

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA CAMPUS GOVERNADOR  
VALADARES**

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO MULTICÊNTRICO EM BIOQUÍMICA E  
BIOLOGIA MOLECULAR**

**Ana Carolina Menezes Mendonça Valente**

**Avaliação do papel da via FAK/SRC na proliferação e apoptose em linhagem  
celular *JAK2V617F* positiva**

**Governador Valadares  
2022**

**Ana Carolina Menezes Mendonça Valente**

**Avaliação do papel da via FAK/SRC na proliferação e apoptose em linhagem celular *JAK2V617F* positiva**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Bioquímica e Biologia molecular, da Universidade Federal de Juiz de Fora campus Governador Valadares como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Bioquímica e Biologia molecular.

Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dra<sup>a</sup> Raquel Tognon Ribeiro

Co-orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dra<sup>a</sup> Michelle Bueno de Moura Pereira Antunes

**Governador Valadares**

**2022**

## FICHA CATALOGRÁFICA

Ficha catalográfica elaborada através do programa de geração automática da Biblioteca Universitária da UFJF, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Valente, Ana Carolina Menezes Mendonça.

Avaliação do papel da via FAK/SRC na proliferação e apoptose em linhagem celular JAK2V617F positiva / Ana Carolina Menezes Mendonça Valente. -- 2022.

117 p. : il.

Orientadora: Raquel Tognon Ribeiro

Coorientadora: Michelle Bueno de Moura Pereira Antunes

Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de Juiz de Fora, Campus Avançado de Governador Valadares, Instituto de Ciências da Vida - ICV. Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Biologia Molecular, 2022.

1. FAK. 2. Neoplasias Mieloproliferativas Crônicas. 3. Janus Quinase 2. 4. Apoptose. I. Ribeiro, Raquel Tognon, orient. II. Antunes, Michelle Bueno de Moura Pereira, coorient. III. Título.

**Ana Carolina Menezes Mendonça Valente**

**Avaliação do papel da via FAK/SRC na proliferação e apoptose de linhagem celular JAK2V617F positiva**

Dissertação apresentada ao Programa Multicêntrico de Pós-graduação em Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal de Juiz de Fora campus Governador Valadares como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Bioquímica e Biologia Molecular. Área de concentração: Bioquímica e Biologia Molecular.

Aprovada em 23 de setembro de 2022.

BANCA EXAMINADORA

**Dra. Raquel Tognon Ribeiro** - Orientadora  
Universidade Federal de Alfenas

**Dra. Michelle Bueno de Moura Pereira Antunes** - Coorientadora  
Universidade Federal de Juiz de Fora - campus Governador Valadares

**Dra. Mariana Tomazini Pinto**  
Hospital de Câncer de Barretos

**Dra. Sandra Bertelli Ribeiro de Castro**  
Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri

Juiz de Fora, 23/09/2022.



Documento assinado eletronicamente por **Raquel Tognon Ribeiro, Usuário Externo**, em 23/09/2022, às 13:57, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Mariana Tomazini Pinto, Usuário Externo**, em 23/09/2022, às 14:16, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Michelle Bueno de Moura Pereira Antunes, Professor(a)**, em 23/09/2022, às 15:00, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Sandra Bertelli Ribeiro de Castro, Usuário Externo**, em 23/09/2022, às 15:27, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no Portal do SEI-Ufjf ([www2.ufjf.br/SEI](http://www2.ufjf.br/SEI)) através do ícone Conferência de Documentos, informando o código verificador **0962252** e o código CRC **7E86E4F1**.

## AGRADECIMENTOS

À **Deus** por todas oportunidades colocadas em meu caminho, por me guiar, fortalecer e dar discernimento em todos os momentos até aqui.

Aos meus amados Pais, **Udson e Fátima**, por todo incentivo e crença em mim, por me apoiarem a sempre ir atrás dos meus objetivos.

Aos meus irmãos, **Rafaela e Fábio**, pelo encorajamento a sempre continuar buscando conhecimento e ir além.

Ao meu sobrinho, **Leonardo**, por todo amor e cuidado comigo, a me lembrar diariamente que a vida tem que ser levada levemente, e que assim como uma criança, acreditar que nossos sonhos podem se tornar realidade.

A todos meus familiares pelo incentivo, companheirismo e por estarem sempre presentes.

Aos meus amigos, pelo companheirismo e tornarem a caminhada mais descontraída.

À minha orientadora **Prof. Dra. Raquel Tognon Ribeiro**, por aceitar me orientar por essa caminhada, por instigar sempre a buscar conhecimento, por acreditar em mim, por me capacitar, pela paciência e assim como ela mesma diz: “não existe ex-orientador”, pois bem, gratidão à minha eterna orientadora.

À Prof<sup>a</sup>. Dra. **Michelle Bueno de Moura Pereira Antunes** pela co-orientação e por toda contribuição ao presente trabalho.

À coordenadora do Laboratório Multiusuário de Imunologia da UFJF-GV **Prof<sup>a</sup>. Dra. Sandra Bertelli Ribeiro de Castro**, ao **Dr. Leonardo Meneghin Mendonça** e à **Prof<sup>a</sup> Cibele Velloso Rodrigues** e a TAE **Thaís Netto S. Valente** do Laboratório de Biologia Celular e Genética Molecular da UFJF-GV pela colaboração.

À **Dra. Tathiane Maistro Malta Pereira** e ao mestrando **Renan Lima Simões** da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto - USP (FCFRP-USP), pela contribuição ao meu trabalho, por compartilhar ensinamentos em uma área completamente nova para mim, por toda paciência e disponibilidade a mim cedidos.

À **Prof<sup>a</sup>. Fabíola Attié de Castro** da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto - USP (FCFRP-USP), por ter cedido gentilmente a linhagem SET-2.

Ao aluno de iniciação científica **Gustavo**, pelo auxílio e contribuição para com essa pesquisa.

