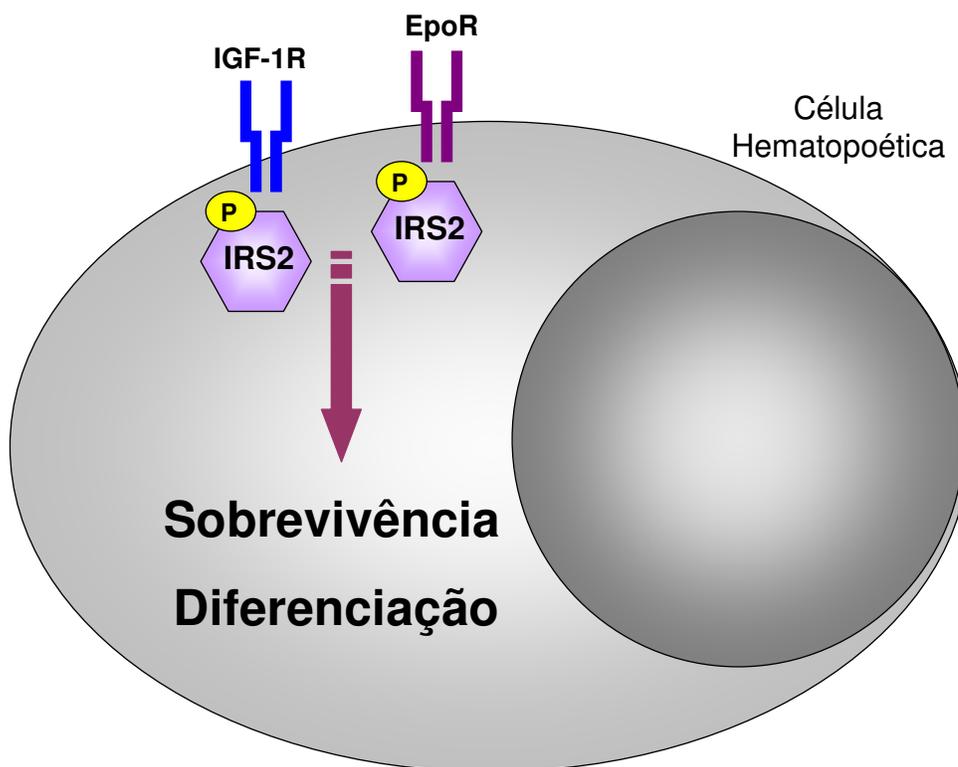


Figura 30. Representação esquemática das interações e da suposta função de IRS2 nas células hematopoéticas. IRS2 associa-se com IGF-1R e EpoR. A ativação desses receptores resulta na ativação de IRS2 que por sua vez, atua na sobrevivência e na diferenciação celular.

Relatos na literatura têm demonstrado constantemente que a eritropoese e a diferenciação celular estão desreguladas em SMD e LMA(9). Embora o papel de IRS2 na hematopoese normal tenha sido pouco abordada diretamente, alguns estudos têm demonstrado que a expressão e a fosforilação de IRS2 é regulado por ambos receptores: EpoR durante a diferenciação eritroide(90) e IGF-1R durante a diferenciação granulocítica(94). A adição de IGF-1 foi importante para diferenciação granulocítica de células HL60 e resultou no aumento de expressão e fosforilação de IRS2(94). Dessa forma, a menor expressão de IRS2 nos pacientes com SMD alto risco em relação aos de baixo risco pode contribuir para a diferenciação granulocítica ineficaz que é um achado predominante nos pacientes com SMD alto-risco.

Sathyanarayana e colaboradores(101) descreveram que o aumento da expressão de IRS2 foi importante para a sobrevivência de eritroblastos durante o estímulo com Epo. A

menor expressão de IRS2 no final da diferenciação eritroide na cultura de progenitores derivados de pacientes com SMD, aqui descrito, corrobora a hipótese de que IRS2 tem um papel na manutenção da eritropoese efetiva.

No presente trabalho, também foi analisado os efeitos do silenciamento de IRS1 por shRNA mediado por lentivirus, em células BCR-ABL positivas. A linhagem celular K562 é bem estabelecida, utilizada como modelo de LMC, e apresenta o oncogene quimérico BCR-ABL, produto da translocação conhecida como cromossomo Philadelphia. Nossos resultados mostraram que o silenciamento de IRS1 resulta na diminuição da proliferação celular e clonogenicidade em células K562, além disso, ocorre acúmulo de células na fase G₀/G₁ e diminuição de células na fase S do ciclo celular, corroborando os achados dos estudos de proliferação. Estes resultados estão de acordo com os de outros autores que já descreveram o papel de IRS1 na proliferação e na regulação do crescimento de células somáticas. Por exemplo, os ratos IRS1-deficientes foram aproximadamente 30% menores do que a ninhada tipo selvagem(102, 103). No entanto, a superexpressão de IRS1 na glândula mamária em ratos, resultou em hiperplasia e tumorigênese(83). O papel oncogênico de IRS1 e sua capacidade de induzir a transformação maligna foi descrita previamente(81, 82). A inibição de IRS1 através de siRNA já mostrou resultar em controle da proliferação em linhagens celulares de câncer de mama, próstata e hepatoma(83, 104-107). Interessantemente, a inibição do IGF-1R, um receptor tirosina quinase que atua fosforilando IRS1, diminuiu a clonogenicidade de progenitores leucêmicos e a proliferação de células leucêmicas que apresentavam ativação constitutiva da via PI3K/Akt(26). Nossos resultados fornecem novas evidências que IRS1 também desempenha papel na proliferação de células BCR-ABL positivas.

Para esclarecer as vias de sinalização inibidas pelo silenciamento de IRS1 em células K562, verificamos o status de ativação das proteínas Akt e P70S6K, proteínas essenciais da via Akt/mTOR e ERK1/2, uma proteína da via MAPK. Estas vias de sinalização regulam uma variedade de processos celulares, incluindo, proliferação, diferenciação, sobrevivência e apoptose(108, 109). O silenciamento de IRS1 em células K562 resultou na diminuição da fosforilação de Akt, P70S6K e ERK1/2, indicando a inibição das vias de sinalização Akt/mTOR e MAPK, respectivamente (Figura 31).

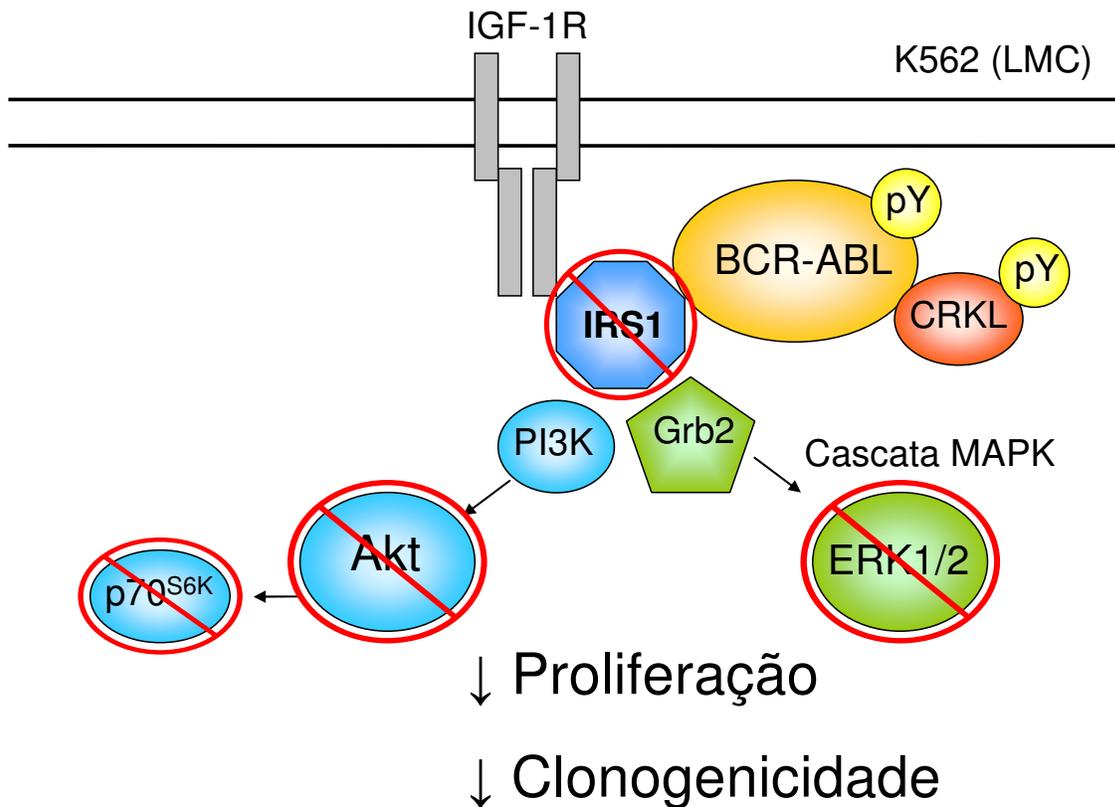


Figura 31. Representação esquemática das interações e da suposta função de IRS1 nas células BCR-ABL positiva. IRS1 se associa com BCR-ABL, PI3K e Grb2 em células K562. A inibição de IRS1 resulta na diminuição da fosforilação de Akt, P70S6k e ERK1/2, o que poderia estar atuando na diminuição da proliferação e crescimento clonal.

O papel de IRS1 na ativação das vias de sinalização Akt/mTOR e MAPK é bem conhecido(55, 62). Estudo anterior do nosso grupo demonstrou que IRS1 está constitutivamente fosforilado e associado com PI3K e Grb2(85), justificando nossos resultados atuais que demonstra que o silenciamento de IRS1 diminui a fosforilação da Akt e P70S6K, possivelmente através da inibição da via de sinalização de PI3K, além de diminuir a fosforilação de ERK1/2, possivelmente através da associação IRS1/Grb2, que atua na cascata de sinalização Ras. Em conjunto, esses resultados indicam que a inibição de IRS1 resulta na diminuição da proliferação e clonogenicidade, possivelmente através da inibição da fosforilação de Akt, P70S6K e ERK1/2. Nós ainda especulamos que o acúmulo significativo de células na fase G₀/G₁, seguido por uma diminuição de células na fase S do ciclo celular pode ser devido à inibição de P70S6K, pois a ativação de P70S6K regula

vários processos celulares, incluindo síntese protéica e progressão da fase G₁ para a fase S do ciclo celular(110, 111). Resultado semelhante foi observado em células de câncer de pâncreas, onde a inibição de P70S6K inibiu a proliferação e induziu parada do ciclo celular na fase G₁, no entanto os índices de apoptose permaneceram inalterados(112).

Em células BCR-ABL positivas, o silenciamento de IRS1 não afetou a apoptose apesar da inibição da fosforilação de Akt. A função mais estabelecida de Akt nas células de mamíferos é a inibição da apoptose, o que pode contribuir para a gênese do câncer. No entanto, não é provável que essa função por si só que seja suficiente para explicar a ativação frequente de Akt em cânceres humanos. Existem evidências de que Akt participe da proliferação, na transição normal da fase G₁ para fase S do ciclo celular e na transformação oncogênica, independentemente da sua função anti-apoptótica(113). Além disso, o aumento da ativação de Akt tem sido associado com o aumento da proliferação celular em câncer(113) e com pior prognóstico em leucemia aguda(114). Outros estudos corroboram com a hipótese que a via de Akt esteja envolvida com a proliferação, pois a inibição específica da atividade de PI3K diminui a proliferação celular em LMA, sem indução de apoptose(115, 116) e a inibição de IGF-1R bloqueia a proliferação, sem afetar a apoptose em amostras de MO de pacientes com LMA(26). Nossos achados de que a apoptose não foi modulada pela inibição de IRS1, estão de acordo com a ausência de modulação de proteínas envolvidas na apoptose, pois não foram observadas alterações na fosforilação de BAD e na expressão de BCL2 e BAX. Estes resultados indicam que a ativação de múltiplas vias de sinalização por BCR-ABL, levando à transformação maligna, são responsáveis pelo fenótipo leucêmico, o que sugere que são necessários inibidores que possam atuar sobre vários alvos para controlar a doença.

Nossos resultados não evidenciaram efeitos cumulativos entre o silenciamento de IRS1 e o tratamento com imatinib na proliferação celular, formação de colônias e apoptose. Como relatado anteriormente, IRS1 está associado com BCR-ABL(85) e a constatação de que o silenciamento de IRS1 não modula o status de fosforilação de BCR-ABL e CRKL indicam que IRS1 atua como uma proteína adaptadora *downstream* na via de sinalização de BCR-ABL. Nesse contexto, a inibição de BCR-ABL pelo tratamento com imatinib pode superar o efeito do silenciamento de IRS1 e ser altamente eficiente na redução da proliferação, clonogenicidade e na indução de apoptose em células K562. No entanto, a

inibição de IRS1, como foi observada nas células que não foram expostas ao imatinib é capaz de inibir a proliferação, clonogenicidade e progressão do ciclo celular em células BCR-ABL positivas. Os mesmos efeitos foram observados nas células silenciadas para IRS1 e expostas a uma baixa concentração de imatinib (0,1 M). Estes resultados chamam a atenção para as possibilidades de controlar a proliferação celular em células BCR-ABL positivas visando outras proteínas como alvo, além do BCR-ABL. Esta estratégia pode ser necessária em casos de LMC resistentes ao tratamento com inibidores de tirosina quinase ou em progressão da doença.

Inibidores de tirosina quinase, como o mesilato de imatinib, tem sido utilizado como terapias de primeira linha para LMC. No entanto, o sucesso destes inibidores tem sido atenuado pelo aparecimento de resistência ao tratamento, causando o retorno da LMC. Assim, a identificação de novos genes alvo e/ou vias de sinalização envolvidos na fisiopatologia da LMC é fundamental. Neste trabalho nós demonstramos, pela primeira vez, que o silenciamento do IRS1 resulta na diminuição da proliferação e inibição das vias Akt/mTOR e MAPK em células K562. No entanto, novos estudos devem ser realizados para melhor entendimento dos mecanismos pelos quais IRS1 contribui para o fenótipo leucêmico e, conseqüentemente, validar IRS1 como um gene-alvo para o tratamento de pacientes com LMC resistentes ao imatinib. Utilizar IRS1 como alvo em uma terapia complementar para LMC parece ser uma medida razoável, uma vez que IGF-1R já se tornou um alvo para terapia antineoplásica em vários tipos de tumores(117-119).

Em conclusão, o presente estudo identificou IRS1 como um gene altamente expresso em LLA, assim como sua função na proliferação e nas vias de sinalização Akt/mTOR e MAPK de células BCR-ABL positiva. O estudo também identificou *IRS2* como um gene com expressão diminuída em SMD e leucemias agudas, e que mesma é modulada durante o processo de diferenciação eritroide. Os achados aqui descritos sugerem que IRS1 possa ser um alvo terapêutico em LLA e LMC e IRS2 um marcador de prognóstico e um possível alvo terapêutico nas SMD e LMA.

CONCLUSÃO

O conjunto dos resultados apresentados neste trabalho permite as seguintes conclusões:

1. IRS1 está expresso em linhagens de leucemia aguda mieloide e linfóide, enquanto que IRS2 está expresso preferencialmente em linhagens mielóides.
2. Não há diferenças na expressão de IRS1 entre células hematopoéticas de pacientes com SMD e LMA e de controles normais, mas expressão de IRS1 está aumentada em amostras de MO de pacientes com LLA em relação aos controles normais.
3. A expressão de IRS2 é menor nas amostras de medula óssea de pacientes com SMD, LMA e LLA em relação aos controles normais e também é menor em pacientes com SMD de alto risco se comparados com SMD baixo risco, de acordo com a classificação FAB, WHO e número de citopenias.
4. O aumento na expressão de *IRS2* durante a diferenciação eritroide é pouco proeminente em progenitores de SMD, comparados aos progenitores normais, sugerindo um papel de *IRS2* na eritropoese ineficaz da SMD.
5. Em células K562 (BCR-ABL+), o silenciamento de IRS1 por lentivírus é efetivo e reduz a proliferação e o crescimento clonal das células, além de resultar no acúmulo de células na fase G₀/G₁ e redução de células na fase S do ciclo celular.
6. O silenciamento de IRS1 reduz a fosforilação da Akt, P70S6K e ERK, mas não modula a apoptose e as proteínas BCL2, BAX e BAD.
7. A inibição do IRS1 não modula a fosforilação do oncogene BCR-ABL e do seu substrato CRKL.
8. O silenciamento do IRS1 não apresenta efeito sinérgico ao tratamento com imatinib nos processos celulares de proliferação, crescimento clonal e apoptose.