Aos professores do programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Bioquímica e Biologia Molecular pelos ensinamentos transmitidos.

Ao secretário do Programa de Pós-graduação, **Oyama**, pela dedicação, gentileza e sempre estar disposto a nos ajudar.

À FAPEMIG, pela bolsa de mestrado e pelo suporte financeiro ao projeto de pesquisa “Avaliação do papel do complexo FAK/SRC no apoptose de linhagens celulares de neoplasias mieloproliferativas crônicas” (Demanda Universal APQ 02185/16) ao qual este projeto de mestrado é vinculado.

Ao CT\_INFRA 2013/FINEP, que possibilitou a aquisição de grande parte dos equipamentos utilizados para o desenvolvimento desse trabalho.

À Universidade Federal de Juiz de Fora pela oportunidade e suporte financeiro fornecido ao trabalho.

## RESUMO

As Neoplasias Mieloproliferativas Crônicas (NMPC) configuram-se como um grupo de doenças clonais da célula-tronco hematopoética que resultam em acúmulo das células mieloide. Dentre elas incluem-se a Policitemia vera (PV), a Trombocitemia essencial (TE) e a Mielofibrose Primária (MF). A identificação da mutação adquirida *JAK2V617F* em pacientes com PV, TE e MF permitiu o melhor entendimento da patogênese dessas doenças, visto que a ativação constitutiva da tirosina quinase JAK2 tem papel importante no aumento da proliferação celular e resistência à apoptose. No entanto, ainda não existe um tratamento farmacológico que leve todos os pacientes à remissão molecular, justificando o estudo de novos alvos moleculares. Por sua vez, a proteína Quinase de Adesão Focal (FAK), possui importante influência nos processos de proliferação, migração, sobrevivência celular e apoptose e, por estar superexpressa em diversas neoplasias, configura-se um alvo promissor no desenvolvimento de fármacos contra o câncer. O presente estudo propõe avaliar o papel da proteína FAK na proliferação e apoptose da linhagem celular SET-2, positiva para a mutação *JAK2V617F*. Assim, foram analisados: (1) interação entre FAK e SRC por imunoprecipitação; (2) o efeito do inibidor da FAK (PF 562,271) na viabilidade e proliferação celular por MTT; (3) efeito do inibidor da FAK na indução da apoptose avaliando-se a expressão de PARP clivado e Caspase 3 Clivada por Western Blotting; (4) efeito do inibidor da JAK (ruxolitinibe) na expressão de p-SRC e SRC. Além disso, um banco de dados de RNAseq da linhagem SET-2 tratada com INC424 (ruxolitinibe) por 4h e 48h (GSE 69827), disponível no banco de dados público "Gene Expression Omnibus" foi analisado. A expressão gênica diferencial e a correlação entre a expressão do gene *PTK2* e outros 65 genes envolvidos em proliferação, sobrevivência, apoptose e adesão foi feita utilizando-se o software R studio. Os resultados indicam que o inibidor da FAK PF 562,271 reduziu significativamente a viabilidade celular e a proliferação das células SET-2 a partir da concentração de 5  $\mu$ M, sendo 71,5%, 85,5%, 83,7% e 86,3% a redução da viabilidade para os tratamentos com 5  $\mu$ M, 10  $\mu$ M, 25  $\mu$ M e 50  $\mu$ M, respectivamente. O inibidor também induziu apoptose, pois houve aumento na expressão de PARP clivada e Caspase 3 clivada após tratamento. As análises do banco de dados de RNAseq demonstraram que o inibidor da JAK modulou a expressão do gene *PTK2* e de outros genes envolvidos nos processos de proliferação, apoptose e adesão celular. Com relação



aos genes relacionados com adesão celular, os genes *PTK2*, *SRC*, *PXN*, *TLN1*, *DCC*, *ITPKC* e *FLNA* apresentaram aumento da expressão e *CRK*, *PTRH2*, *VCL*, *CASS4*, *ACTB*, *ZYX*, *VASP*, *CTNNB1* e *BCAR1* apresentaram expressão diminuída. Com isso, os resultados do presente trabalho apontam que a inibição da FAK sensibiliza a linhagem celular SET-2 a sofrer apoptose, reduzindo assim a viabilidade e o tratamento com o inibidor da JAK INC424 influencia na expressão do gene *PTK2* e de outros genes relacionados com a via de adesão focal.

**Palavras chaves:** FAK. Neoplasias Mieloproliferativas Crônicas. *Janus Quinase 2*. Apoptose.

## ABSTRACT

Chronic Myeloproliferative Neoplasms (NMPC), which includes Polycythemia vera (PV), Essential Thrombocythemia (ET) and Primary Myelofibrosis (PMF), are clonal disorders characterized by excess of proliferation and apoptosis resistance, leading to accumulation of myeloid cells. The identification of the acquired *JAK2V617F* mutation in patients with PV, ET and PMF allowed a better understanding about this disease pathogenesis, as the constitutive activation of JAK2 tyrosine kinase plays an important role in increasing cell proliferation and resistance to apoptosis. However, there is still no pharmacological treatment that leads all patients to molecular remission, justifying the study of new molecular targets. In turn, the Focal Adhesion Kinase (FAK) protein has an important influence on the processes of proliferation, migration and cell survival and, as it is overexpressed in several neoplasms, it becomes a promising target in the development of drugs cancer. The present study proposes to evaluate the role of FAK in the proliferation and apoptosis of SET-2 cells, a *JAK2V617F* positive cell line. With this purpose, the following were analyzed: (1) interaction between FAK and SRC by immunoprecipitation; (2) the effect of the FAK inhibitor (PF 562,271) on the viability and cell proliferation by MTT; (3) the effect of the FAK inhibitor on apoptosis induction by evaluating the expression of cleaved PARP and cleaved Caspase 3 by Western Blotting, (4) the effect of JAK inhibitor (ruxolitinib) on the expression of p-SRC and SRC. In addition, a RNAseq dataset from SET-2 cells treated with INC424 (ruxolitinib) for 4h and 48h (GSE 69827), available in "Gene Expression Omnibus" was analyzed. The differential gene expression and correlation of *PTK2* gene and other 65 genes related to proliferation, survival, apoptosis and adhesion were performed using the software R studio. The results indicate that the inhibitor of FAK PF 562,271 significantly reduced in 71.5%, 85.5%, 83.7% and 86.3% the cell viability at 5uM, 10uM, 25uM and 50uM, respectively. The inhibitor also induced apoptosis, since there was an increase in the expression of cleaved PARP and cleaved Caspase 3 after treatment with the inhibitor. The analysis of the RNAseq database showed that the JAK inhibitor modulated the expression of *PTK2* gene and other genes involved in proliferation, apoptosis and cell adhesion processes. Regarding the genes related to cell adhesion, the genes *PTK2*, *SRC*, *PXN*, *TLN1*, *DCC*, *ITPKC* and *FLNA* showed increased expression and *CRK*, *PTRH2*, *VCL*, *CASS4*, *ACTB*, *ZYX*, *VASP*, *CTNNB1* and *BCAR1* showed decreased expression. In

conclusion, the results indicate that FAK inhibition sensibilizes SET-2 to apoptosis, reducing cell viability and JAK inhibition with INC424 seems to have influence in *PTK2* gene expression and other genes related to focal adhesion pathway.

**Keywords:** FAK. Chronic Myeloproliferative Neoplasms. Janus Kinase 2. Apoptosis.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>Figura 1</b> - Representação esquemática das alterações moleculares que ocorrem na Célula Tronco Hematopoética (CTH) e principais achados clínicos, morfológicos e moleculares na Policitemia Vera (PV), Trombocitemia Essencial (TE) e Mielofibrose (MF). .....	29
<b>Figura 2</b> - Esquema das vias extrínseca e intrínseca da apoptose, com representação das moléculas envolvidas no processo. ....	33
<b>Figura 3</b> - Esquema representativo da estrutura linear da FAK, demonstrando os 3 domínios (FERM, QUINASE E FAT), os resíduos de tirosina e regiões ricas em prolina. ....	36
<b>Figura 4</b> - Fluxograma do delineamento experimental. (A) Esquema representativo dos experimentos <i>in vitro</i> com a linhagem celular SET-2. (B) Esquema representativo dos experimentos <i>in silico</i> com banco de dados de expressão gênica da linhagem SET-2.....	41
<b>Quadro 1</b> - Especificações dos anticorpos utilizados.....	46
<b>Figura 5</b> - Ordenação produzida por Análise de Componentes Principais (PCA) para os grupos de amostras do banco GSE69827. ....	48
<b>Figura 6</b> - Imunoprecipitação da FAK e imunoblotting da FAK e da SRC (resultado de um único experimento).....	51
<b>Figura 7</b> - Gráfico de dose-resposta usado para cálculo do valor de IC50. (Resultado de três experimentos independentes). ....	52
<b>Figura 8</b> - Efeito do inibidor PF-271 na proliferação celular da linhagem SET2. Porcentagem da proliferação celular para cada tratamento em relação ao controle (resultado de três experimentos independentes).....	53
<b>Figura 9</b> - Efeito do inibidor PF-271 na viabilidade da linhagem SET-2. (Resultado de três experimentos independentes). ....	54
<b>Figura 10</b> - Comparação da cultura celular SET-2 após tratamento com PF-271 e doxorrubicina. ....	55
<b>Figura 11</b> - Efeito do inibidor PF-271 na apoptose da linhagem SET-2. Análise da expressão de PARP clivada, Caspase3 clivada, p-SRC e SRC após tratamento com PF-271 5 µM e 10 µM, ruxolitinibe 300 nM e doxorrubicina 10 µM. A actina foi utilizada como controle endógeno.....	55

<b>Figura 12- <i>HeatMap</i></b> demonstrado a análise da expressão gênica diferencial global dos 40 mais significativos/diferencialmente expressos, comparando o grupo controle DMSO e os tratamentos com INC 4h e INC 48h. ....	61
<b>Figura 13 - <i>HeatMap</i></b> demonstrado a análise da expressão gênica diferencial dos genes selecionados comparando o grupo controle DMSO com o tratamento INC 4h e tratamento INC 48h.....	63
<b>Figura 14 - Genes regulados positivamente e negativamente dos 66 genes selecionados, entre os grupos controle DMSO, tratamento INC 4h e tratamento INC 48h. (A) Comparação entre INC 4h e INC48h. (B) Comparação entre controle DMSO e INC48h. (C) Comparação entre controle DMSO e INC4h.....</b>	<b>65</b>
<b>Figura 15 - Análise de expressão diferencial dos genes relacionados com adesão/migração nos grupos controle DMSO, tratamento ruxolitinibe (INC424) 4 horas e 48 horas. ....</b>	<b>67</b>
<b>Figura 16 - Análise de expressão diferencial dos genes relacionados com proliferação/sobrevivência nos grupos controle DMSO, tratamento ruxolitinibe (INC424) 4 horas e 48 horas. ....</b>	<b>68</b>
<b>Figura 17 - Análise de expressão diferencial dos genes relacionados com ciclo celular nos grupos controle DMSO, tratamento ruxolitinibe (INC424) 4 horas e 48 horas....</b>	<b>69</b>
<b>Figura 18 - Análise de expressão diferencial dos genes relacionados com a apoptose nos grupos controle DMSO, tratamento ruxolitinibe (INC424) 4 horas e 48 horas....</b>	<b>70</b>
<b>Figura 19 - Correlação entre a expressão do gene <i>PTK2</i> e os genes <i>ACTB</i>, <i>BCAR1</i>, <i>BCL2</i>, <i>BID</i>, <i>BMF</i>, <i>CASS4</i>, <i>CDKN1B</i>, <i>CRK</i>, <i>JAK2</i>, <i>MCL1</i>, <i>MDM2</i>, <i>PIK3P1</i>, <i>PTEN</i>, <i>PTRH2</i>, <i>PXN</i>, <i>SOS1</i>, <i>STAT1</i>, <i>STAT5</i>, <i>VASP</i>, <i>VAV1</i> e <i>ZYX</i>. ....</b>	<b>72</b>