Os resultados desta dissertação geraram a redação de dois manuscritos submetidos para publicação (Apêndices I e II).

REFERÊNCIAS

1. Kornblau SM, Womble M, Qiu YH, Jackson CE, Chen W, Konopleva M, et al. Simultaneous activation of multiple signal transduction pathways confers poor prognosis in acute myelogenous leukemia. *Blood*. 2006;108(7):2358-65.
2. Steelman LS, Pohnert SC, Shelton JG, Franklin RA, Bertrand FE, McCubrey JA. JAK/STAT, Raf/MEK/ERK, PI3K/Akt and BCR-ABL in cell cycle progression and leukemogenesis. *Leukemia*. 2004;18(2):189-218.
3. Reuter CW, Morgan MA, Bergmann L. Targeting the Ras signaling pathway: a rational, mechanism-based treatment for hematologic malignancies? *Blood*. 2000;96(5):1655-69.
4. Gilliland DG, Tallman MS. Focus on acute leukemias. *Cancer Cell*. 2002;1(5):417-20.
5. Corey SJ, Minden MD, Barber DL, Kantarjian H, Wang JC, Schimmer AD. Myelodysplastic syndromes: the complexity of stem-cell diseases. *Nat Rev Cancer*. 2007;7(2):118-29.
6. Nolte F, Hofmann WK. Myelodysplastic syndromes: molecular pathogenesis and genomic changes. *Ann Hematol*. 2008;87(10):777-95.
7. Cazzola M, Malcovati L. Myelodysplastic syndromes--coping with ineffective hematopoiesis. *N Engl J Med*. 2005;352(6):536-8.
8. Hofmann WK, Koeffler HP. Differentiation therapy for myelodysplastic syndrome. *Clin Cancer Res*. 2002;8(4):939-41.
9. Fontenay-Roupie M, Bouscary D, Guesnu M, Picard F, Melle J, Lacombe C, et al. Ineffective erythropoiesis in myelodysplastic syndromes: correlation with Fas expression but not with lack of erythropoietin receptor signal transduction. *Br J Haematol*. 1999;106(2):464-73.
10. Backx B, Broeders L, Hoefsloot LH, Wognum B, Lowenberg B. Erythropoiesis in myelodysplastic syndrome: expression of receptors for erythropoietin and kit ligand. *Leukemia*. 1996;10(3):466-72.
11. Bennett JM, Catovsky D, Daniel MT, Flandrin G, Galton DA, Gralnick HR, et al. Proposals for the classification of the myelodysplastic syndromes. *Br J Haematol*. 1982;51(2):189-99.
12. Vardiman JW, Harris NL, Brunning RD. The World Health Organization (WHO) classification of the myeloid neoplasms. *Blood*. 2002;100(7):2292-302.
13. Vardiman JW, Thiele J, Arber DA, Brunning RD, Borowitz MJ, Porwit A, et al. The 2008 revision of the World Health Organization (WHO) classification of myeloid neoplasms and acute leukemia: rationale and important changes. *Blood*. 2009;114(5):937-51.
14. Greenberg P, Cox C, LeBeau MM, Fenaux P, Morel P, Sanz G, et al. International scoring system for evaluating prognosis in myelodysplastic syndromes. *Blood*. 1997;89(6):2079-88.
15. Martelli AM, Tazzari PL, Evangelisti C, Chiarini F, Blalock WL, Billi AM, et al. Targeting the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt/mammalian target of rapamycin module for acute myelogenous leukemia therapy: from bench to bedside. *Curr Med Chem*. 2007;14(19):2009-23.
16. Testa U, Riccioni R. Deregulation of apoptosis in acute myeloid leukemia. *Haematologica*. 2007;92(1):81-94.
17. Milella M, Kornblau SM, Estrov Z, Carter BZ, Lapillonne H, Harris D, et al. Therapeutic targeting of the MEK/MAPK signal transduction module in acute myeloid leukemia. *J Clin Invest*. 2001;108(6):851-9.

18. Bennett JM, Catovsky D, Daniel MT, Flandrin G, Galton DA, Gralnick HR, et al. Proposals for the classification of the acute leukaemias. French-American-British (FAB) co-operative group. *Br J Haematol.* 1976;33(4):451-8.
19. Digiuseppe JA. Acute lymphoblastic leukemia: diagnosis and detection of minimal residual disease following therapy. *Clin Lab Med.* 2007;27(3):533-49, vi.
20. Zheng R, Levis M, Piloto O, Brown P, Baldwin BR, Gorin NC, et al. FLT3 ligand causes autocrine signaling in acute myeloid leukemia cells. *Blood.* 2004;103(1):267-74.
21. Ikeda H, Kanakura Y, Tamaki T, Kuriu A, Kitayama H, Ishikawa J, et al. Expression and functional role of the proto-oncogene c-kit in acute myeloblastic leukemia cells. *Blood.* 1991;78(11):2962-8.
22. Fiedler W, Graeven U, Ergun S, Verago S, Kilic N, Stockschlader M, et al. Vascular endothelial growth factor, a possible paracrine growth factor in human acute myeloid leukemia. *Blood.* 1997;89(6):1870-5.
23. Hizuka N, Sukegawa I, Takano K, Asakawa K, Horikawa R, Tsushima T, et al. Characterization of insulin-like growth factor I receptors on human erythroleukemia cell line (K-562 cells). *Endocrinol Jpn.* 1987;34(1):81-8.
24. Khandwala HM, McCutcheon IE, Flyvbjerg A, Friend KE. The effects of insulin-like growth factors on tumorigenesis and neoplastic growth. *Endocr Rev.* 2000;21(3):215-44.
25. Mitsiades CS, Mitsiades NS, McMullan CJ, Poulaki V, Shringarpure R, Akiyama M, et al. Inhibition of the insulin-like growth factor receptor-1 tyrosine kinase activity as a therapeutic strategy for multiple myeloma, other hematologic malignancies, and solid tumors. *Cancer Cell.* 2004;5(3):221-30.
26. 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.* 2009;95(3):415-23.
27. Myers MG, Jr., Sun XJ, Cheatham B, Jachna BR, Glasheen EM, Backer JM, et al. IRS-1 is a common element in insulin and insulin-like growth factor-I signaling to the phosphatidylinositol 3'-kinase. *Endocrinology.* 1993;132(4):1421-30.
28. Deininger MW, Goldman JM, Melo JV. The molecular biology of chronic myeloid leukemia. *Blood.* 2000;96(10):3343-56.
29. Tefferi A, Vardiman JW. Classification and diagnosis of myeloproliferative neoplasms: the 2008 World Health Organization criteria and point-of-care diagnostic algorithms. *Leukemia.* 2008;22(1):14-22.
30. Juric D, Lacayo NJ, Ramsey MC, Racevskis J, Wiernik PH, Rowe JM, et al. Differential gene expression patterns and interaction networks in BCR-ABL-positive and -negative adult acute lymphoblastic leukemias. *J Clin Oncol.* 2007;25(11):1341-9.
31. Druker BJ. Translation of the Philadelphia chromosome into therapy for CML. *Blood.* 2008;112(13):4808-17.
32. Lugo TG, Pendergast AM, Muller AJ, Witte ON. Tyrosine kinase activity and transformation potency of bcr-abl oncogene products. *Science.* 1990;247(4946):1079-82.
33. Druker BJ, Sawyers CL, Kantarjian H, Resta DJ, Reese SF, Ford JM, et al. Activity of a specific inhibitor of the BCR-ABL tyrosine kinase in the blast crisis of chronic myeloid leukemia and acute lymphoblastic leukemia with the Philadelphia chromosome. *N Engl J Med.* 2001;344(14):1038-42.

34. O'Hare T, Eide CA, Deininger MW. Bcr-Abl kinase domain mutations, drug resistance, and the road to a cure for chronic myeloid leukemia. *Blood*. 2007;110(7):2242-9.
35. Shah NP, Sawyers CL. Mechanisms of resistance to STI571 in Philadelphia chromosome-associated leukemias. *Oncogene*. 2003;22(47):7389-95.
36. Kharas MG, Fruman DA. ABL oncogenes and phosphoinositide 3-kinase: mechanism of activation and downstream effectors. *Cancer Res*. 2005;65(6):2047-53.
37. Lee YH, White MF. Insulin receptor substrate proteins and diabetes. *Arch Pharm Res*. 2004;27(4):361-70.
38. Sun XJ, Rothenberg P, Kahn CR, Backer JM, Araki E, Wilden PA, et al. Structure of the insulin receptor substrate IRS-1 defines a unique signal transduction protein. *Nature*. 1991;352(6330):73-7.
39. 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;377(6545):173-7.
40. Smith-Hall J, Pons S, Patti ME, Burks DJ, Yenush L, Sun XJ, et al. The 60 kDa insulin receptor substrate functions like an IRS protein (pp60IRS3) in adipose cells. *Biochemistry*. 1997;36(27):8304-10.
41. Lavan BE, Fantin VR, Chang ET, Lane WS, Keller SR, Lienhard GE. A novel 160-kDa phosphotyrosine protein in insulin-treated embryonic kidney cells is a new member of the insulin receptor substrate family. *J Biol Chem*. 1997;272(34):21403-7.
42. Cai D, Dhe-Paganon S, Melendez PA, Lee J, Shoelson SE. Two new substrates in insulin signaling, IRS5/DOK4 and IRS6/DOK5. *J Biol Chem*. 2003;278(28):25323-30.
43. Surmacz E. Function of the IGF-I receptor in breast cancer. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*. 2000;5(1):95-105.
44. Ridderstrale M, Degerman E, Tornqvist H. Growth hormone stimulates the tyrosine phosphorylation of the insulin receptor substrate-1 and its association with phosphatidylinositol 3-kinase in primary adipocytes. *J Biol Chem*. 1995;270(8):3471-4.
45. Cui X, Kim HJ, Kuitatse I, Kim H, Brown PH, Lee AV. Epidermal growth factor induces insulin receptor substrate-2 in breast cancer cells via c-Jun NH(2)-terminal kinase/activator protein-1 signaling to regulate cell migration. *Cancer Res*. 2006;66(10):5304-13.
46. Cui X, Lazard Z, Zhang P, Hopp TA, Lee AV. Progesterone crosstalks with insulin-like growth factor signaling in breast cancer cells via induction of insulin receptor substrate-2. *Oncogene*. 2003;22(44):6937-41.
47. Plataniias LC, Fish EN. Signaling pathways activated by interferons. *Exp Hematol*. 1999;27(11):1583-92.
48. White MF, Yenush L. The IRS-signaling system: a network of docking proteins that mediate insulin and cytokine action. *Curr Top Microbiol Immunol*. 1998;228:179-208.
49. 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;273(25):15719-26.
50. Voliovitich H, Schindler DG, Hadari YR, Taylor SI, Accili D, Zick Y. Tyrosine phosphorylation of insulin receptor substrate-1 in vivo depends upon the presence of its pleckstrin homology region. *J Biol Chem*. 1995;270(30):18083-7.

51. Yenush L, Makati KJ, Smith-Hall J, Ishibashi O, Myers MG, Jr., White MF. The pleckstrin homology domain is the principal link between the insulin receptor and IRS-1. *J Biol Chem.* 1996;271(39):24300-6.
52. Burks DJ, Pons S, Towery H, Smith-Hall J, Myers MG, Jr., Yenush L, et al. Heterologous pleckstrin homology domains do not couple IRS-1 to the insulin receptor. *J Biol Chem.* 1997;272(44):27716-21.
53. Sawka-Verhelle D, Tartare-Deckert S, White MF, Van Obberghen E. Insulin receptor substrate-2 binds to the insulin receptor through its phosphotyrosine-binding domain and through a newly identified domain comprising amino acids 591-786. *J Biol Chem.* 1996;271(11):5980-3.
54. Backer JM, Wjasow C, Zhang Y. In vitro binding and phosphorylation of insulin receptor substrate 1 by the insulin receptor. Role of interactions mediated by the phosphotyrosine-binding domain and the pleckstrin-homology domain. *Eur J Biochem.* 1997;245(1):91-6.
55. Taniguchi CM, Emanuelli B, Kahn CR. Critical nodes in signalling pathways: insights into insulin action. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2006;7(2):85-96.
56. Lee CH, Li W, Nishimura R, Zhou M, Batzer AG, Myers MG, Jr., et al. Nck associates with the SH2 domain-docking protein IRS-1 in insulin-stimulated cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1993;90(24):11713-7.
57. Myers MG, Jr., Grammer TC, Wang LM, Sun XJ, Pierce JH, Blenis J, et al. Insulin receptor substrate-1 mediates phosphatidylinositol 3'-kinase and p70S6k signaling during insulin, insulin-like growth factor-1, and interleukin-4 stimulation. *J Biol Chem.* 1994;269(46):28783-9.
58. Myers MG, Jr., Wang LM, Sun XJ, Zhang Y, Yenush L, Schlessinger J, et al. Role of IRS-1-GRB-2 complexes in insulin signaling. *Mol Cell Biol.* 1994;14(6):3577-87.
59. Beitner-Johnson D, Blakesley VA, Shen-Orr Z, Jimenez M, Stannard B, Wang LM, et al. The proto-oncogene product c-Crk associates with insulin receptor substrate-1 and 4PS. Modulation by insulin growth factor-I (IGF) and enhanced IGF-I signaling. *J Biol Chem.* 1996;271(16):9287-90.
60. Myers MG, Jr., Mendez R, Shi P, Pierce JH, Rhoads R, White MF. The COOH-terminal tyrosine phosphorylation sites on IRS-1 bind SHP-2 and negatively regulate insulin signaling. *J Biol Chem.* 1998;273(41):26908-14.
61. Karas M, Koval AP, Zick Y, LeRoith D. The insulin-like growth factor I receptor-induced interaction of insulin receptor substrate-4 and Crk-II. *Endocrinology.* 2001;142(5):1835-40.
62. Shepherd PR. Mechanisms regulating phosphoinositide 3-kinase signalling in insulin-sensitive tissues. *Acta Physiol Scand.* 2005;183(1):3-12.
63. Shepherd PR, Withers DJ, Siddle K. Phosphoinositide 3-kinase: the key switch mechanism in insulin signalling. *Biochem J.* 1998;333 (Pt 3):471-90.
64. Lietzke SE, Bose S, Cronin T, Klarlund J, Chawla A, Czech MP, et al. Structural basis of 3-phosphoinositide recognition by pleckstrin homology domains. *Mol Cell.* 2000;6(2):385-94.
65. Vivanco I, Sawyers CL. The phosphatidylinositol 3-Kinase AKT pathway in human cancer. *Nat Rev Cancer.* 2002;2(7):489-501.
66. Kelekar A, Chang BS, Harlan JE, Fesik SW, Thompson CB. Bad is a BH3 domain-containing protein that forms an inactivating dimer with Bcl-XL. *Mol Cell Biol.* 1997;17(12):7040-6.

67. Sun XJ, Pons S, Asano T, Myers MG, Jr., Glasheen E, White MF. The Fyn tyrosine kinase binds Irs-1 and forms a distinct signaling complex during insulin stimulation. *J Biol Chem.* 1996;271(18):10583-7.
68. Mardilovich K, Pankratz SL, Shaw LM. Expression and function of the insulin receptor substrate proteins in cancer. *Cell Commun Signal.* 2009;7:14.
69. Sawka-Verhelle D, Baron V, Mothe I, Filloux C, White MF, Van Obberghen E. Tyr624 and Tyr628 in insulin receptor substrate-2 mediate its association with the insulin receptor. *J Biol Chem.* 1997;272(26):16414-20.
70. 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;6(6):705-13.
71. Rocha RL, Hilsenbeck SG, Jackson JG, VanDenBerg CL, Weng C, Lee AV, et al. Insulin-like growth factor binding protein-3 and insulin receptor substrate-1 in breast cancer: correlation with clinical parameters and disease-free survival. *Clin Cancer Res.* 1997;3(1):103-9.
72. Koda M, Sulkowska M, Kanczuga-Koda L, Sulkowski S. Expression of insulin receptor substrate 1 in primary breast cancer and lymph node metastases. *J Clin Pathol.* 2005;58(6):645-9.
73. Sisci D, Morelli C, Garofalo C, Romeo F, Morabito L, Casaburi F, et al. Expression of nuclear insulin receptor substrate 1 in breast cancer. *J Clin Pathol.* 2007;60(6):633-41.
74. Ravikumar S, Perez-Liz G, Del Vale L, Soprano DR, Soprano KJ. Insulin receptor substrate-1 is an important mediator of ovarian cancer cell growth suppression by all-trans retinoic acid. *Cancer Res.* 2007;67(19):9266-75.
75. Hellawell GO, Turner GD, Davies DR, Poulson R, Brewster SF, Macaulay VM. Expression of the type 1 insulin-like growth factor receptor is up-regulated in primary prostate cancer and commonly persists in metastatic disease. *Cancer Res.* 2002;62(10):2942-50.
76. Bergmann U, Funatomi H, Kornmann M, Beger HG, Korc M. Increased expression of insulin receptor substrate-1 in human pancreatic cancer. *Biochem Biophys Res Commun.* 1996;220(3):886-90.
77. Hoang CD, Zhang X, Scott PD, Guillaume TJ, Maddaus MA, Yee D, et al. Selective activation of insulin receptor substrate-1 and -2 in pleural mesothelioma cells: association with distinct malignant phenotypes. *Cancer Res.* 2004;64(20):7479-85.
78. Boissan M, Beurel E, Wendum D, Rey C, Lecluse Y, Housset C, et al. Overexpression of insulin receptor substrate-2 in human and murine hepatocellular carcinoma. *Am J Pathol.* 2005;167(3):869-77.
79. Cantarini MC, de la Monte SM, Pang M, Tong M, D'Errico A, Trevisani F, et al. Aspartyl-asparagyl beta hydroxylase over-expression in human hepatoma is linked to activation of insulin-like growth factor and notch signaling mechanisms. *Hepatology.* 2006;44(2):446-57.
80. Del Valle L, Enam S, Lassak A, Wang JY, Croul S, Khalili K, et al. Insulin-like growth factor I receptor activity in human medulloblastomas. *Clin Cancer Res.* 2002;8(6):1822-30.
81. Ito T, Sasaki Y, Wands JR. Overexpression of human insulin receptor substrate 1 induces cellular transformation with activation of mitogen-activated protein kinases. *Mol Cell Biol.* 1996;16(3):943-51.
82. Cristofanelli B, Valentini B, Soddu S, Rizzo MG, Marchetti A, Bossi G, et al. Cooperative transformation of 32D cells by the combined expression of IRS-1 and V-Ha-Ras. *Oncogene.* 2000;19(29):3245-55.

83. Dearth RK, Cui X, Kim HJ, Kuitse I, Lawrence NA, Zhang X, et al. Mammary tumorigenesis and metastasis caused by overexpression of insulin receptor substrate 1 (IRS-1) or IRS-2. *Mol Cell Biol.* 2006;26(24):9302-14.
84. Schnarr B, Strunz K, Ohsam J, Benner A, Wacker J, Mayer D. Down-regulation of insulin-like growth factor-I receptor and insulin receptor substrate-1 expression in advanced human breast cancer. *Int J Cancer.* 2000;89(6):506-13.
85. Traina F, Carvalheira 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;535(1-3):17-22.
86. Al-Sarraf N, Reiff JN, Hinrichsen J, Mahmood S, Teh BT, McGovern E, et al. DOK4/IRS-5 expression is altered in clear cell renal cell carcinoma. *Int J Cancer.* 2007;121(5):992-8.
87. Szabolcs M, Keniry M, Simpson L, Reid LJ, Koujak S, Schiff SC, et al. Irs2 inactivation suppresses tumor progression in Pten+/- mice. *Am J Pathol.* 2009;174(1):276-86.
88. Kornmann M, Maruyama H, Bergmann U, Tangvoranuntakul P, Beger HG, White MF, et al. Enhanced expression of the insulin receptor substrate-2 docking protein in human pancreatic cancer. *Cancer Res.* 1998;58(19):4250-4.
89. Sun XJ, Pons S, Wang LM, Zhang Y, Yenush L, Burks D, et al. The IRS-2 gene on murine chromosome 8 encodes a unique signaling adapter for insulin and cytokine action. *Mol Endocrinol.* 1997;11(2):251-62.
90. 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;272(42):26173-8.
91. Krantz SB. Erythropoietin. *Blood.* 1991;77(3):419-34.
92. 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;74(2):227-36.
93. 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;101(9):3436-43.
94. Schacher DH, VanHoy RW, Liu Q, Arkins S, Dantzer R, Freund GG, et al. Developmental expression of insulin receptor substrate-2 during dimethylsulfoxide-induced differentiation of human HL-60 cells. *J Immunol.* 2000;164(1):113-20.
95. Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem.* 1987;162(1):156-9.
96. 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;25(4):402-8.
97. de Kok JB, Roelofs RW, Giesendorf BA, Pennings JL, Waas ET, Feuth T, et al. Normalization of gene expression measurements in tumor tissues: comparison of 13 endogenous control genes. *Lab Invest.* 2005;85(1):154-9.
98. Korz C, Pscherer A, Benner A, Mertens D, Schaffner C, Leupolt E, et al. Evidence for distinct pathomechanisms in B-cell chronic lymphocytic leukemia and mantle cell lymphoma by quantitative expression analysis of cell cycle and apoptosis-associated genes. *Blood.* 2002;99(12):4554-61.
99. Bar M, Stirewalt D, Pogossova-Agadjanyan E, Wagner V, Gooley T, Abbasi N, et al. Gene Expression Patterns in Myelodysplasia Underline the Role of Apoptosis and

Differentiation in Disease Initiation and Progression. *Transl Oncogenomics*. 2008;3:137-149.

100. Shimon I, Shpilberg O. The insulin-like growth factor system in regulation of normal and malignant hematopoiesis. *Leuk Res*. 1995;19(4):233-40.

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

102. Araki E, Lipes MA, Patti ME, Bruning JC, Haag B, 3rd, Johnson RS, et al. Alternative pathway of insulin signalling in mice with targeted disruption of the IRS-1 gene. *Nature*. 1994;372(6502):186-90.

103. Tamemoto H, Kadowaki T, Tobe K, Yagi T, Sakura H, Hayakawa T, et al. Insulin resistance and growth retardation in mice lacking insulin receptor substrate-1. *Nature*. 1994;372(6502):182-6.

104. Nolan MK, Jankowska L, Prisco M, Xu S, Guvakova MA, Surmacz E. Differential roles of IRS-1 and SHC signaling pathways in breast cancer cells. *Int J Cancer*. 1997;72(5):828-34.

105. Oliveira JC, Souza KK, Dias MM, Faria MC, Ropelle ER, Flores MB, et al. Antineoplastic effect of rapamycin is potentiated by inhibition of IRS-1 signaling in prostate cancer cells xenografts. *J Cancer Res Clin Oncol*. 2008;134(8):833-9.

106. Taouis M, Dupont J, Gillet A, Derouet M, Simon J. Insulin receptor substrate 1 antisense expression in an hepatoma cell line reduces cell proliferation and induces overexpression of the Src homology 2 domain and collagen protein (SHC). *Mol Cell Endocrinol*. 1998;137(2):177-86.

107. Tanaka S, Mohr L, Schmidt EV, Sugimachi K, Wands JR. Biological effects of human insulin receptor substrate-1 overexpression in hepatocytes. *Hepatology*. 1997;26(3):598-604.

108. Cobb MH. MAP kinase pathways. *Prog Biophys Mol Biol*. 1999;71(3-4):479-500.

109. Grammer TC, Cheatham L, Chou MM, Blenis J. The p70S6K signalling pathway: a novel signalling system involved in growth regulation. *Cancer Surv*. 1996;27:271-92.

110. Ferrari S, Thomas G. S6 phosphorylation and the p70s6k/p85s6k. *Crit Rev Biochem Mol Biol*. 1994;29(6):385-413.

111. de Groot RP, Ballou LM, Sassone-Corsi P. Positive regulation of the cAMP-responsive activator CREM by the p70 S6 kinase: an alternative route to mitogen-induced gene expression. *Cell*. 1994;79(1):81-91.

112. Shah SA, Potter MW, Ricciardi R, Perugini RA, Callery MP. FRAP-p70s6K signaling is required for pancreatic cancer cell proliferation. *J Surg Res*. 2001;97(2):123-30.

113. Skeen JE, Bhaskar PT, Chen CC, Chen WS, Peng XD, Nogueira V, et al. Akt deficiency impairs normal cell proliferation and suppresses oncogenesis in a p53-independent and mTORC1-dependent manner. *Cancer Cell*. 2006;10(4):269-80.

114. Min YH, Eom JI, Cheong JW, Maeng HO, Kim JY, Jeung HK, et al. Constitutive phosphorylation of Akt/PKB protein in acute myeloid leukemia: its significance as a prognostic variable. *Leukemia*. 2003;17(5):995-7.

115. Sujobert P, Bardet V, Cornillet-Lefebvre P, Hayflick JS, Prie N, Verdier F, et al. Essential role for the p110delta isoform in phosphoinositide 3-kinase activation and cell proliferation in acute myeloid leukemia. *Blood*. 2005;106(3):1063-6.

116. Billottet C, Grandage VL, Gale RE, Quattropiani A, Rommel C, Vanhaesebroeck B, et al. A selective inhibitor of the p110delta isoform of PI 3-kinase inhibits AML cell

proliferation and survival and increases the cytotoxic effects of VP16. *Oncogene*. 2006;25(50):6648-59.

117. Chung CH, Pohlmann PR, Rothenberg ML, Burkey BB, Parker J, Palka K, et al. Insulin-like growth factor-1 receptor inhibitor, AMG-479, in cetuximab-refractory head and neck squamous cell carcinoma. *Head Neck*.

118. Tarn C, Rink L, Merkel E, Flieder D, Pathak H, Koumbi D, et al. Insulin-like growth factor 1 receptor is a potential therapeutic target for gastrointestinal stromal tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008;105(24):8387-92.

119. Molife LR, Fong PC, Paccagnella L, Reid AH, Shaw HM, Vidal L, et al. The insulin-like growth factor-I receptor inhibitor figitumumab (CP-751,871) in combination with docetaxel in patients with advanced solid tumours: results of a phase Ib dose-escalation, open-label study. *Br J Cancer*.103(3):332-9.

 **FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS**
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA
Caixa Postal 6111, 13083-970 Campinas, SP
☎ (0_19) 3788-8936
FAX (0_19) 3788-8925
www.fem.unicamp.br/pesquisa/etica/index.html
cep@fem.unicamp.br

CEP, 24/05/05.
(Grupo I)

PARECER PROJETO: N° 124/2005

I-IDENTIFICAÇÃO:

PROJETO: "INVESTIGAÇÃO FUNCIONAL E CARACTERIZAÇÃO DO ENVOLVIMENTO DE NOVOS GENES ALVO E NOVAS TERAPÊUTICAS NAS SÍNDROMES MIELODISPLÁSICAS E EM LINHAGENS LEUCÊMICAS"
PESQUISADOR RESPONSÁVEL: Sara Terezinha Olalla Saad
INSTITUIÇÃO: Centro de Hematologia e Hemoterapia - UNICAMP
APRESENTAÇÃO AO CEP: 09/05/2005
APRESENTAR RELATÓRIO EM: 24/05/06

II - OBJETIVOS

O projeto visa a investigação funcional de novos genes alvo e novas terapêuticas nas mielodisplasias. Em vista de não haver modelos de células ou animais com mielodisplasias, para cumprimento de alguns objetivos serão utilizados linhagens leucêmicas. Analisar a regulação da expressão dos genes ARHGAP10, MASK em linhagens leucêmicas submetidas a diferentes agentes terapêuticos cultivadas em suspensão. Analisar a expressão diferencial dos genes ARHGAP10 e MASK em células de pacientes com SMDs cultivadas em suspensão e um ambiente de células estromais submetidas a diferentes terapias anti-tumorais. Huperexpressar MASK e ARHGAP10 em células hematopoéticas e verificar o perfil de expressão gênica por microarray. Induzir Ros e verificar a expressão de MASK, ARHFGAP10, formita, APAF e FLIP. Verificar a expressão das isofarmas de APAF e FLIP em células de medula óssea de pacientes com mielodisplasias e correlacionar com subgrupo e IPSS. Verificar a expressão de formita em células linfóides de pacientes com SMD e correlacionar com padrão de celularidade da medula óssea, grau de anemia, subgrupo de SMD e IPSS. Verificar a expressão de WT1 e PRAME e correlacionar com subgrupo de SMD e IPSS. Verificar o crescimento de colônias a partir de células precursoras de medula óssea de pacientes com SMD, em culturas de longa duração, submetidas a tratamento com diferentes drogas. Verificar a expressão de citocinas e moléculas de adesão em células aderente da cultura de longa duração. Verificar o perfil de expressão gênica de células CD34 + de pacientes co SMD, utilizando conjunto de genes conhecidos e transcritos humanos novos, imobilizados em lâminas de microarrays. Verificar a capacidade da célula dendrítica de SMD, derivada de célula mononuclear, induzir imunogenicidade quando transformada com mRNA de WT1. Investigar mutações nos genes PTPN11, AML-1, FLT3 e GATA-1 e verificara se estas mutações se relacionam com subgrupo de SMD, IPSS, progressão para leucemia.

- 1 -

III - SUMÁRIO

Para esse estudo participação, no mínimo, 34 pacientes, 23 mulheres, 11 homens, com idade entre 18 e 89 anos; sendo que pacientes novos admitidos no serviço serão convidados a participar. Serão incluídos no estudo os pacientes com diagnóstico de Síndrome Mielodisplásica, acompanhados no Ambulatório de Hematologia do Hemocentro da Unicamp por pelo menos 6 meses. o diagnóstico será feito com base em critérios clínicos e morfológicos, utilizados no serviço há pelo menos 15 anos, com exclusão de causas como carências vitamínicas, doenças inflamatórias, infecciosas, hepáticas, renais, endócrinas e outras neoplasias. Os pacientes e controles que aceitarem voluntariamente em participar do estudo serão submetidos a coleta de 5ml de medula óssea para extração de mRNA; citometria de fluxo para análise de PRAME, formina em leucócitos e células dendríticas; cultivo de células estromais (apenas em pacientes com idade acima de 65 anos); tratamento *in vitro* de células em suspensão com agentes terapêuticos (apenas pacientes com idade acima de 65 anos), tratamentos *in vitro* com agentes terapêuticos em ambiente de células estromais (apenas pacientes com idade acima de 65 anos); extração de DNA para investigação das mutações.

IV - COMENTÁRIOS DOS RELATORES

É um projeto bem elaborado, condizente com as normas do CEP e do CONEP. Apresenta bibliografia atualizada; o orçamento tem como fonte financiadora a FAPESP, no valor de R\$ 250.000,00. Após modificações o TCLE ficou adequado.

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, bem como ter aprovado o Termo do Consentimento Livre e Esclarecido, assim como todos os anexos incluídos na Pesquisa, resolve aprovar sem restrições o Protocolo de Pesquisa supracitado.

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.

PARTE DA PROPOSTA Nº 124/2005

VII - DATA DA REUNIÃO

Homologado na V Reunião Ordinária do CEP/FCM, em 24 de maio de 2005.

PROJETO "INVESTIGAÇÃO FUNCIONAL E CARACTERIZAÇÃO DO ENVOLVIMENTO DE NOVOS GENES ALVO E NOVAS TERAPÊUTICAS NAS SÍNDROMES MIELODISPLÁSIAS E SÍNDROMES LEUCÊMICAS"
PESQUISADOR RESPONSÁVEL: *Carmen Sílvia Bertuzzo*
INSTITUIÇÃO: FCM / UNICAMP
APRESENTAÇÃO AO CEP: 124/2005
APRESENTAR RELATÓRIO EM: 12/06/2005

Prof. Dra. Carmen Sílvia Bertuzzo
PRESIDENTE DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA
FCM / UNICAMP

II - OBJETIVOS

O projeto visa a investigação funcional de novos genes alvo para terapias nas mielodisplasias. Em caso de não haver sucesso em células primárias contendo mielodisplasias, será desenvolvido de alguns objetivos com utilização de linhas celulares. Analisar a regulação da expressão dos genes ARHGAP10, MASK, e verificar suas interações subcelulares e diferentes agentes regulatórios cultivadas em suspensão. Analisar a expressão diferencial dos genes ARHGAP10 e MASK, em células de pacientes com SMDs cultivadas em suspensão e em ambiente de células estromais subcelulares e interações intracelulares. Superexpressar MASK e ARHGAP10 em células hematopoiéticas e verificar o perfil de expressão gênica por microarray, indicar RT-PCR e verificar a expressão de MASK, ARHGAP10, Smad3, JAK2 e PLP. Verificar a expressão dos genes APAF-1, ILP em células de medula óssea de pacientes com mielodisplasias e correlacionar com subgrupos e IPSS. Verificar a expressão de Smad3 em células primárias de pacientes com SMD e correlacionar com padrão de alteração da medula óssea, grau de anemia, sub-grupo de SMD e IPSS. Verificar a expressão de WT1 e TRAME e correlacionar com subgrupos de SMD e IPSS. Verificar o crescimento de células a partir de células progenitoras da medula óssea de pacientes com SMD, em culturas de longa duração, avaliando a resposta com diferentes drogas. Verificar a expressão de citocinas e moléculas de adesão em células aderentes de cultura de longa duração. Verificar o perfil de citocinas, a expressão de células CD34+ em pacientes com SMD, em cultura exposta de gases carcinogênicos e transportes iônicos ativos, localizados em áreas de microarranjo. Verificar a expressão de células aderentes de SMD, derivada de células progenitoras, natural, heterogeneidade quando comparada com células de WT1, avaliando moléculas de adesão CD133, AML-1, PLT e GATA-1 e verificar se essas moléculas se relacionam com subgrupos de SMD, IPSS, progressão ou toxicidade.