## TABELAS

<b>Tabela 1</b> - Lista dos 10 genes que apresentaram maior valor de LogFC quando comparada a expressão gênica entre o grupo controle e INC 4h. ....	59
<b>Tabela 2</b> - Lista dos 10 genes que apresentaram maior valor de LogFC quando comparada a expressão gênica entre o grupo controle e INC 48h. ....	59
<b>Tabela 3</b> - Lista dos 10 genes que apresentaram maior valor de LogFC quando comparada a expressão gênica entre o grupo INC4h e INC 48h. ....	60
<b>Tabela 4</b> - Genes com correlação significativa e suas respectivas relações com o <i>PTK2</i> . ....	77

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AKT	Proteína quinase específica de serina / treonina
APAF-1	Fator de Ativação 1 da Protease Apoptótica
APO3L/ APO2L	Ligante do fator de necrose tumoral
ASXL	Regulador de transcrição ASXL 1
ATP	Adenosina trifosfato
BAD	Antagonista BCL-2 da morte celular
BAK	Antagonista/assassino homólogo BCL-2
BAX	Proteína X associada a BCL-2
BCL-W	Membro da família BCL-2 anti-apoptótico
BCL-X	Gene relacionado com BCL-2
BCL-XL	Linfoma de células B - extra grande
BCL-2	Leucemia / linfoma de células B 2
BCL-10	Adaptador de sinalização imune
BCR-ABL	Gene de fusão BCR (Ativador de RhoGEF e GTPase) e ABL (proto-oncogênese).
BID	Agonista de domínio de interação com BH3
BIK	Assassino que interage com BCL-2
BLK	Proto-oncogene da família de tirosina quinase SRC
BIM	Mediador que interage com BCL-2
BMF	Fator de modificação BCL2
CALR	Calreticulina

CASS4	Membro da família de proteínas de arcabouço
CASP3/8/9	Caspases 3/8/9
CBL	Proto-oncogene
CCNA1	Ciclina A1
CDC42	Ciclo de Divisão Celular 42
CDKN1A	Inibidor de quinase dependente de ciclina 1A
CDKN1B	Inibidor de quinase dependente de ciclina 1B
c-FLIP	Proteína inibidora semelhante a caspase 8
Co-IP	Co-immunoprecipitação
CRK	Proteína adaptadora, proto-oncogene
CSF3R	Receptor de fator 3 estimulador de colônia
CTH	Célula Tronco Hematopoética
DAPI	Marcadores de DNA
DCC	Receptor netrina 1
DEG	Expressão gênica diferencial
DIABLO	Inibidor direto da proteína de apoptose (IAP) - proteína de ligação com baixo PI
DISC	Complexo de sinalização indutor de morte
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DOXO	Doxorrubicina
DR3/4/5	Receptor de morte 3/4/5
ECL	Quimioluminescente aprimorada



EDIL3	Repetições semelhantes a EGF e domínios de discoidina 3
EFS	Substrato associado a Fyn embrionário
EPO	Eritropoetina
EPOR	Receptor de eritropoetina
ERK	Quinases reguladas por sinal extracelular
EZH2	Potenciador da subunidade do complexo repressivo 2 polycomb zeste 2
FADD	Proteínas adaptadoras FAS associada ao domínio de morte
FAK	Quinase de Adesão Focal
FAS/FASR	Receptor de morte de superfície celular
FASL	Ligante do FAS
FERM	Domínio Ezrin Radixin Moesin de quatro ponto um
GCSFR	Fator estimulante de colônias de granulócitos
GRB2/GRB7	Proteína 2/7 ligada ao receptor do fator de crescimento
HIF-1 $\alpha$	Subunidade alfa do fator 1 induzível por hipóxia
HtrA2	HtrA serina peptidase 2
IAP	Inibidores de proteínas de apoptose
IC50	Metade da concentração inibitória máxima
IDH2	Isocitrato desidrogenase
IGF-I	Nível de fator de crescimento semelhante à insulina
IL-6	Interleucina 6
IL12RB2	Subunidade beta 2 do receptor de interleucina 12
INCA	Instituto nacional de câncer

INC424	Ruxolitinibe, inibidor da JAK
IP	Imunoprecipitação
JAK	Tirosina quinases da família Janus quinase
JAK2	Janus Kinase 2
JAK2V617F	Janus Kinase 2 mutada no aminoácido 617, troca de Valina por Fenilalanina
JH	Homologia com JAK
kDa	Quilodalton
KEGG	Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes
KRAS	Gene homólogo do oncogene viral do sarcoma de rato Kirsten Proto-oncogene, GTPase
LMA	Leucemia Mieloide Aguda
LMC	Leucemia Mieloide Crônica
LNC	Leucemia Neutrófilica Crônica
logFC	Log de " <i>Fold Change</i> "
MAPK	Proteína quinase ativadora de mitogênio
MCL1	Regulador de apoptose, membro da família BCL2
MDM2	Codificador de ubiquitina, proto-oncogene
MF	Mielofibrose Primária
MO	Medula óssea
MPL	Receptor de trombopoetina
mRNA	Ácido ribonucleico mensageiro
MTOR	Alvo mamífero da rapamicina