Anexo II

Resumo Projeto Temático - processo nº 05/51681-1

Título: "Investigação funcional e caracterização do envolvimento de novos genes alvo e novas terapêuticas nas síndromes mielodisplásicas e em linhagens leucêmicas"

As síndromes mielodisplásicas (SDMs) constituem um grupo heterogêneo de desordens hematopoiéticas, que exibem hematopoiese ineficaz. Pouco se sabe a respeito da patogênese das SMDs e dos processos que medeiam a sua freqüente transformação em leucemias. Nos últimos anos tem se tomado evidente que alterações na composição e/ou função do microambiente celular podem ser implicadas na progressão de diversas desordens hematológicas, particularmente em SMDs. Novas terapias têm sido propostas a partir das características biológicas deste tipo de tumor, porém os eventos moleculares responsáveis pela manutenção ou propagação da população clonal anômala permanecem ainda desconhecidos, sendo que muitas vezes os agentes terapêuticos utilizados não são alvo-específico. Sendo assim, a caracterização de alvos moleculares importantes para os processos de diferenciação e progressão tumoral mielóide poderá fornecer informações que podem contribuir para a geração de novas drogas com maior e melhor especificidade de ação. A partir do Projeto Genoma Humano, diversos genes novos têm sido identificados, muitos deles apresentando grande potencial para alvos terapêuticos. A proposta deste projeto é a caracterização da regulação da expressão de novos genes, especificamente: ARHGAP21, MASK e Formina, assim como de outras proteínas, nas mielodisplasias, frente a diferentes tratamentos, visando investigar mecanismos moleculares deste tipo de tumor e o desenvolvimento de novas estratégias para terapia anti-tumoral. Em vista de não haver modelos de células ou animais com mielodisplasia, para cumprimento de alguns objetivos utilizaremos linhagens leucêmicas como modelos. Além disso mutações serão pesquisadas em genes que podem se associar com evolução para leucemia como PTPN11, FLT3, AML-1, GATA-1 .

PALAVRAS- CHAVES: mielodisplasia, MASK, ARHGAP 21, Formina, estroma , APAF-1

Apêndice I

Artigo aceito para Publicação

Knockdown of Insulin Receptor Substrate 1 reduces proliferation and downregulates Akt/mTOR and MAPK pathways in K562 cells. João Agostinho Machado-Neto Patrícia Favaro; Mariana Lazarini; Fernando Ferreira Costa; Sara T Olalla Saad; Fabiola Traina. Aceito em 13 de Abril de 2011 pela Biochimica and Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease.

Fwd: BBAMCR-10-396R1: Final Decision

1 mensagem

Joao Agostinho Machado Neto <jamachadoneto@gmail.com>
Para: guto7072@gmail.com

14 de abril de 2011 08:38

----- Forwarded message -----

From: Fabiola Traina <fabiola@unicamp.br>
Date: 2011/4/13

Subject: Fwd: BBAMCR-10-396R1: Final Decision

To: Joao Agostinho Machado Neto <jamachadoneto@gmail.com>, Patricia Favaro <favaro@unicamp.br>, Mariana Lazarini <marilazarini@gmail.com>, Sara Saad <sara@unicamp.br>

----- Forwarded message -----

From: BBA - Molecular Cell Research (ELS) <bbamcr@elsevier.com>

Date: 2011/4/13

Subject: BBAMCR-10-396R1: Final Decision

To: fabiola@unicamp.br

Manuscript No.: BBAMCR-10-396R1

Title: Knockdown of Insulin Receptor Substrate 1 reduces proliferation and downregulates Akt/mTOR and MAPK pathways in K562 cells

Article Type: Regular Paper

BBA Section: BBA - Molecular Cell Research

Corresponding Author: Dr Fabiola Traina

All Authors: Joao Machado-Neto, BSc; Patricia Favaro, Ph.D.; Mariana Lazarini, Ph.D.; Fernando F Costa, MD; Sara T Saad, MD; Fabiola Traina, MD

Submit Date: Jan 06, 2011

Dear Dr. Traina:

We are pleased to inform you that the above-noted paper has been accepted for publication in Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research.

Your article will be published rapidly in electronic form, as well as in the traditional print journal in the first available scheduled issue.

Shortly, you will receive an acknowledgement letter detailing information regarding proofs, reprints and copyright transfer.

We once again thank you for your contribution to BBA - Molecular Cell Research and hope that you will continue to submit your research articles to the journal.

On behalf of Dr. Anita Corbett,
Yours sincerely,

Denise M. Wells, Ph.D.
BBA - Molecular Cell Research

Title of the paper:

Knockdown of Insulin Receptor Substrate 1 reduces proliferation and downregulates Akt/mTOR and MAPK pathways in K562 cells

João Agostinho Machado-Neto^a, Patricia Favaro^{a,b}, Mariana Lazarini^a, Fernando Ferreira Costa^a, Sara T Olalla Saad^a, Fabiola Traina^a

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

^bDepartment of Biological Sciences, Federal University of São Paulo, Diadema, São Paulo, Brazil

Correspondence:

Fabiola Traina

Hemocentro - Unicamp

Rua Carlos Chagas, 480, CEP 13083-878

Campinas, SP, Brazil

Phone: 55-19-35218734; Fax: 55-19-3289-1089

E-mail: fabiolat@unicamp.br

Abstract

BCR-ABL kinase activates downstream signaling pathways, including the PI3K-Akt/mTOR and the MAPK pathway. IRS1 has been previously described as constitutively phosphorylated and associated with BCR-ABL in K562 cells, suggesting that IRS1 has role in the BCR-ABL signaling pathways. In this study, we analyzed the effect of IRS1 silencing, by shRNA-lentiviral delivery, in K562 cells, a CML cell line that presents the BCR-ABL. IRS1 silencing decreased cell proliferation and colony formation in K562 cells, which correlates with the delay of these cells at the G0/G1 phase and a decrease in the S phase of the cell cycle. Furthermore, IRS1 silencing in K562 cells resulted in a decrease of Akt, P70S6K and ERK1/2 phosphorylation. Nevertheless, apoptosis was unaffected by IRS1 knockdown and no alterations were found in the phosphorylation of BAD and in the expression of BCL2 and BAX. BCR-ABL and CRKL phosphorylation levels remained unaffected upon IRS1 silencing, and no synergistic effect was observed with imatinib treatment and IRS1 knockdown, indicating that IRS1 is downstream from BCR-ABL. In conclusion, we demonstrated that inhibition of IRS1 is capable of inducing the downregulation of Akt/mTOR and MAPK pathways and further decreasing proliferation, clonogenicity and induces cell cycle delay at G0/G1 phase in BCR-ABL cells.

Keywords: IRS1, Akt/mTOR, MAPK, K562 cells, BCR-ABL, proliferation

1. Introduction

The signaling network controlled by the breakpoint cluster region-abelson (BCR-ABL) kinase is complex and highly redundant and the sum of these protein interactions is translated into the altered phenotype of BCR-ABL-expressing chronic myeloid leukemia (CML) cells, as well as of Philadelphia-positive (Ph⁺) acute lymphoblastic leukemia (ALL) cells[1]. Significant effort has been placed into understanding the molecular mechanism of action of BCR-ABL through the identification of signaling pathways that are affected by BCR-ABL tyrosine kinase activity. Numerous substrates and binding partners of BCR-ABL have been identified and current efforts are directed at linking these pathways to the specific pathologic defects that characterize CML[1]. Despite the seemingly endless expansion of the list of pathways activated by BCR-ABL and the increasing complexity revealed in these pathways, all of the transforming functions of BCR-ABL are dependent on its tyrosine kinase activity[2], which is specifically inhibited by imatinib mesylate (Gleevec/Glivec, formerly STI571; Novartis, Basel, Switzerland)[3]. Imatinib is a small molecular inhibitor of BCR-ABL kinase and potently induces growth arrest and apoptosis of BCR-ABL cells. The development of resistance to imatinib has recently emerged as an important problem in patients with CML, most often due to acquired mutations in the target kinase[4, 5]. Different strategies have been implemented to overcome this resistance, including the synthesis of new BCR-ABL ATP-competitive or non-ATP-competitive inhibitors and multi-targeted kinase inhibitors[1]. An alternative approach is the use of other compounds that do not bind directly to the BCR-ABL protein; instead, these molecules act on several downstream pathways, regulated by or linked in different ways to BCR-ABL, which leads to the malignant transformation of the cells.

Insulin receptor substrate 1 (IRS1) is an intracellular signaling adaptor protein that integrates and coordinates numerous biologically key extracellular signals within the cell. First identified as a signaling intermediate of the insulin receptor (IR), it is now clear that IRS1 is the main substrate of the insulin-like growth factor 1 receptor (IGF-1R) and alterations in IRS1 expression have been linked to diabetes and specific cancers (hepatocellular, pancreatic, breast)[6]. IRS1 contains multiple tyrosine phosphorylation sites, which during insulin stimulation are phosphorylated and act as docking sites for multiple SH2-containing proteins including p85, Grb2, Nck, Crk, Fyn, Syp and SHP2[7]. Thus, insulin stimulation results in the activation of many downstream pathways; the two best-studied being the phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)-Akt/mammalian target of rapamycin (mTOR) and the Ras-mitogen-activated protein kinase (MAPK) pathway, which includes the extracellular signal-regulated kinase (ERK)[7, 8]. The PI3K-Akt/mTOR signaling pathway plays a critical role in a number of biological events, including mitogenesis, cell motility, metabolism, cytoskeletal organization, and cell survival[9]. There are several YMXM motifs in the COOH-terminus on IRS1 that, when phosphorylated by receptor tyrosine kinases (RTKs), bind to the SH2 domain of the p85 regulatory subunit of PI3K, resulting in the downstream activation of numerous mitogenic and oncogenic effectors, most notably Akt[7, 9]. IRS1 binding to Grb2, which is normally associated with mSOS (a guanine nucleotide exchange factor), leads to stimulation of the classic MAPK pathway, which includes the activation of the Ras/Erk cascade of kinases[10, 11]. The MAPK pathway is instrumental in cell growth, differentiation and mutations in its downstream effectors are related to numerous cancers[12]. In addition, IRS1 signaling involves the docking and regulation of non-SH2 binding proteins and phosphorylated IRS1 has been shown

to bind to the loop domain of anti-apoptotic signaling protein, BCL2, and enhance its anti-apoptotic activity[13].

Despite the fact that IRS1 has no intrinsic kinase activity and requires upstream activators, many studies have shown that this signaling adaptor is in itself oncogenic and can induce malignant transformation[14-16]. Even though most of our knowledge regarding the molecular functions of IRS1 protein has been derived from studies in the insulin signaling system, there is evidence that this protein participates in the BCR-ABL signaling pathway. IRS1 has been previously described as being constitutively phosphorylated and associated with BCR-ABL in K562 cells[17], and IRS1 expression was found to be negatively correlated with survival in BCR-ABL positive ALL patients, regardless of age and white blood cell count at diagnosis[18]. Thus, new findings regarding the mechanisms that link IRS1 with BCR-ABL may be useful for developing novel therapeutic targets and prognostic markers in BCR-ABL diseases. Hence, to further understand the mechanisms of the action of IRS1 in the malignant process through which BCR-ABL transforms cells, we have attempted to identify the role of IRS1 in cell proliferation, clonogenicity, cell cycle and apoptosis in K562 cells.

2. Materials and methods

2.1 Cell culture and reagent chemicals

K562 cells, which are known as a representative human CML cell line, were obtained from ATCC, Philadelphia, PA, USA. Cells were cultured in RPMI containing 10% fetal bovine serum (FBS) and glutamine with penicillin/streptomycin and amphotericin B, and maintained at 37°C, 5% CO₂. Imatinib mesylate was kindly provided by Novartis Pharmaceuticals, Basel, Switzerland, and prepared as a 50 mM stock solution in dimethyl sulfoxide (Me₂SO₄; DMSO).

2.2 Transduction of lentivirus

K562 cells were transduced with lentivirus-mediated shRNA nonspecific control (sc-108080) or lentivirus-mediated shRNA targeting *IRS1* (sc-29376) from Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA) and named shControl and shIRS1 cells, respectively. Briefly, 2×10⁵ cells were transduced with lentiviral by spinoculation at multiplicity of infection equal to 0.5 and selected by puromycin (1.75 µg/mL).

2.3 Real-time RT-PCR analysis

Total RNA was extracted from cells using the TRIzol reagent, according to the manufacturer's instructions (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). The reverse transcription reaction was performed using RevertAid™ First Strand cDNA Synthesis Kit, according to the manufacturer's instructions (MBI Fermentas, St. Leon-Rot, Germany). Expression of *IRS1* mRNA was detected by Maxima Sybr green qPCR master mix, according to the manufacturer's instructions (MBI Fermentas, St. Leon-Rot, Germany) in the ABI 7500 Sequence Detection System (PE Applied-Biosystem) using specific primers: forward

5'-TGACCATGCAGATGAGTTGTCC-3', reverse 5'-
CGCATGTCAGCATAGCTTACAG-3'; *HPRT* and *β-actin* were used as endogenous
control and primers respectively were: forward 5'-
GAACGTCTTGCTCGAGATGTGA-3', reverse 5'-
TCCAGCAGGTCAGCAAAGAAT-3' and forward 5'-AGGCCAACCGCGAGAAG-
3', reverse 5'- ACAGCCTGGATAGCAACGTACA-3'. Relative levels of gene
expression were quantified. The relative quantification value was calculated using the
equation, $2^{-\Delta\Delta CT}$ [19]. A negative 'No Template Control' was included for each primer
pair. The dissociation protocol was performed at the end of each run to check for non-
specific amplification. Three replicas were run on the same plate for each sample.

2.4 Western Blot

Equal amounts of protein were used for total extracts or for immunoprecipitation with
specific antibodies followed by SDS-PAGE and Western blot analysis with the
indicated antibodies and ECL™ Western Blotting Analysis System (Amersham
Pharmacia Biotech, UK Ltd., Buckinghamshire, England) as described[17]. Monoclonal
antibodies against phospho(p)-tyrosine (sc-508), ABL (sc-23), p-ERK (sc-7383),
P70S6K (sc-8418), CRKL (sc-319), BAX (sc-20067) and polyclonal antibodies against
Actin (sc-1616), IRS-1 (sc-559), Akt 1/2 (sc-8312), p-P70S6K (sc-7984), BLC2 (sc-
492), p-BAD (sc-7999) and BAD (sc-943) were from Santa Cruz Biotechnology (Santa
Cruz, CA, USA). Monoclonal antibodies against p-Akt (9271) and p-CRKL (3181)
were from Cell Signaling Technology (Cell Signaling, Danvers, MA, USA) and Anti-
ERK1/2 (13-6200) was from Zymed (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). Blots were
stripped and reprobed as necessary. Quantitative analyses of the optical intensities
protein bands were determined with *Scion Image software* (ScionCorp, Frederick, MD,

USA) and normalized by actin for protein expression or total protein for protein phosphorylation.

2.5 Methylthiazole tetrazolium (MTT) assay

Cell proliferation was measured by MTT assay. ShControl and shIRS1 cells were serum-starved in 0.5% FBS for 12 hours. A total of 5×10^4 cells per well were then plated in a 96-well plate in RPMI 10% FBS at different concentrations of imatinib mesylate (0.1, 0.5 or 1 μ M) for 48 hours. In brief, 10 μ l of a 5mg/mL solution of MTT were added to the wells and incubated at 37°C for 4 hours. The reaction was stopped by using 100 μ L of 0.1N HCl in anhydrous isopropanol. Cell growth was evaluated by measuring the absorbance at 570nm, using an automated plate reader. All conditions were tested in six replicates.

2.6 Colony formation assay

Colony formation was carried out in semisolid methyl cellulose medium (0.5×10^3 cell/mL; MethoCult 4230; StemCell Technologies Inc., Vancouver, BC, Canada). Colonies were detected after 8 days of culture by adding 1mg/mL of MTT reagent and scored by Image J quantification software (U.S. National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA). ShControl and shIRS1 cells were submitted to colony formation assay in the presence or absence of imatinib mesylate (0.1, 0.5 or 1 μ M). All conditions were tested in duplicate.

2.7 Cell cycle analysis

Cells were fixed in 70% ethanol, for at least 2 hours at 4°C, and stained with 20 μ g/mL propidium iodide (PI) containing 10 μ g/mL RNase A for 30 minutes at room

temperature. Fluorescence cell analysis was performed with a FACSCalibur (Becton–Dickinson, CA, USA). Resulting DNA distributions were analyzed by Modifit (Verify Software House Inc., Topsham, ME, USA) for the proportions of cells in the phases of the cell cycle.

2.8 Assessment of apoptosis by Annexin-V and PI staining

ShControl and shIRS1 cells were seeded on 12-well plates and treated with different concentrations of imatinib mesylate (0.1, 0.5 or 1 μ M) for 48 hours. Cells were then washed twice with ice cold PBS and resuspended in binding buffer containing 1 μ g/mL PI and 1 μ g/mL FITC labeled Annexin-V. All specimens were analyzed on a FACSCalibur after incubation for 15 minutes at room temperature in a light-protected area. Ten thousand events were acquired for each sample.

2.9 Caspase-3 activity assay

Caspase-3 activity was measured as recommended by the manufacturer (Calbiochem, La Jolla, CA, USA). ShControl and shIRS1 cells were seeded in 6-well plate and treated with different concentrations of imatinib mesylate (0.1, 0.5 or 1 μ M) for 48 hours. Cells (10^6 cells/mL) were incubated with FITC-DEVD-FMK (1:300) in non-supplemented medium for 40 minutes at 37°C in a humidified atmosphere of 5% CO₂. Cells were then washed, resuspended in non-supplemented medium and analyzed by flow cytometry using the FL-1 channel.

2.10 Statistical analysis

Statistical analysis was performed using GraphPad InStat 3 (GraphPad Software, Inc., San. Diego, CA, USA). Data were expressed as the mean \pm standard deviation (SD).

For comparisons, an appropriate Student's *t*-test or Mann-Whitney test were used. The level of significance was set at $P < 0.05$.

3. Results

3.1 Efficient downregulation of IRS1 expression and its phosphorylation in K562 cells after lentivirus shRNA transduction

To examine the effects of IRS1 silencing on a CML cell model, K562 cells were stably transduced with lentivirus-mediated shRNA targeting IRS1 or an appropriate control. After selection by puromycin, mRNA and proteins levels of IRS1 were determined by real time RT-PCR and Western blot. A significant reduction in *IRS1* mRNA (by 84±2%) and protein (by 74±9%) levels was observed in shIRS1 when compared with shControl (Fig. 1A-C). Since the signaling through IRS1 is regulated not only at the expression level, but at the phosphorylation level as well, it was important to confirm whether IRS1 silencing also resulted in the downregulation of its own phosphorylation. Similarly to what was observed with IRS1 expression, IRS1 phosphorylation was significantly decreased in shIRS1 cells when compared with shControl cells (by 45±6%) (Fig. 1D). We then verified whether IRS1 silencing interfered with the phosphorylation levels of other phosphotyrosine-containing proteins, and found that a reduced tyrosine phosphorylation of proteins was observed in a total protein extract from the shIRS1 cells when compared with shControl cells (Fig. 1E).

3.2 IRS1 silencing significantly reduces proliferation in K562 cells

The effect of IRS1 silencing on the proliferation of K562 cells was accessed by MTT assay. After 48 hours of culture, proliferation was significantly reduced in shIRS1 cells when compared with shControl cells (inhibition rate = 40±5%; $P=0.002$) (Fig. 2A). This result prompted us to observe for the effects of IRS1 silencing, concomitant with

imatinib mesylate treatment in K562 cells, as this small-molecule is capable of inhibiting IRS1 phosphorylation, as previously described[17] and as shown in Figure 2B, and presents remarkable clinical activity in patients with CML[1]. As expected, after 48 hours of treatment with 0.1, 0.5 or 1 μ M of imatinib mesylate, we observed a dose-response effect in reducing proliferation in K562 cells. When cells were exposed to 0.1 μ M imatinib, the ability of IRS1 silencing to reduce proliferation was evident compared to shControl ($P=0.002$). However, no synergism was observed between imatinib treatment and IRS1 silencing (Fig. 2A). Thus, it was clear that although IRS1 knockdown reduced the proliferation of K562 cells, no cumulative effect was observed with imatinib treatment and IRS1 silencing.

3.3 IRS1 silencing inhibits colony formation of K562 cells

Colony formation was used to determine whether IRS1 silencing in K562 cells altered clonal growth. ShControl and shIRS1 cells were suspended in a methylcellulose medium and assessed for their ability to form colonies. A significant decrease of $61\pm 14\%$ in the number of colonies was observed in shIRS1, as compared to shControl cells ($P=0.0007$; Fig. 3). Imatinib treatment resulted in a dose dependent inhibition of K562 cell colony formation. At the lowest dose of imatinib (0.1 μ M), we still observed the effect of IRS1 silencing on colony formation, when compared with shControl ($P=0.0008$). Once again, no synergistic effect was observed between the imatinib mesylate treatment and IRS1 silencing. These findings indicated that IRS1 knockdown in K562 cells resulted in a clonogenic reduction.

3.4 IRS1 silencing induces cell cycle delay at the G0/G1 phase K562 cells

Flow cytometry analyses revealed a significant accumulation of shIRS1 cells at G0/G1 phase of the cell cycle followed by a decreasing number of cells in the S phase, when compared with shControl cells (Table 1). IRS1 silencing in K562 cells then induced a G0/G1 block and prevented cells from entering the S phase, which correlated with decreased cell proliferation and colony formation.

3.5 Apoptosis is unaffected by IRS1 knockdown

To investigate the effects of IRS1 silencing on cell death, the rate of apoptosis was evaluated by flow cytometry after cell incubation with annexin-V/PI, and also with FITC-DEVD-FMK for measuring caspase 3 activity. No difference in the percentage of apoptosis, either by Annexin-V/PI or caspase 3 assays, was observed in shIRS1 cells when compared with shControl cells (Fig. 4 and 5 respectively). Imatinib mesylate treatment, together with IRS1 knockdown, showed no cumulative effects, although drug treatment alone effectively induced apoptosis and caspase 3 activity in a dose-response manner (Fig. 4 and 5, respectively).

3.6 IRS1 silencing results in downregulation of the Akt/mTOR and MAPK pathways

Of the IRS1 intracellular signaling pathways, two main pathways, the PI3K-Akt/mTOR and the Ras/MAPK cascades, have been previously shown to be activated by IRS1[6]. Thus, it may be debated as to whether these pathways are downregulated after IRS1 silencing in BCR-ABL cells.

Akt and P70S6K phosphorylation were significantly decreased in shIRS1 cells, when compared with shControl cells; showing a reduction of $55\pm 3\%$ and $59\pm 14\%$, $P < 0.05$, respectively (densitometry quantification and normalization for total protein of three

independent experiments) (Fig. 6). There was a similar significant decrease in ERK1/2 phosphorylation in shIRS1 cells when compared with shControl cells (reduction of $67\pm 11\%$, $P=0.0083$) (Fig. 6). The expression level of the anti-apoptotic BCL2, the pro-apoptotic BAX protein, and the phosphorylation levels of the pro-apoptotic BAD protein demonstrated no differences between shIRS1 and shControl cells (Fig. 7). The downregulation in the phosphorylation of Akt, P70S6K and ERK1/2 proteins in shIRS1 cells were in agreement with lower rates of cell proliferation upon IRS1 silencing. Nevertheless, proteins involved in survival signaling along the same pathway as BCL2, BAX and BAD were not modulated by IRS1 silencing, corroborating our findings in apoptosis.

3.7 IRS1 silencing does not affect BCR-ABL and CRKL phosphorylation

We checked if IRS1 silencing would change the phosphorylation status of BCR-ABL and CRKL, a protein downstream to BCR-ABL. No modulation in BCR-ABL or CRKL phosphorylation levels was observed in shIRS1 cells, when compared with shControl cells (Fig. 8).

4. Discussion

Herein, we analyzed the effect of IRS1 silencing, by shRNA-lentiviral delivery, in K562 cells, a well established CML cell line that presents the BCR-ABL chimeric oncogene, known as the Philadelphia translocation. Our results showed that IRS1 silencing with consequently decreased IRS1 phosphorylation, decreased cell proliferation and clonogenicity in K562 cells, which correlates with the delay of these cells at the G0/G1 phase and a decrease in the S phase of the cell cycle. These findings are in agreement with those of other authors that have previously described the role of IRS1 in proliferation and in somatic growth regulation. For instance, IRS1-deficient mice were approximately 30% smaller than the wild-type littermates[20, 21]. Nevertheless, overexpression of IRS1 in the mouse mammary gland resulted in hyperplasia and tumorigenesis[22]. The oncogenic role of IRS1 and its ability to induce malignant transformation have been previously described[15, 23]. The inhibition of IRS1 with siRNA strategies has been shown to represent a good target for controlling proliferation in prostate, breast and hepatoma cancer cell lines[22, 24-27]. Interestingly, the inhibition of the IGF-1R, a tyrosine kinase receptor upstream to IRS1, decreased the clonogenicity of leukemic progenitors and the proliferation of PI3K activated acute myeloid leukemia cells[28]. Our results provide new evidence that IRS1 also plays a role in proliferation in BCR-ABL cells.

To further clarify the signaling pathway inhibited by IRS1 knockdown in K562 cells, we checked the activation status of Akt and P70S6K, essential proteins of the Akt/mTOR pathway, and ERK1/2, one of the MAPK proteins. These signaling pathways regulate a variety of cellular activities including proliferation, differentiation, survival, and death[29, 30]. IRS1 silencing in K562 cells resulted in a decrease of Akt, P70S6K and ERK1/2 phosphorylation, indicating a downregulation in Akt/mTOR and

MAPK pathway, respectively. The role of IRS1 in the activation of Akt/mTOR and MAPK pathways is well known [7, 8]. A previous study by our group showed that IRS1 associated and activated PI3K in K562 cells and also associated with Grb2 [17], justifying our current findings demonstrating that IRS1 knockdown decreases Akt and P70S6K phosphorylation, possibly through downregulation of PI3K signaling, in addition to the decrease of ERK1/2 phosphorylation, possibly through the IRS1/Grb2 association that ultimately links IRS1 to the Ras signaling cascade. Taken together, these findings indicate that the inhibition of IRS1 results in decreased proliferation and clonogenicity of cells and in the inhibition of Akt, P70S6K and ERK1/2 phosphorylation. Moreover, a significant accumulation of cells in the G0/G1 phase of the cell cycle, followed by a decreased number of cells in the S phase was observed. These are interesting findings, which are supported by previous evidence that the activation of P70S6K regulates a wide range of cellular processes including protein synthesis, progression of G1 towards the S phase of the cell cycle[31, 32]. Furthermore, inhibition of P70S6K blocks proliferation and induces G1 cell cycle arrest without affecting apoptosis in pancreatic cancer cells [33].

In BCR-ABL cells, IRS1 silencing did not affect apoptosis, despite the inhibition of Akt phosphorylation. The most established function of Akt in mammalian cells is inhibition of apoptosis, which may contribute to the genesis of cancer. However, this function alone is not likely to be sufficient to explain the frequent activation of Akt in human cancer. Genetic evidence that Akt is required for cell proliferation, normal G1/S phase transition and oncogenic transformation, regardless of its antiapoptotic function, have been previously described[34]. Increased activation of Akt has been associated with increased cell proliferation in cancer[34] and with poor prognosis in acute leukemia[35]. Indeed, it is known that the specific inhibition of PI3K activity decreases

AML cell proliferation without inducing apoptosis[36, 37] and inhibition of IGF-1R blocks proliferation; without affecting apoptosis in AML bone marrow samples[28]. The observation that apoptosis was not modulated by IRS1 silencing, are in agreement with the non-modulation of proteins involved in apoptosis, thus no changes were observed in phosphorylation of BAD and in the expression of BCL2 and BAX. These results also indicate that activation of multiple molecules and signaling pathways downstream to BCR-ABL lead to the malignant transformation of the cells and are responsible for the leukemia phenotype, suggesting that multi-target protein inhibitors are necessary to control the disease.

We showed that there were no cumulative effects of IRS1 silencing and imatinib mesylate treatment on cell proliferation and colony formation, neither in apoptosis, in K562 cells. As previously reported, IRS1 is associated with BCR-ABL in K562 cells[17], and the finding that IRS1 silencing does not modulate the phosphorylation of BCR-ABL and CRKL proteins indicates that IRS1 acts as a downstream adaptor protein to the BCR-ABL pathway. In this context, the inhibition of BCR-ABL by imatinib treatment may overcome the effect of IRS1 silencing and be highly efficient in reducing proliferation and clonogenicity and in inducing apoptosis in K562 cells. Nevertheless, the inhibition of IRS1 alone, as observed in cells not exposed to imatinib, is capable of inhibiting proliferation, clonogenicity and promotes cell cycle arrest in BCR-ABL cells. The same effects were also observed in IRS1 knockdown cells exposed to a low dose of imatinib (0.1 μ M). These findings draw attention to the possibility of controlling cell proliferation in BCR-ABL-positive cells by targeting other proteins, in addition to BCR-ABL.

5. Conclusions

Tyrosine kinase inhibitors, such as imatinib mesylate, have rationally been designed as first-line therapies for CML. However, the success of these inhibitors has been tempered by the emergence of resistance to the treatment, causing recurrence of CML. Thus, the identification of new target genes/pathways involved in the pathophysiology of CML disease is critical. We demonstrated, for the first time, that IRS1 silencing results in a decrease on proliferation and downregulation of the Akt/mTOR and MAPK pathways in the K562 cell line. These novel findings open the door to future research where studies using other CML cell lines, patient cells, in addition to *in vivo* growth of K562 shIRS1 cells in a xenogeneic model could provide further evidence for the role of IRS1 in BCR-ABL-mediated tumorigenesis and consequently, validate IRS1 as a target gene for treatment of Imatinib resistant CML. However, target IRS1 as a complementary therapeutic regimen to CML appears to be a reasonable measure, as IGF-1R has already become a target for anticancer therapy in several tumor types[38-40].

6. Acknowledgments

The authors would like to thank Dr Nicola Coran and Raquel S Foglio for the English review. This work received financial support from Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP). The Hematology and Hemotherapy Centre - UNICAMP is part of the National Institute of Blood, Brazil (INCT de Sangue – CNPq/MCT).