MTT	Brometo de 3- (4,5-dimetiltiazol-2-il) -2,5-difeniltetrazólio
NAD+	Coenzima Dinucleótido de nicotinamida
NF-κB	Proteína B do fator nuclear kappa
NGS	Sequenciamento de próxima geração
NMPC	Neoplasias Mieloproliferativas Crônicas
NOXA	Membro pró-apoptótico apenas BH3 de BCL-2
OMS	Organização Mundial da Saúde
PARP	Polimerase poli (ADP-ribose)
PARPc	Polimerase poli (ADP-ribose) clivada
PCA	Análise de Componentes Principais
Pb	Pares de base
PBS	Solução tampão de fosfato
PDGFRB	Factor de crescimento derivado de plaquetas
PF-562,271	Inibidor da FAK (PF-271)
Ph-	Cromossomo Philadelphia negativa
PI3K	Fosfoinositol - 3 quinase
PTEN	Homólogo de fosfatase e tensina
PTK2	Gene que codifica proteína tirosina quinase 2
PTRH2	Peptidil-tRNA hidrolase 2
PUMA	Modulador de apoptose regulado por p53
PV	Policitemia vera
PVDF	Difluoreto de polivinilideno
PXN	Paxilina

RAP1B	Membro da família de oncogene RAS
RAS	Família de domínio de associação Ras
RE	Retículo endoplasmático
RIP	Proteína de interação com receptor
RNAseq	Sequenciamento de RNA
RPTOR	Proteína associada regulatória do complexo 1 MTOR
RUNX1	Fator de Transcrição da Família RUNX 1
SDS-PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida contendo dodecil sulfato de sódio
SF3B1	Fator de splicing 3b subunidade 1
SH	Homologia com SRC
SH2B3	Proteína adaptadora SH2B 3
Smac	Segundo ativador derivado da mitocôndria de caspases
SRC	Tirosina quinase não receptora
SRSF2	Fator de splicing 2 rico em serina e arginina
STAT	Transdutores de sinal e ativadores de transcrição
TE	Trombocitemia essencial
TET2	Tet metilcitosina dioxigenase 2
TLN1	Talina 1
TNF	Fator de necrose tumoral
TNF-A	Fator de necrose tumoral alfa
TNFR1	Receptor do fator de necrose tumoral
TPO	Trombopoetina
TP53	proteína tumoral p53

TRADD	TNFRSF1A associado ao domínio de morte
U2AF1	Fator auxiliar 1 de RNA nuclear pequeno U2
VCL	Vinculina
VEGF	Fator de crescimento endotelial vascular
WB	Western Blotting

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO .....	20
2. REFERENCIAL TEÓRICO .....	22
2.1 Neoplasias Mieloproliferativas .....	22
2.2 Mutações JAK2V617F, CALR e MPL .....	24
2.3 Apoptose.....	30
2.4 Ciclo celular .....	35
2.5 Quinase de adesão focal (FAK) .....	36
3 OBJETIVOS.....	40
3.1 Objetivo geral .....	40
3.2 Objetivos específicos.....	40
4 METODOLOGIA .....	40
4.1 Cultura Celular: .....	42
4.2 Ensaio de inibição da FAK.....	43
4.3 Ensaio de viabilidade e proliferação .....	43
4.4 Extração e quantificação de proteínas .....	44
4.5 Imunoprecipitação: .....	45
4.6 Western Blotting.....	46
4.7 Seleção e análise de banco de dados de expressão gênica (RNAseq) .....	47
5 RESULTADOS.....	51
5.1 Interação proteínas FAK e SRC.....	51
5.2 Ensaio de determinação do IC50 do inibidor da FAK (PF271) .....	52
5.3 Avaliação do efeito inibidor da FAK PF-271 na proliferação celular de linhagem celular SET-2.....	52
5.4 Avaliação do efeito inibidor da FAK PF-271 na viabilidade da linhagem celular SET-2 .....	53
5.5 Efeito do inibidor da FAK PF-271 na apoptose da linhagem celular SET-2.....	55
5.6 Análise <i>in silico</i> de banco de expressão gênica da linhagem SET-2.....	57
5.6.1 ANÁLISE DE EXPRESSÃO GÊNICA DIFERENCIAL GLOBAL .....	57
5.6.2 ANÁLISE DE EXPRESSÃO GÊNICA DIFERENCIAL DOS GENES SELECIONADOS .....	62
5.6.3 ANÁLISE DE CORRELAÇÃO .....	71
6 DISCUSSÃO .....	78
7 CONCLUSÃO: .....	95
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	95

## 1. INTRODUÇÃO

As células normais crescem, multiplicam-se e morrem de maneira ordenada, processo este finamente regulado e dependente de fatores estimulantes e inibidores de crescimento. O desequilíbrio e disfunção desses fatores podem ocasionar o surgimento de neoplasias, na qual apresentam um tecido anormal, onde as células têm crescimento não controlado, autônomo, resistente à morte que tende a perda de função (INCA, 2011; MARTINCORENA; CAMPBELL, 2015; IRANZO; MARTINCORENA; KOONIN, 2018).

O estabelecimento das neoplasias se dá em três etapas: iniciação, promoção e progressão (BASLAN; HICKS, 2017; HAUSMAN, 2019; ROY; SAIKIA, 2016). Dentre os diversos tipos de câncer, segundo a estimativa do Instituto Nacional de Câncer (INCA) 2020, no Brasil, os cânceres de próstata; cólon e reto; traqueia, brônquio e pulmão; estômago; cavidade oral; esôfago; bexiga; laringe; leucemias (neoplasias hematológicas) e sistema nervoso central são os mais incidentes em homens, nessa ordem. Em mulheres são os cânceres de mama; cólon e reto; colo do útero; traqueia, brônquio e pulmão; glândula tireoide; estômago; ovário; corpo do útero e Linfoma não-Hodgkin, com exceção do câncer de pele não melanoma. As Neoplasias Hematológicas diferem dos tumores sólidos, pois elas configuram doenças que envolvem comprometimento da medula óssea e do sangue periférico. (RUSS et al., 2018; TORRES; SOARES, 2015).