7. Reference

- [1] Druker BJ. Translation of the Philadelphia chromosome into therapy for CML. *Blood* 2008;112:4808-17.
- [2] Lugo TG, Pendergast AM, Muller AJ and Witte ON. Tyrosine kinase activity and transformation potency of bcr-abl oncogene products. *Science* 1990;247:1079-82.
- [3] Druker BJ, Sawyers CL, Kantarjian H, Resta DJ, Reese SF, Ford JM, Capdeville R and Talpaz M. Activity of a specific inhibitor of the BCR-ABL tyrosine kinase in the blast crisis of chronic myeloid leukemia and acute lymphoblastic leukemia with the Philadelphia chromosome. *N Engl J Med* 2001;344:1038-42.
- [4] O'Hare T, Eide CA and Deininger MW. Bcr-Abl kinase domain mutations, drug resistance, and the road to a cure for chronic myeloid leukemia. *Blood* 2007;110:2242-9.
- [5] Shah NP and Sawyers CL. Mechanisms of resistance to STI571 in Philadelphia chromosome-associated leukemias. *Oncogene* 2003;22:7389-95.
- [6] Dearth RK, Cui X, Kim HJ, Hadsell DL and Lee AV. Oncogenic transformation by the signaling adaptor proteins insulin receptor substrate (IRS)-1 and IRS-2. *Cell Cycle* 2007;6:705-13.
- [7] Taniguchi CM, Emanuelli B and Kahn CR. Critical nodes in signalling pathways: insights into insulin action. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2006;7:85-96.
- [8] Shepherd PR. Mechanisms regulating phosphoinositide 3-kinase signalling in insulin-sensitive tissues. *Acta Physiol Scand* 2005;183:3-12.
- [9] Shepherd PR, Withers DJ and Siddle K. Phosphoinositide 3-kinase: the key switch mechanism in insulin signalling. *Biochem J* 1998;333 (Pt 3):471-90.
- [10] Myers MG, Jr., Wang LM, Sun XJ, Zhang Y, Yenush L, Schlessinger J, Pierce JH and White MF. Role of IRS-1-GRB-2 complexes in insulin signaling. *Mol Cell Biol* 1994;14:3577-87.
- [11] Skolnik EY, Batzer A, Li N, Lee CH, Lowenstein E, Mohammadi M, Margolis B and Schlessinger J. The function of GRB2 in linking the insulin receptor to Ras signaling pathways. *Science* 1993;260:1953-5.
- [12] Torii S, Yamamoto T, Tsuchiya Y and Nishida E. ERK MAP kinase in G cell cycle progression and cancer. *Cancer Sci* 2006;97:697-702.
- [13] Ueno H, Kondo E, Yamamoto-Honda R, Tobe K, Nakamoto T, Sasaki K, Mitani K, Furusaka A, Tanaka T, Tsujimoto Y, Kadowaki T and Hirai H. Association of insulin receptor substrate proteins with Bcl-2 and their effects on its phosphorylation and antiapoptotic function. *Mol Biol Cell* 2000;11:735-46.
- [14] D'Ambrosio C, Keller SR, Morrione A, Lienhard GE, Baserga R and Surmacz E. Transforming potential of the insulin receptor substrate 1. *Cell Growth Differ* 1995;6:557-62.
- [15] Ito T, Sasaki Y and Wands JR. Overexpression of human insulin receptor substrate 1 induces cellular transformation with activation of mitogen-activated protein kinases. *Mol Cell Biol* 1996;16:943-51.
- [16] Tanaka S, Ito T and Wands JR. Neoplastic transformation induced by insulin receptor substrate-1 overexpression requires an interaction with both Grb2 and Syp signaling molecules. *J Biol Chem* 1996;271:14610-6.
- [17] Traina F, Carvalheira JB, Saad MJ, Costa FF and Saad ST. BCR-ABL binds to IRS-1 and IRS-1 phosphorylation is inhibited by imatinib in K562 cells. *FEBS Lett* 2003;535:17-22.

- [18] Juric D, Lacayo NJ, Ramsey MC, Racevskis J, Wiernik PH, Rowe JM, Goldstone AH, O'Dwyer PJ, Paietta E and Sikic BI. Differential gene expression patterns and interaction networks in BCR-ABL-positive and -negative adult acute lymphoblastic leukemias. *J Clin Oncol* 2007;25:1341-9.
- [19] Livak KJ and Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 2001;25:402-8.
- [20] Araki E, Lipes MA, Patti ME, Bruning JC, Haag B, 3rd, Johnson RS and Kahn CR. Alternative pathway of insulin signalling in mice with targeted disruption of the IRS-1 gene. *Nature* 1994;372:186-90.
- [21] Tamemoto H, Kadowaki T, Tobe K, Yagi T, Sakura H, Hayakawa T, Terauchi Y, Ueki K, Kaburagi Y, Satoh S and et al. Insulin resistance and growth retardation in mice lacking insulin receptor substrate-1. *Nature* 1994;372:182-6.
- [22] Dearth RK, Cui X, Kim HJ, Kuitse I, Lawrence NA, Zhang X, Divisova J, Britton OL, Mohsin S, Allred DC, Hadsell DL and Lee AV. Mammary tumorigenesis and metastasis caused by overexpression of insulin receptor substrate 1 (IRS-1) or IRS-2. *Mol Cell Biol* 2006;26:9302-14.
- [23] Cristofanelli B, Valentini B, Soddu S, Rizzo MG, Marchetti A, Bossi G, Morena AR, Dews M, Baserga R and Sacchi A. Cooperative transformation of 32D cells by the combined expression of IRS-1 and V-Ha-Ras. *Oncogene* 2000;19:3245-55.
- [24] Nolan MK, Jankowska L, Prisco M, Xu S, Guvakova MA and Surmacz E. Differential roles of IRS-1 and SHC signaling pathways in breast cancer cells. *Int J Cancer* 1997;72:828-34.
- [25] Oliveira JC, Souza KK, Dias MM, Faria MC, Ropelle ER, Flores MB, Ueno M, Velloso LA, Saad ST, Saad MJ and Carvalheira JB. Antineoplastic effect of rapamycin is potentiated by inhibition of IRS-1 signaling in prostate cancer cells xenografts. *J Cancer Res Clin Oncol* 2008;134:833-9.
- [26] Taouis M, Dupont J, Gillet A, Derouet M and Simon J. Insulin receptor substrate 1 antisense expression in an hepatoma cell line reduces cell proliferation and induces overexpression of the Src homology 2 domain and collagen protein (SHC). *Mol Cell Endocrinol* 1998;137:177-86.
- [27] Tanaka S, Mohr L, Schmidt EV, Sugimachi K and Wands JR. Biological effects of human insulin receptor substrate-1 overexpression in hepatocytes. *Hepatology* 1997;26:598-604.
- [28] Chapuis N, Tamburini J, Cornillet-Lefebvre P, Gillot L, Bardet V, Willems L, Park S, Green AS, Ifrah N, Dreyfus F, Mayeux P, Lacombe C and Bouscary D. 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* 95:415-23.
- [29] Cobb MH. MAP kinase pathways. *Prog Biophys Mol Biol* 1999;71:479-500.
- [30] Grammer TC, Cheatham L, Chou MM and Blenis J. The p70S6K signalling pathway: a novel signalling system involved in growth regulation. *Cancer Surv* 1996;27:271-92.
- [31] Ferrari S and Thomas G. S6 phosphorylation and the p70s6k/p85s6k. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 1994;29:385-413.
- [32] de Groot RP, Ballou LM and Sassone-Corsi P. Positive regulation of the cAMP-responsive activator CREM by the p70 S6 kinase: an alternative route to mitogen-induced gene expression. *Cell* 1994;79:81-91.

- [33] Shah SA, Potter MW, Ricciardi R, Perugini RA and Callery MP. FRAP-p70s6K signaling is required for pancreatic cancer cell proliferation. *J Surg Res* 2001;97:123-30.
- [34] Skeen JE, Bhaskar PT, Chen CC, Chen WS, Peng XD, Nogueira V, Hahn-Windgassen A, Kiyokawa H and Hay N. Akt deficiency impairs normal cell proliferation and suppresses oncogenesis in a p53-independent and mTORC1-dependent manner. *Cancer Cell* 2006;10:269-80.
- [35] Min YH, Eom JI, Cheong JW, Maeng HO, Kim JY, Jeung HK, Lee ST, Lee MH, Hahn JS and Ko YW. Constitutive phosphorylation of Akt/PKB protein in acute myeloid leukemia: its significance as a prognostic variable. *Leukemia* 2003;17:995-7.
- [36] Sujobert P, Bardet V, Cornillet-Lefebvre P, Hayflick JS, Prie N, Verdier F, Vanhaesebroeck B, Muller O, Pesce F, Ifrah N, Hunault-Berger M, Berthou C, Villemagne B, Jourdan E, Audhuy B, Solary E, Witz B, Harousseau JL, Himberlin C, Lamy T, Lioure B, Cahn JY, Dreyfus F, Mayeux P, Lacombe C and Bouscary D. Essential role for the p110delta isoform in phosphoinositide 3-kinase activation and cell proliferation in acute myeloid leukemia. *Blood* 2005;106:1063-6.
- [37] Billottet C, Grandage VL, Gale RE, Quattropani A, Rommel C, Vanhaesebroeck B and Khwaja A. A selective inhibitor of the p110delta isoform of PI 3-kinase inhibits AML cell proliferation and survival and increases the cytotoxic effects of VP16. *Oncogene* 2006;25:6648-59.
- [38] Chung CH, Pohlmann PR, Rothenberg ML, Burkey BB, Parker J, Palka K, Aulino J, Puzanov I and Murphy B. Insulin-like growth factor-1 receptor inhibitor, AMG-479, in cetuximab-refractory head and neck squamous cell carcinoma. *Head Neck*.
- [39] Tam C, Rink L, Merkel E, Flieder D, Pathak H, Koumbi D, Testa JR, Eisenberg B, von Mehren M and Godwin AK. Insulin-like growth factor 1 receptor is a potential therapeutic target for gastrointestinal stromal tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008;105:8387-92.
- [40] Molife LR, Fong PC, Paccagnella L, Reid AH, Shaw HM, Vidal L, Arkenau HT, Karavasilis V, Yap TA, Olmos D, Spicer J, Postel-Vinay S, Yin D, Lipton A, Demers L, Leitzel K, Gualberto A and de Bono JS. The insulin-like growth factor-I receptor inhibitor figitumumab (CP-751,871) in combination with docetaxel in patients with advanced solid tumours: results of a phase Ib dose-escalation, open-label study. *Br J Cancer* 103:332-9.

Figure legend

Figure 01. Lentivirus-mediated shRNA targeting IRS1 effectively silenced IRS1 in K562 cells. (A and B) Quantitative expression of *IRS1* mRNA in shIRS1 cells relative to the shControl cells. mRNA expression levels of *IRS1* were normalized by *HPRT* and β -*actin* endogenous control, as indicated. Results were analyzed using $2^{-\Delta\Delta CT}$. Experiments were performed in triplicate (C) Western blotting analysis of shControl and shIRS1 total cell extracts. The membrane was blotted with antibodies against IRS1 (185 kDa) or actin (42 kDa), as a control for equal sample loading, and developed with the ECL Western Blotting Analysis System. (D) Lysates from shControl and shIRS1 cells containing equal amounts of protein were immunoprecipitated (IP) with anti-IRS1 antibody and immunoblotted (IB) with anti-phospho-tyrosine (p-Tyr) antibody. (E) Western blotting of total cell extracts from K562 shControl and shIRS1 cells were blotted with antibodies against p-Tyr and were re probed with the antibody against actin. In figures C and D, the bar graphs represent the percentage of fold change in mean \pm SD of band intensity, of 3 independent experiments, relative to control. The controls were set as 100% in each experiment (Scion Imagine software). * $P < 0.05$, Student *t* test.

Figure 02. IRS1 silencing reduces proliferation in K562 cells. (A) Cell proliferation was determined by MTT assay after 48 hours of incubation of shIRS1 or shControl cells with or without imatinib mesylate (0.1; 0.5 or 1 μ M) and normalized by untreated shControl cells. Results are shown as mean \pm SD of six replicate and it is representative of 3 independent experiments. * $P = 0.0002$; Mann-Whitney test. (B) Equal amounts of proteins from K562 cells treated or not with imatinib mesylate (0.1; 0.5 or 1 μ M) for 48 hours were immunoprecipitated (IP) with anti-IRS1 antibody and immunoblotted (IB) with anti-phospho-tyrosine (p-Tyr) antibody.

Figure 3. IRS1 silencing reduces clonogenicity in K562 cells. Colonies containing viable cells were detected by MTT after 8 days of incubation of shIRS1 or shControl cells with or without imatinib mesylate (0.1; 0.5 or 1 μ M). Values are expressed in percentage, and normalized to the shControl value set as 100%. Results are shown as mean \pm SD of 3 independent experiments performed in duplicate. * $P = 0.0007$; ** $P = 0.0008$, Student *t* test.

Figure 04. Knockdown of IRS1 does not affect apoptosis in K562 cells. Apoptosis was detected by flow cytometry in shControl and shIRS1 cells with or without imatinib mesylate (0.1; 0.5 or 1 μ M) using Annexin-V/PI staining method. Figures indicate the relative number of cell (%) in the quadrants. The lower right quadrant contains the apoptotic (Annexin-V+/PI-) population. Results are representative of three independent experiments.

Figure 05. Knockdown of IRS1 does not change caspase-3 activity in K562 cells. Caspase-3 activity was measured by flow cytometry in shControl and shIRS1 cells treated or not with imatinib mesylate (0.1; 0.5 or 1 μ M) for 48 hours. Bar graphs represent the mean \pm SD of three independent experiments.

Figure 06. IRS1 silencing decreases phosphorylation of Akt, P70S6K and ERK in K562 cells. Western blotting analysis of shControl and shIRS1 cells for the expression of phospho-Akt (A), phospho-P70S6K (B) and phospho-ERK 1/2 (C); membranes were

reprobed with the antibody for detection of the respective total protein. Bars represent densitometric analysis of blots as mean \pm SD of three independent experiments versus shControl, set as 100%. * $P > 0.05$ Student t test.

Figure 07. Knockdown of IRS1 does not change BCL2 and BAX expression and BAD phosphorylation in K562 cells. Western blotting analysis of shControl and shIRS1 cells for BCL2 (A), BAX (B), and phospho-BAD (C) expression. Anti-actin (A and B) or anti-total BAD (C) was used as loading control as depicted. Bars represent densitometric analysis of blots as mean \pm SD of three independent experiments versus shControl, set as 100%. * $P > 0.05$ Student t test.

Figure 08. Knockdown of IRS1 does not affect BCR-ABL and CRKL phosphorylation in K562 cells. (A) Lysates from shControl and shIRS1 cells containing equal amounts of protein were immunoprecipitated (IP) with anti-ABL antibody and immunoblotted (IB) with anti-phospho-tyrosine (p-Tyr) antibody. (B) Total cell extracts were blotted with anti-phospho-CRKL and normalized to the total CRKL expression. Densitometric analysis of the phosphorylated protein relative to total protein was performed for each experiment. Bars represent densitometric quantification of blots as mean \pm SD of three independent experiments versus shControl, set as 100%.

Table 1. Effect of IRS1 silencing on the cell cycle phases of K562 cells

K562 cell	Cell cycle phase (%)		
	G ₀ /G ₁	S	G ₂ /M
shControl	39.11±7.0	39.11±11.9	21.78±5.7
shIRS1	45.85±5.2*	29.18±9.3*	24.98±4.2

Cell cycle phases detected by flow cytometry. Results are expressed as the percentage of total cells. Three independent experiments were performed and mean ± SD are presented, * $P < 0.05$.