A desregulação da apoptose é um dos mecanismos envolvidos na fisiopatologia das Neoplasias Mieloproliferativas Crônicas (NMPC), um subgrupo das Neoplasias Hematológicas Mieloides (ARBER et al., 2016). O desequilíbrio entre proteínas pró-apoptóticas e anti-apoptóticas, a falha na sinalização do receptor de morte, a disfunção das caspases e da proteína supressora de tumor p53 são mecanismos envolvidos na desregulação da apoptose nas neoplasias. A resistência à morte está relacionada com o desenvolvimento e progressão da neoplasia e também à resistência ao tratamento (PISTRITTO et al., 2016; XU; LAI; HUA, 2019).

As proteínas quinase de adesão focal (FAK) e proto-oncogene proteína tirosina quinase (SRC) possuem influência nas vias relacionadas à proliferação e morte celular, além de estarem envolvidas em outros processos como adesão e migração. A FAK interage com moléculas reguladoras da apoptose e da proliferação, como por

exemplo, como a proteína p53, com a RIP (proteína de interação com receptor), PI3K e AKT (KURENOVA et al., 2004).

A expressão aumentada da proteína FAK foi descrita em diversos tipos de cânceres, como nas leucemias, contribuindo com a progressão da doença (CARTER et al., 2017; CHATTERJEE et al., 2014; CHURCHMAN et al., 2016; GUSTAFSSON et al., 2014).

A compreensão da fisiopatologia e os avanços terapêuticos nos últimos anos possibilitaram o controle dos sintomas com melhora moderada na sobrevida geral em pacientes com NMPC, entretanto, o medicamento, ruxolitinibe, disponível para tratamento de pacientes com mielofibrose de risco intermediário 2 e alto, apresenta um elevado valor de compra. Além disso, ainda não existem tratamentos medicamentosos capazes de levar a remissão molecular completa ou cura, sendo o transplante de medula óssea a única alternativa curativa (GREENFIELD G. et al., 2018; BRASIL, 2020). Assim, os estudos de vias de sinalização envolvidas nos processos de proliferação e apoptose possibilitam a melhor compreensão da fisiopatologia das doenças e a identificação de novos alvos terapêuticos.



## 2. REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1 Neoplasias Mieloproliferativas

As Neoplasias Mieloproliferativas Crônicas (NMPC) configuram um grupo de doenças clonais da célula-tronco hematopoética, na qual ocorre a proliferação aumentada das células da linhagem mieloide ocasionando leucocitose, aumento da massa eritrocitária e/ou trombocitose (PORTO-SOARES et al., 2020).

As linhagens afetadas nesses distúrbios são as eritróides, megacariocíticas e granulocíticas (ARBER et al., 2016). De acordo com a classificação das Neoplasias Mielóides publicadas em 2022 pela Organização Mundial da Saúde (OMS), as NMPC estão divididas em dois grupos: as BCR::ABL1 positivas, que inclui a Leucemia Mielóide Crônica (LMC) e as NMPC BCR::ABL1 negativas, as quais incluem a Policitemia vera (PV), a Trombocitemia essencial (TE) e a Mielofibrose primária (MF), classificadas também como cromossomo Philadelphia negativas (Ph-). Ademais, também fazem parte do grupo de NMPC a Leucemia Neutrófila Crônica (LNC) e a Leucemia Eosinófila Crônica (ARBER et al., 2016; KHOURY et al., 2022). A LNC é caracterizada por leucocitose e hiperplasia da medula óssea consistindo predominantemente de células granulocíticas (neutrofilia) e a presença da mutação CSF3R e ausência do cromossomo Philadelphia. A “Leucemia Eosinófila Crônica - não especificada de outra forma” é caracterizada pelo aumento de eosinófilos no sangue periférico, ausência do cromossomo Philadelphia e apresenta um aumento de blastos na medula óssea ou no sangue (mas menos de 20% para excluir leucemia aguda como diagnóstico), e a presença de uma anormalidade citogenética clonal. Há, também, as NMPC inclassificáveis que incluem neoplasias semelhantes, porém, não podem ser claramente classificadas como os outros subgrupos. A Mastocitose fazia parte desse grupo na classificação de 2008, no entanto em 2016 deixou de ser considerada devido às suas características clínicas e patológicas únicas (ARBER et al., 2016; BARBUI et al., 2018; KHOURY et al., 2022).

A PV é caracterizada pelo aumento da massa eritrocitária, leucócitos e plaquetas, com hiperplasia das células hematopoiéticas de modo independente da ação da eritropoetina (EPO) (VAINCHENKER; KRALOVICS, 2017). Apesar da expectativa de sobrevida em torno de 15 anos, os eventos tromboembólicos

apresentam grande impacto na qualidade de vida do paciente. Além disso, a doença pode evoluir para Leucemia Mieloide Aguda (transformação em leucêmica) e para Mielofibrose Pós-PV (secundária) (LEVINE; GILLILAND, 2008; MACEDO et al., 2015). Sua fisiopatologia é caracterizada por uma mutação adquirida na tirosina quinase JAK2 (*JAK2V617F*), presente em 95% dos pacientes, que resulta no aumento da proliferação e da diferenciação celular mieloide, acompanhado pela diminuição da apoptose. Os 5% restantes apresentam mutação no éxon 12 do gene *JAK2* que conduz a uma eritrocitose predominante (GREENFIELD et al., 2018; VAINCHENKER; KRALOVICS, 2017).