Figure 1

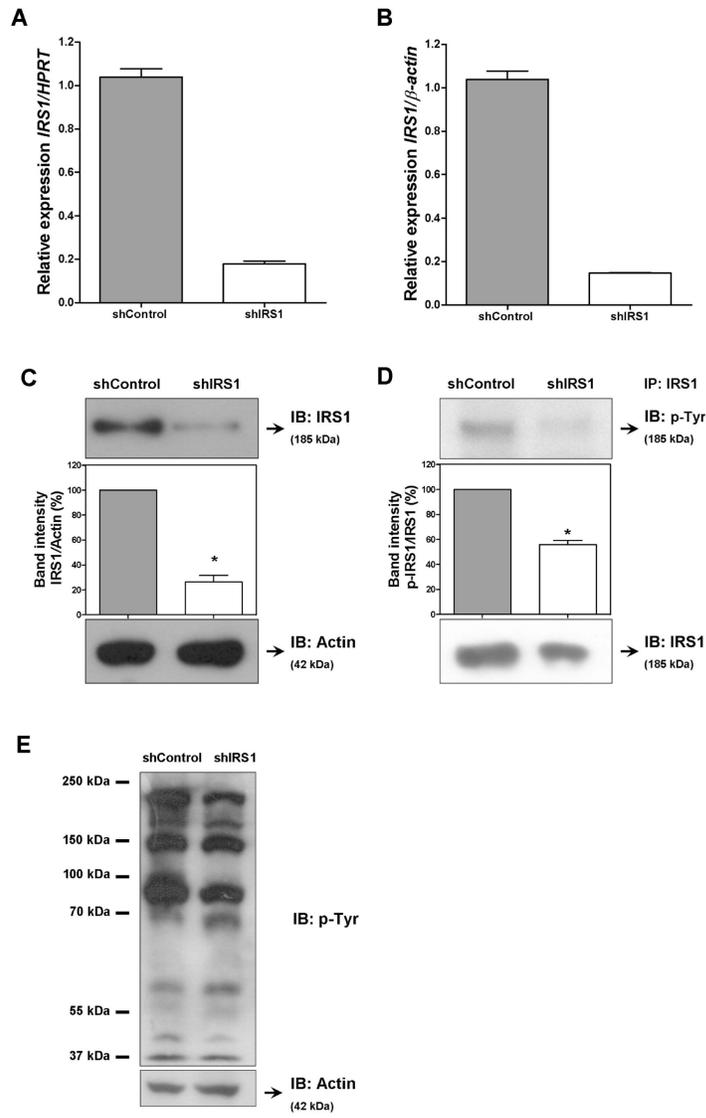


Figure 2

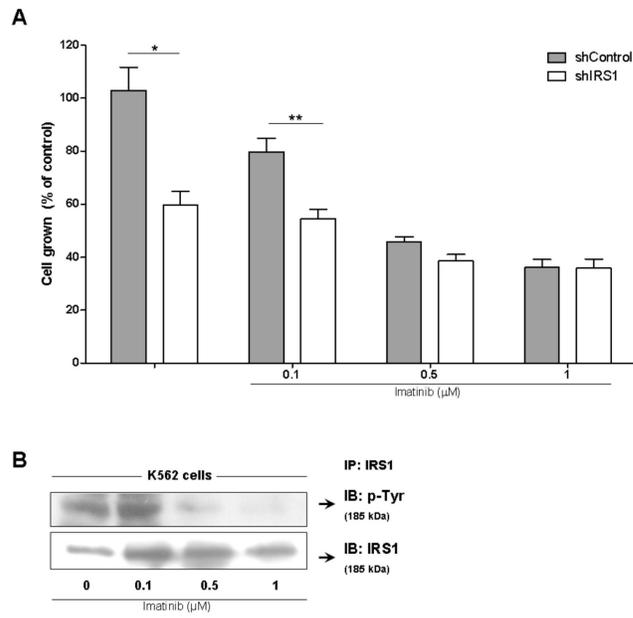


Figure 3

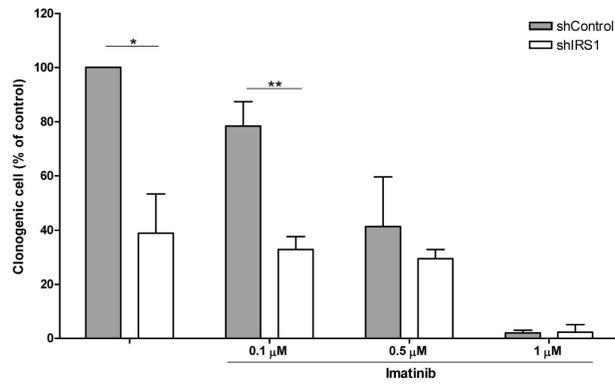


Figure 4

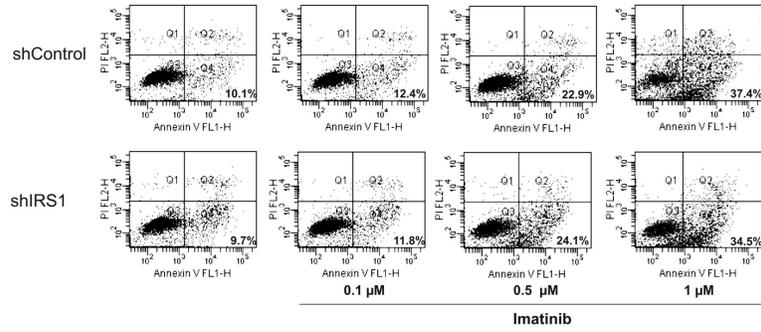


Figure 5

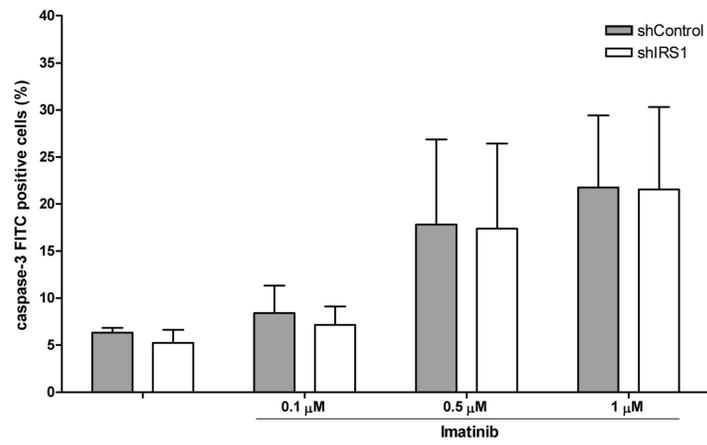


Figure 6

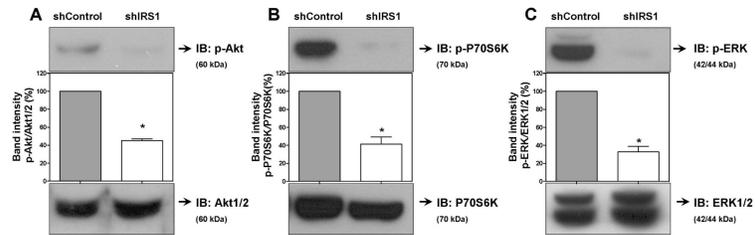


Figure 7

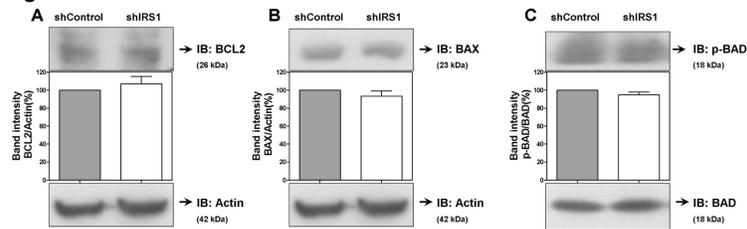
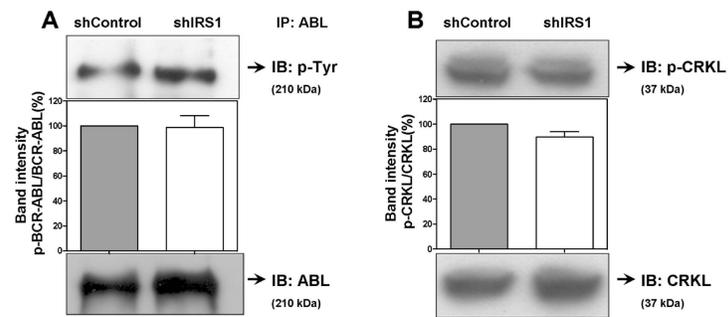


Figure 8



Apêndice II

Artigo Submetido para Publicação

IRS2 is downregulated in primary myelodysplastic cells and during their erythroid differentiation. João Agostinho Machado-Neto, Patricia Favaro, Mariana Lazarini, Adriana S S Duarte, Leticia Fröhlich Archangelo, Irene Lorand-Metze, Fernando Ferreira Costa, Sara Teresinha Olalla Saad, Fabíola Traina. Submetido para Leukemia Research.

Elsevier Editorial System(tm) for Leukemia Research
Manuscript Draft

Manuscript Number:

Title: IRS2 is downregulated in primary myelodysplastic cells and during their erythroid differentiation

Article Type: Brief Communication

Keywords: IRS2; EPO pathway; Myelodysplastic syndromes; erythroid differentiation

Corresponding Author: Dr Fabiola Traina,

Corresponding Author's Institution: University of Campinas

First Author: João A Machado-Neto

Order of Authors: João A Machado-Neto; Patricia Favaro, PhD; Mariana Lazarini, PhD; Adriana S Duarte, PhD; Leticia Fröhlich Archangelo, PhD; Irene Lorand-Metze, MD, PhD; Fernando F Costa, MD, PhD; Olalla Saad T Sara, MD, PhD; Fabiola Traina

Manuscript Region of Origin: BRAZIL

Abstract: Myelodysplastic syndromes (MDS) are clonal multipotent hematopoietic stem cell disorders characterized by impaired hematopoiesis. Insulin receptor substrate 2 (IRS2) is constitutively associated with the erythropoietin receptor, however rarely directly addressed in hematopoiesis. Herein, we show, for the first time, that IRS2 is expressed in MDS cells and that its expression is significantly lower in MDS cells when compared to normal cells and when comparing MDS high-risk versus low-risk according to FAB, WHO classifications and number of cytopenias. Moreover, CD34+ MDS-derived differentiated erythroid cells demonstrated a lower expression of IRS2, compared with normal cells. Thus, IRS2 may participate in the MDS pathophysiology.



Campinas, January 18th, 2011.

The Editor

Leukemia Research

Ref. "IRS2 is downregulated in primary myelodysplastic cells and during their erythroid differentiation".

Dear Dr. John M. Bennett,

We are submitting our manuscript entitled "IRS2 is downregulated in primary myelodysplastic cells and during their erythroid differentiation" for publication in Leukemia Research.

The purpose of the present study was to investigate Insulin receptor substrate 2 (IRS2) expression in myelodysplastic syndrome (MDS) patient cells, comparing low with high-risk group, and comparing with normal donor cells. Moreover, we evaluated the expression levels of *IRS2* transcripts during erythroid differentiation of bone marrow CD34⁺ cells from normal donors and MDS patients.

IRS2 is a ligand of Erythropoietin Receptor and of Insulin-like Growth Factor 1 Receptor, and its role in hematopoiesis has been rarely directly addressed. We showed for the first time that IRS2 is expressed in MDS cells and its expression is significantly lower in MDS cells when compared with normal cells and when comparing MDS high-risk versus low-risk according to FAB, WHO classifications and number of cytopenias. CD34⁺ MDS-derived differentiated erythroid cells demonstrated a lower expression of *IRS2*, compared with normal cells.

There are no conflicts of interest regarding the submission and publication of this manuscript. This manuscript has not been published before, nor is it being submitted elsewhere. All authors have read and have agreed to the submission of this article.

Sincerely Yours,

A handwritten signature in blue ink that reads "Fabiola Traina".

Fabiola Traina, M.D.; PhD
Hematology-Hemotherapy Centre; University of Campinas
Rua Carlos Chagas, 480,
Campinas, SP, Brazil
13083-970
Phone: 55-19-35218734; Fax: 55-19-3289-1089
E-mail: fabiolat@unicamp.br

Centro de Hematologia e Hemoterapia-Universidade Estadual de Campinas
Fone: 55 (19) 3521-8665 Fax: 55 (19) 3289-1089
Rua Carlos Chagas, 480
Campinas-São Paulo, Brasil
CEP: 13083-970

*Manuscript

IRS2 is downregulated in primary myelodysplastic cells and during their erythroid differentiation

João Agostinho Machado-Neto¹, Patricia Favaro^{1,2}, Mariana Lazarini¹, Adriana S S Duarte¹, Leticia Fröhlich Archangelo¹, Irene Lorand-Metze¹, Fernando Ferreira Costa¹, Sara Teresinha Olalla Saad¹, Fabíola Traina¹.

¹Hematology and Hemotherapy Center, National Institute of Blood, School of Medical Sciences, University of Campinas, Campinas, São Paulo, Brazil

²Department of Biological Sciences, Federal University of São Paulo, Diadema, São Paulo, Brazil

Corresponding Author:

Fabiola Traina MD, PhD

Hematology and Hemotherapy Center, University of Campinas

Rua Carlos Chagas, 480, CEP 13083-878

Campinas, SP, Brazil

Phone: 55-19-35218734; Fax: 55-19-3289-1089

E-mail: fabiolat@unicamp.br

Running Title: IRS2 expression in Myelodysplastic Syndromes

Word count: 1,091

Abstract

Myelodysplastic syndromes (MDS) are clonal multipotent hematopoietic stem cell disorders characterized by impaired hematopoiesis. Insulin receptor substrate 2 (IRS2) is constitutively associated with the erythropoietin receptor, however rarely directly addressed in hematopoiesis. Herein, we show, for the first time, that IRS2 is expressed in MDS cells and that its expression is significantly lower in MDS cells when compared to normal cells and when comparing MDS high-risk versus low-risk according to FAB, WHO classifications and number of cytopenias. Moreover, CD34⁺ MDS-derived differentiated erythroid cells demonstrated a lower expression of *IRS2*, compared with normal cells. Thus, IRS2 may participate in the MDS pathophysiology.

Keywords: IRS2, EPO pathway, Myelodysplastic syndromes, erythroid differentiation.

Introduction

The myelodysplastic syndromes (MDS) encompass a heterogeneous group of clonal hematopoietic stem cell disorders characterized by impaired hematopoiesis. The mechanisms of ineffective erythropoiesis may be produced by a defect of erythroid progenitor growth, abnormal erythroid differentiation and increased apoptosis of erythroid progenitors¹. Erythropoietin (EPO) is the growth factor required for normal erythroid cell proliferation, survival and differentiation². EPO binds to the EPO Receptor (EPOR), a member of the cytokine receptor superfamily with no intrinsic tyrosine kinase activity. Ligand binding is followed by EPOR dimerization and activation of the EPO-associated intracellular Janus kinase 2 (JAK2)². This results in tyrosine phosphorylation of the EPOR³ and recruits several Src homology-2 (SH2) domain-containing proteins, thereby leading to the activation of different intracellular signaling pathways, including the phosphorylation of insulin receptor substrate 2 (IRS2) adaptor proteins⁴. IRS2 also binds to Insulin-like Growth Factor 1 Receptor (IGF1R) and it is involved in cell differentiation and maturation^{4,5}.

EPO binding to MDS bone marrow mononuclear cells is normal and no structural abnormalities of the EPOR have been described¹. Therefore, a defect in EPO-induced signal transduction could account for impaired erythropoiesis. The aim of the present study was to characterize the mRNA and protein expression levels of IRS2 in cells of MDS patients and normal donors and to compare the *IRS2* expression levels between low-risk and high-risk MDS. Furthermore, we evaluated the expression levels of *IRS2* transcripts during erythroid differentiation of bone marrow CD34⁺ cells from normal donors and MDS patients.

Materials and Methods

Subjects

A total of thirty-two patients with a diagnosis of MDS (before any treatment) and 19 normal donors were included in the study. Samples were obtained and processed as detailed below. All patients that contributed to this study gave their informed written consent and the National Ethical Committee Board approved the study. Patients' characteristics are shown in Table 1.

Cells differentiation

For erythroid differentiation, CD34⁺ cells from bone marrow of normal donors (n=4) and low-risk MDS patients (n=4) were obtained according to the manufacturer's instructions (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany). CD34⁺ cells differentiation and immunophenotyping to investigate the erythroid cell maturation was performed as described⁶.

Quantitative real-time polymerase chain reaction (q-PCR)

After removal of erythrocytes by hemolysis, bone marrow samples were submitted to RNA extraction and q-PCR was performed in an ABI 7500 Sequence Detector System (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), according to the manufacturer's instructions (Applied Biosystems). *HPRT* was used as a housekeeping gene and the same sample cDNA of one normal donor was used as the calibrator sample in all analyses. The relative quantification value of *IRS2* gene expression was calculated using the equation, $2^{-\Delta\Delta CT}$. Primer sequences are available upon request.

Western Blot analysis

Bone marrow mononuclear cells from MDS patients (n=13) and peripheral blood CD34⁺ cells from normal donors (n=3) were submitted to Western blot analysis. Equal amounts of protein were used for SDS-PAGE and Western blot analysis with the indicated antibodies and ECL Western Blot Analysis System (Amersham Pharmacia Biotech, UK). Band intensities were determined using Scion Image software (ScionCorp, Frederick, MD, USA). *IRS2* band intensities were corrected for loading differences based on corresponding actin bands.

Statistical analysis

The comparisons between the groups were performed by the Mann–Whitney test and a *P*-value <0.05 was considered as statistically significant.

Results and Discussion

Quantitative-PCR analysis of total bone marrow cells showed that *IRS2* gene expression was significantly decreased in MDS cells compared with normal cells ($P=0.0002$) (Figure 1A). Western blot analysis of bone marrow mononuclear cells from MDS patients and peripheral blood CD34⁺ cells from normal donors corroborated these findings (Figure 1B and 1C). According to FAB, WHO classifications and number of cytopenias, *IRS2* expression was significantly lower in high-risk MDS, when compared with low-risk ($P<0.01$) (Figure 2A-C). Based on the IPSS classification and cytogenetic risk group, no statistically significant correlation was found (Figure 2D and E).

Next, we evaluated whether the expression levels of *IRS2* were modulated during erythroid differentiation of CD34⁺ cells from four normal donors and four patients with low-risk MDS. *IRS2* transcripts in MDS and normal erythroid progenitor cells were evaluated on days 6, 8 and 12 of culture and flow cytometry showed a similar pattern of erythroid differentiation for both groups (Figure 3A). On day 12 of normal CD34⁺ erythroid differentiation, an 8.25-fold increase in *IRS2* expression was observed, compared to day 6. Interestingly, MDS CD34⁺ cells showed a 3.89-fold increase in *IRS2* transcripts at the same time point, suggesting that MDS-derived differentiated erythroid cells failed to achieve the same increase levels of *IRS2*, when compared with normal cells (Figure 3B).

Although the role of *IRS2* in hematopoiesis has been rarely directly addressed, it has already been shown that *IRS2* is expressed in hematopoietic cells, is constitutively associated with EPOR⁴ and is upregulated and phosphorylated by erythropoietin in normal bone marrow erythroblasts and in UT-7 leukemic cells⁴. We report herein, for the first time, that *IRS2* is expressed in MDS cells. The significant decrease in *IRS2* in MDS samples when compared with normal donors, corroborates a previous microarray study that showed a down regulation of *IRS2* in mononuclear cells from MDS patients, when compared with cells from normal donors⁷.

Sathyanarayana et al⁸ reported that the increase of *IRS2* expression was important for the survival of erythroblasts during stimulation with EPO. Thus, the lower expression of *IRS2* on day 12 of erythroid differentiation cultures of MDS progenitor cells described herein, corroborates the hypothesis that *IRS2* has a role in maintaining effective erythropoiesis. Moreover, *IRS2* is a substrate of IGF1R and is upregulated in HL60 leukemic cells during granulocytic-differentiation in response to

IGF1⁵, without the presence of IRS1⁵. Taken together, these results suggest that signaling through IRS2 might have a role in erythroid and granulocytic differentiation. In addition, the lower expression of IRS2 in high-risk compared to low-risk disease may contribute to the impaired granulocytic differentiation that is the predominant finding in high-risk MDS.

Reference:

1. Fontenay-Roupie M, Bouscary D, Guesnu M, Picard F, Melle J, Lacombe C, et al. Ineffective erythropoiesis in myelodysplastic syndromes: correlation with Fas expression but not with lack of erythropoietin receptor signal transduction. *Br J Haematol.* 1999;106(2):464-73.
2. 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;74(2):227-36.
3. Dusanter-Fourt I, Casadevall N, Lacombe C, Muller O, Billat C, Fischer S, et al. Erythropoietin induces the tyrosine phosphorylation of its own receptor in human erythropoietin-responsive cells. *J Biol Chem.* 1992;267(15):10670-5.
4. 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;272(42):26173-8.
5. Schacher DH, VanHoy RW, Liu Q, Arkins S, Dantzer R, Freund GG, et al. Developmental expression of insulin receptor substrate-2 during dimethylsulfoxide-induced differentiation of human HL-60 cells. *J Immunol.* 2000;164(1):113-20.
6. Benites BD, Traina F, Duarte Ada S, Lorand-Metze IG, Costa FF, Saad ST. Increased expression of APAF-1 in low-risk myelodysplastic syndrome: a possible role in the pathophysiology of myelodysplasia. *Eur J Haematol.* 84(6):525-30.
7. Bar M, Stirewalt D, Pogosova-Agadjanian E, Wagner V, Gooley T, Abbasi N, et al. Gene Expression Patterns in Myelodysplasia Underline the Role of Apoptosis and Differentiation in Disease Initiation and Progression. *Transl Oncogenomics.* 2008;3:137-149.
8. Sathyanarayana P, Dev A, Fang J, Houde E, Bogacheva O, Bogachev O, et al. EPO receptor circuits for primary erythroblast survival. *Blood.* 2008;111(11):5390-9.

Figure 1

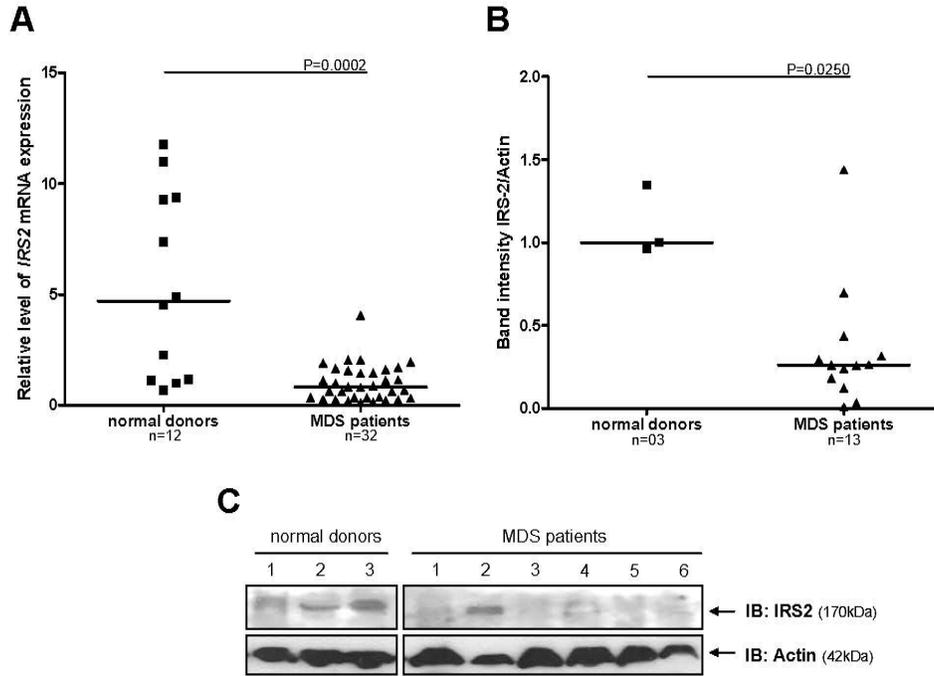


Figure 2

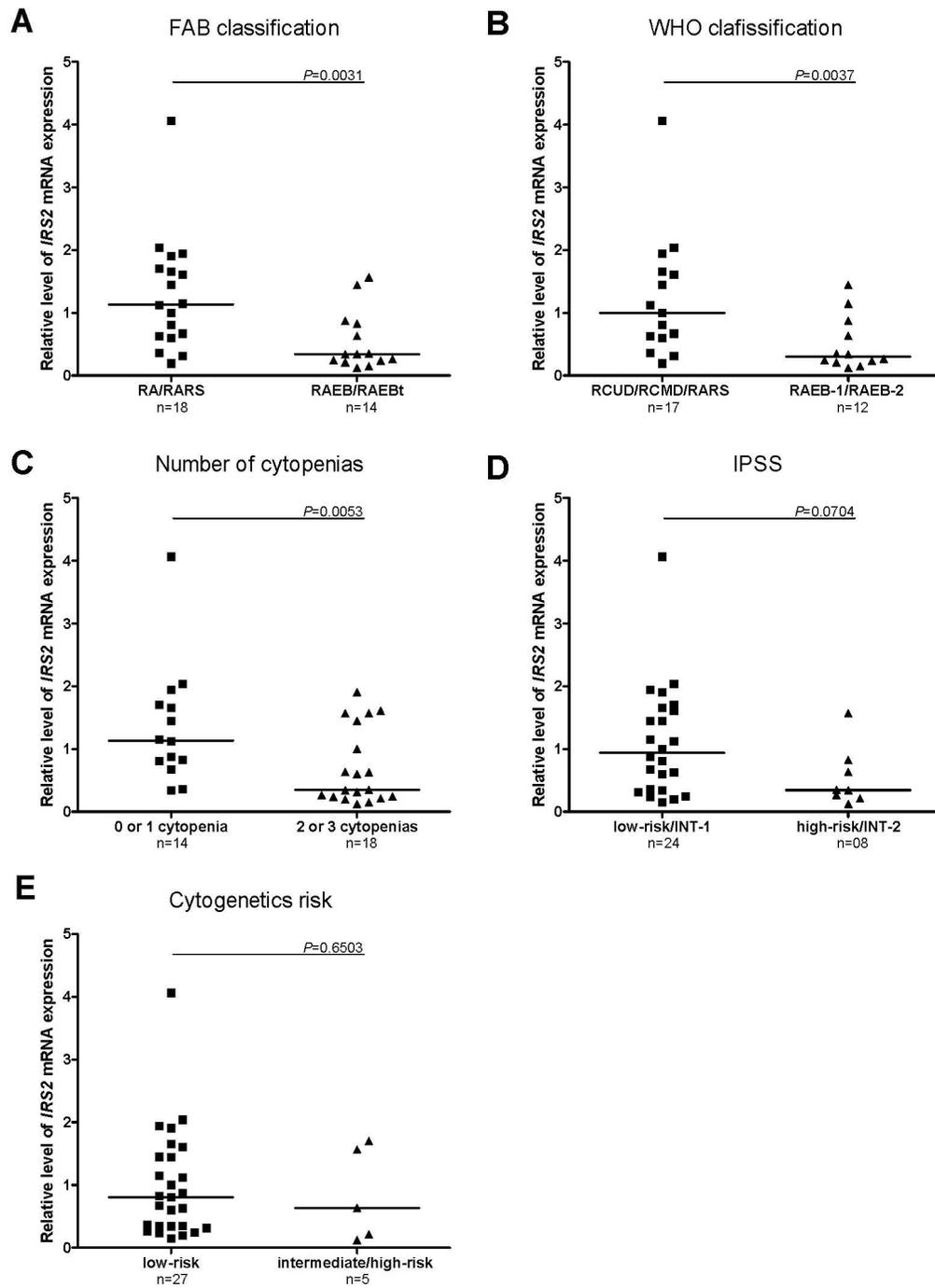


Figure 3

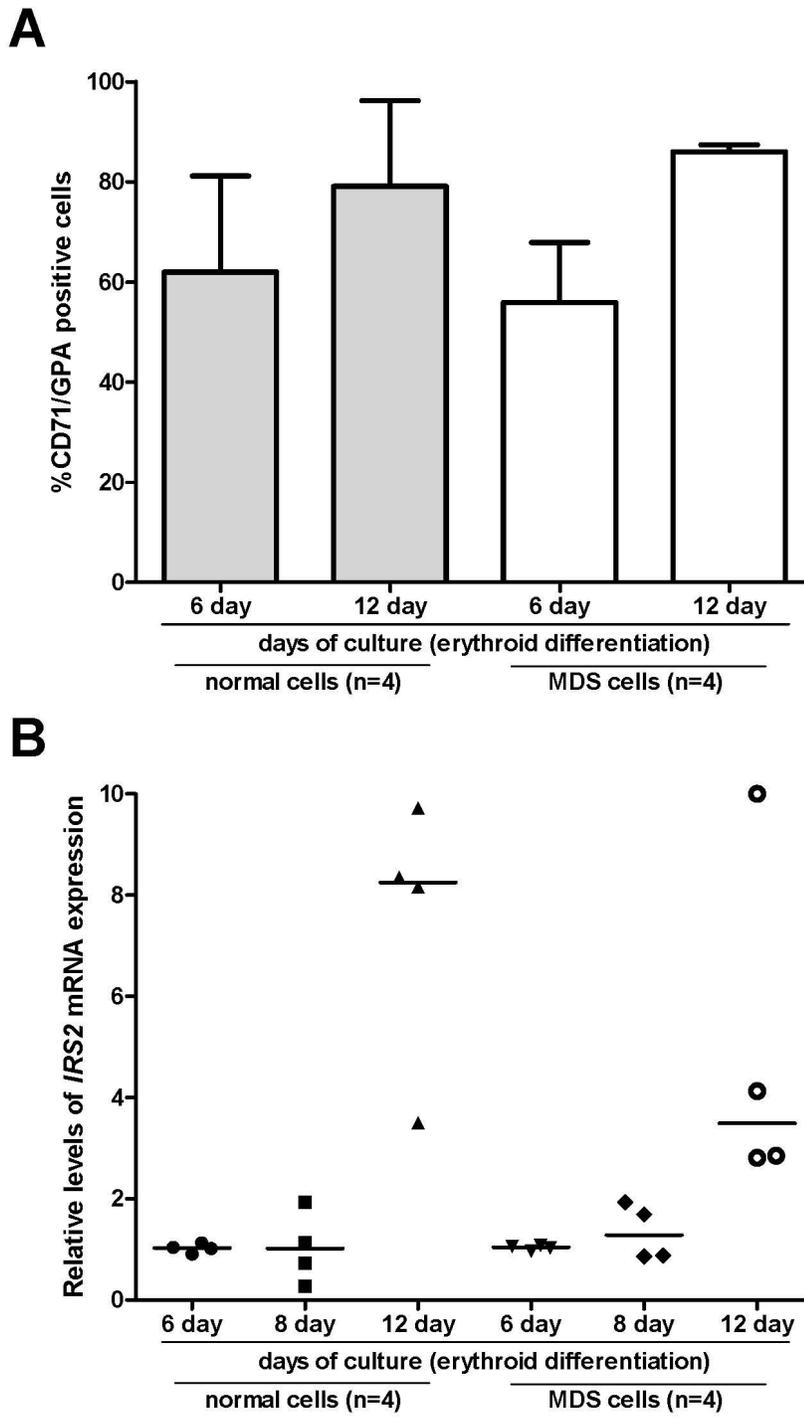


Figure Legend

Figure Legends:

Figure 1. IRS2 expression in cells from patients with myelodysplastic syndrome (MDS) and normal donors. (A) Q-PCR of *IRS2* expression in total bone marrow cells of MDS patients and normal donors. (B) Relative *IRS2* protein expression in mononuclear bone marrow cells of MDS patients and in CD34⁺ hematopoietic progenitors from peripheral blood of normal donors. Values represent the band intensity of *IRS2* protein expression corrected for loading differences based on corresponding actin bands. Bars represent median values. (C) Representative Western blot for *IRS2* protein expression. Total cell extracts were immunoblotted (IB) with anti-*IRS2* and anti-actin antibodies.

Figure 2. Q-PCR analysis of *IRS2* expression in the different subgroups of MDS patients according to French-American-British (FAB) (A) and World Health Organization (WHO) (B) classifications; number of cytopenias (C); International Prognostic Score System (IPSS) (D); and cytogenetic risk groups (E). Bars represent median values.

Figure 3. Erythroid differentiation of CD34⁺ bone marrow cells (A) Surface expression of transferrin receptor (CD71) and glycophorin A (GPA) on cells from normal donors and MDS patients on days 6 and 12 of erythroid differentiation. Bars represent mean percentages \pm SD of double positive cells for CD71/GPA. (B) Q-PCR analysis of *IRS2* expression in CD34⁺ cells from normal donor and MDS patients on days 6, 8 and 12 of erythroid differentiation. Horizontal lines indicate median values.

Table

Table 01. Patient characteristics

	Number
MDS patients	32
Gender	
Male/ Female	17/15
Age (years), median (range)	73.3 (17-90)
FAB	
RA/RARS	14/4
RAEB/RAEBt	9/5
WHO	
RCUD/ RCMD/RARS	2/11/4
RAEB-1/RAEB-2	8/4
AML with myelodysplasia-related changes*	3
Number of Cytopenia	
0 or 1 cytopenia	14
2 or 3 cytopenias	18
IPSS	
Low-risk/ INT-1	8/16
INT-2/ High Risk	6/2
Cytogenetics	
Normal	26
Monosomy 7	1
Trisomy 8	1
-Y	1
Complex	3

Table Legend

Table legends:

Table 01

FAB: French-American-British; RA, Refractory Anemia; RARS, Refractory Anemia with Ringed Sideroblasts; RAEB, Refractory Anemia with Excess of Blasts; RAEBt, Refractory Anemia with Excess of Blasts in transformation; WHO, World Health Organization; RCUD, Refractory Cytopenia with Unilineage Dysplasia; RCMD, Refractory Cytopenia with Multilineage Dysplasia; RAEB-1, Refractory Anemia with Excess Blast-1; RAEB-2, Refractory Anemia with Excess Blast-2; AML, Acute myeloid leukemia. IPSS, International Prognostic Score System; INT-1: Intermediate-1; INT-2: Intermediate-2;

* Excluded from the WHO classification analysis.

Acknowledgements

Authors' contribution

J.A.M.N. contributed to the selection of patients, carried out all experiments and participated in the writing of the manuscript; P.F. contributed to the experiments, the analysis of the results and in the writing of the manuscript; M.L. provided technical assistance for the experiments and participated in the writing of the manuscript; A.S.S.D. carried out the erythroid differentiation cultures; L.F.A. contributed to the western blot experiments; I.L.M. was responsible for the morphological diagnosis of myelodysplastic syndromes of the patients included in this study; F.F.C. contributed to the analysis of the results; S.T.O.S. contributed to the analysis of the results and writing of the manuscript; F.T. was the mentor of the study and participated in all the activities involved.

Acknowledgments

The authors would like to thank Dr Nicola Coran and Raquel S Foglio for the english review.

Funding

This work received financial support from Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP). The Hematology and Hemotherapy Center - UNICAMP form part of the National Institute of Blood, Brazil (INCT de Sangue – CNPq/MCT).

Conflict of interest statement

All authors have no conflict of interest to report.