A TE é caracterizada pelo elevado número de plaquetas e aparecimento de alterações qualitativas (morfológicas) na linhagem megacariocítica. O curso clínico da TE caracteriza-se por complicações vasculares que se relacionam à morbimortalidade na TE, estando associadas ao maior risco de trombose venosa profunda e embolia pulmonar (TEFFERI; BARBUI, 2017). O quadro clínico é variável, sendo um terço dos pacientes assintomáticos e os demais apresentam achados clínicos e laboratoriais como o aumento persistente de plaquetas no sangue periférico, quadros hemorrágicos, esplenomegalia, sintomas como síncope, dor torácica atípica e distúrbios visuais (BARBUI et al., 2018; TEFFERI et al., 2018). A evolução de TE para PV, MF ou LMA ocorre em cerca de 2,7%, 4% e 1,4% dos casos, respectivamente (LEITE et al., 2001; RUMI; CAZZOLA, 2017).

A MF é caracterizada por hiperplasia de megacariócitos e granulócitos que liberam fatores de crescimento fibrogênico, resultando em fibrose difusa da medula óssea. É caracterizada também pela produção de glóbulos vermelhos com anisopoiquilocitose, esplenomegalia, eritropoese ineficaz, leucoeritroblastos na extensão sanguínea, hematopoese extramedular e sintomas secundários à anemia como fraqueza, cansaço, palpitação e dispneia (BARBUI et al., 2018; TEFFERI; PARDANANI, 2015). Acredita-se que as células clonais e a resposta imune produzem exacerbadamente citocinas que cooperam para alterações da medula óssea, hematopoese extramedular e sintomas constitucionais (TEFFERI, 2018). A leucoeritroblastose é uma característica da MF primária, mas na MF pré-fibrótica esses leucoeritroblastos podem não ser tão evidentes. Com o desenvolver da doença aumentam os blastos no sangue periférico e na medula óssea, sendo que uma porcentagem acima de 20% de blastos indica transformação para Leucemia Mieloide

Aguda (LMA). Assim, a avaliação de blastos no sangue periférico auxilia no prognóstico de pacientes com MF, uma vez que a presença de blastos 10% a 19% define uma fase acelerada da doença (MASAROVA et al., 2020). Das NMPC BCR-ABL negativas a MF é a que apresenta maior taxa de transformação leucêmica e fibrose medular, sendo a causa de morte em aproximadamente 20% dos pacientes (MASAROVA et al., 2020; SCHERBER; MESA, 2018).

A longo prazo, as NMPC caracterizam-se pela manifestação de esplenomegalia, fibrose medular e/ou transformação em leucemia aguda (TEFFERI, 2018; YOGARAJAH; TEFFERI, 2017;).

A PV, TE e MF são desordens mais frequentes em adultos entre 50-70 anos com sobrevida mediana estimada de 10 a 15, 15 a 20 e 2 a 5 anos, respectivamente (MOULARD et al., 2013; RUMI; CAZZOLA, 2017). A nível global, a MF, PV e TE apresentam taxas de incidência de 0,3-1,5; 1,5-2,0 e 1,03–2,5 por 100.000 / ano, respectivamente (HARRISON et al., 2017). Na Europa, um estudo estimou a incidência de PV sendo de 0,68 a 2,6 de 100.000 habitantes, 0,38 a 1,7 para TE e 0,1 a 1,00 para MF e a prevalência estimada foi de 4,96 a 30,00 para PV, 4,00 e 24,00 para TE e 0,51 a 2,7 para MF por 100.000 habitantes (MOULARD et al., 2013). Além da existência de uma grande variação nas estimativas de prevalência e incidência, até o momento não há dados referentes à América do Sul na literatura. Um estudo realizado na Coreia avaliando o período de 2004 a 2013, mostrou um aumento da prevalência das NMPC ao longo dos anos (BYUN et al., 2017). A respeito da etnia, brancos apresentaram a maior incidência geral das NMPC, sendo a PV a mais incidente nesse grupo étnico. Os Leste asiáticos apresentaram menor incidência, sendo mais frequente o acometimento por TE (BYUN et al., 2017). Hispânicos e negros apresentaram maior incidência para PV e TE, respectivamente (BYUN et al., 2017). Vale ressaltar que em vários países as NMPC são subnotificadas ou classificadas de maneira incorreta, pois a classificação dessas patologias depende de critérios clínicos e laboratoriais que sofreram alterações com a evolução das descobertas a respeito dessas doenças (TITMARSH et al., 2014).

## **2.2 Mutações *JAK2V617F*, *CALR* e *MPL***

Diferentes mutações somáticas adquiridas são responsáveis pela expansão clonal da célula-tronco hematopoiética nas NMPC, e resultam em uma grande variabilidade no fenótipo clínico dos pacientes (VAINCHENKER; KRALOVICS, 2017).

Mutações no gene da tirosina quinase *JAK2*, no gene do receptor de trombopoetina (*MPL*) e no gene da calreticulina (*CALR*) são denominadas “*driver mutations*”, isto é, são mutações essenciais para o aparecimento do fenótipo de NMPC e, quando presentes são diretamente responsáveis pela ativação constitutiva de cascatas de sinalização intracelulares que induzem proliferação, invasão e resistência à apoptose. Existem outras mutações, chamadas de mutações adicionais ou cooperantes, que podem contribuir para a progressão da doença e transformação leucêmica (TEFFERI, 2018).

Todas as mutações “*driver*” ativam constitutivamente a via de sinalização JAK/STAT que é responsável pelo desenvolvimento do fenótipo NMPC. A identificação das mutações “*driver*” e cooperantes, bem como suas correlações entre si e com as alterações morfológicas das linhagens celulares hematopoéticas, auxiliam no esclarecimento sobre as relações genoma e o fenótipo, bem como no tratamento específico para pacientes, podendo ter como alvo esses genes mutados.

A mutação *JAK2V617F* no éxon 14 pode ser encontrada em cerca de 70% das NMPC, está presente em cerca de 95% dos pacientes com PV e 50% a 60% nos pacientes com TE e MF. Aproximadamente 3% a 5% dos casos de PV, são *JAK2V617F* negativo, neles ocorrem mutações no éxon 12 de *JAK2*. A mutação no éxon 9 do gene da *CALR* pode ocorrer em 25% na TE e 36% na MF, e a mutação no gene do *MPL* ocorre em 4% na TE e 6% na MF. Essas patologias podem ser triplo negativas, ou seja, não ter nenhuma dessas mutações (GRABEK et al., 2020; PORTO-SOARES et al., 2020; VAINCHENKER; KRALOVICS, 2017).

A *JAK2V617F* é uma mutação somática recorrente com grande relevância, sua identificação permitiu o melhor entendimento da patogênese dessas doenças. O gene *Janus Kinase 2*, está localizado no braço curto do cromossomo 9 e codifica a proteína *JAK2* (BAXTER et al., 2005). A mutação no gene *JAK2* consiste na troca do nucleotídeo guanina (G) por uma timina (T) na posição 1849 do éxon 14, acarretando uma mutação pontual, em que ocorre a substituição do aminoácido valina por fenilalanina no domínio pseudoquinase JH2 da sequência polipeptídica da *JAK2*, localizada no códon 617 (GRABEK et al., 2020).

A proteína JAK2 é uma tirosina quinase envolvida na sinalização celular, possuindo papel fundamental na transdução de sinal a partir de diversos receptores hematopoéticos (SANTOS; VERSTOVSEK, 2012). A estrutura da proteína possui sete domínios homólogos e uma região carboxi terminal e amino terminal. Apresenta um domínio quinase JH1 (homologia Jak) e um domínio pseudoquinase JH2, sendo que este último não apresenta atividade catalítica, mas regula negativamente a atividade do domínio JH1. A mutação *JAK2V617F* no domínio JH2 da JAK2 acarreta na perda da função desse domínio, tornando a proteína constitutivamente ativa. Há também um domínio semelhante a SH2 (Homologia com Src 2) composto por regiões JH3-JH4 e o domínio FERM (JH5-JH7 que tem homologia com a banda 4.1, domínio ezrina / radixina / moesina) (GRABEK et al., 2020). Essa tirosina quinase participa na sinalização das citocinas mielóides como receptor de EPO (EPOR), receptor de trombopoetina e receptor de fator estimulante de colônias de granulócitos (GCSFR), entre outros que atuam no desenvolvimento das células da linhagem mieloide e estão associados aos fenótipos de NMPC (BAXTER et al., 2005). Em decorrência da mutação *JAK2V617F*, a proteína torna-se constitutivamente ativada, aumentando a sinalização da via JAK/STAT e de outras vias de sinalização como PI3K/AKT/mTOR, RAS, MAPK/ERK. Desta forma, as células se proliferam de modo independente de citocinas e se tornam resistentes à morte. (GRABEK et al., 2020). Como consequência, ocorre a superprodução de uma ou mais linhagens de células mielóides na medula óssea (MO), ocasionando o acúmulo de células maduras no sangue periférico e associando-se clinicamente a um risco de complicações trombóticas, hemorrágicas e evolução à transformação fibrótica ou leucêmica (BAXTER et al., 2005). O aumento da carga alélica da mutação *JAK2V617F* em PV e TE, foi correlacionada com a progressão para MF em estudos realizados em modelo animal, além disso, a mutação está associada a maiores chances de os pacientes apresentarem eventos trombóticos (GRABEK et al., 2020). Dessa forma, a carga do alelo mutante *JAK2V617F* pode ajudar a determinar o fenótipo da doença.

Apesar da maioria dos pacientes com PV apresentar a mutação V671F no éxon 14 da *JAK2*, em alguns casos a mutação ocorre no éxon 12 da *JAK2*, localizado entre o domínio SH2 (homologia Src2) e o domínio pseudoquinase, afetando os resíduos de aminoácidos entre K537 e E543. Essa mutação também resulta em altos níveis de fosforilação da via JAK2/STAT, conferindo proliferação celular

independente de citocinas (GRABEK et al., 2020; VAINCHENKER; KRALOVICS, 2017).

A mutação *JAK2V617F* é a mais comumente encontrada nos pacientes com NMPC. Entretanto, eles podem apresentar outras mutações, por exemplo no gene *MPL*, localizado no braço curto do cromossomo 1 (1p34.2), que possui 12 éxons e 2 domínios de receptor de citocina, domínio transmembrana e um domínio citoplasmático (GRABEK et al., 2020). Ele codifica uma proteína que é homóloga a outros membros da superfamília de receptores hematopoiéticos, o receptor de trombopoetina (GRABEK et al., 2020). Seu ligante, a TPO, atua como regulador da megacariocitopoese e da formação de plaquetas, dimerizando o receptor de TPO e fosforilando o resíduo de tirosina da JAK, STAT e MAPK. Há diversas mutações de *MPL*, mas as principais foram identificadas no éxon 10 que levam a mutação de troca do aminoácido triptofano por leucina W515L ou lisina W515K. Essas mutações acarretam a ativação constitutiva do receptor de TPO e fosforilação da via de sinalização JAK/STAT, AKT e ERK com isso, o crescimento se torna independente da presença de citocinas (LEE; GODFREY; NANGALIA, 2020). Essas alterações conduzem à proliferação exacerbada de megacariócitos na medula óssea com consequente trombocitose no sangue periférico. As plaquetas produzidas são anormais e não são capazes de diminuir essa ativação através de uma retroalimentação negativa. Por essa razão, a mutação no gene *MPL* pode conduzir a um fenótipo de TE e MF (LANNUTTI et al., 2009; TIEDT, et al., 2009)

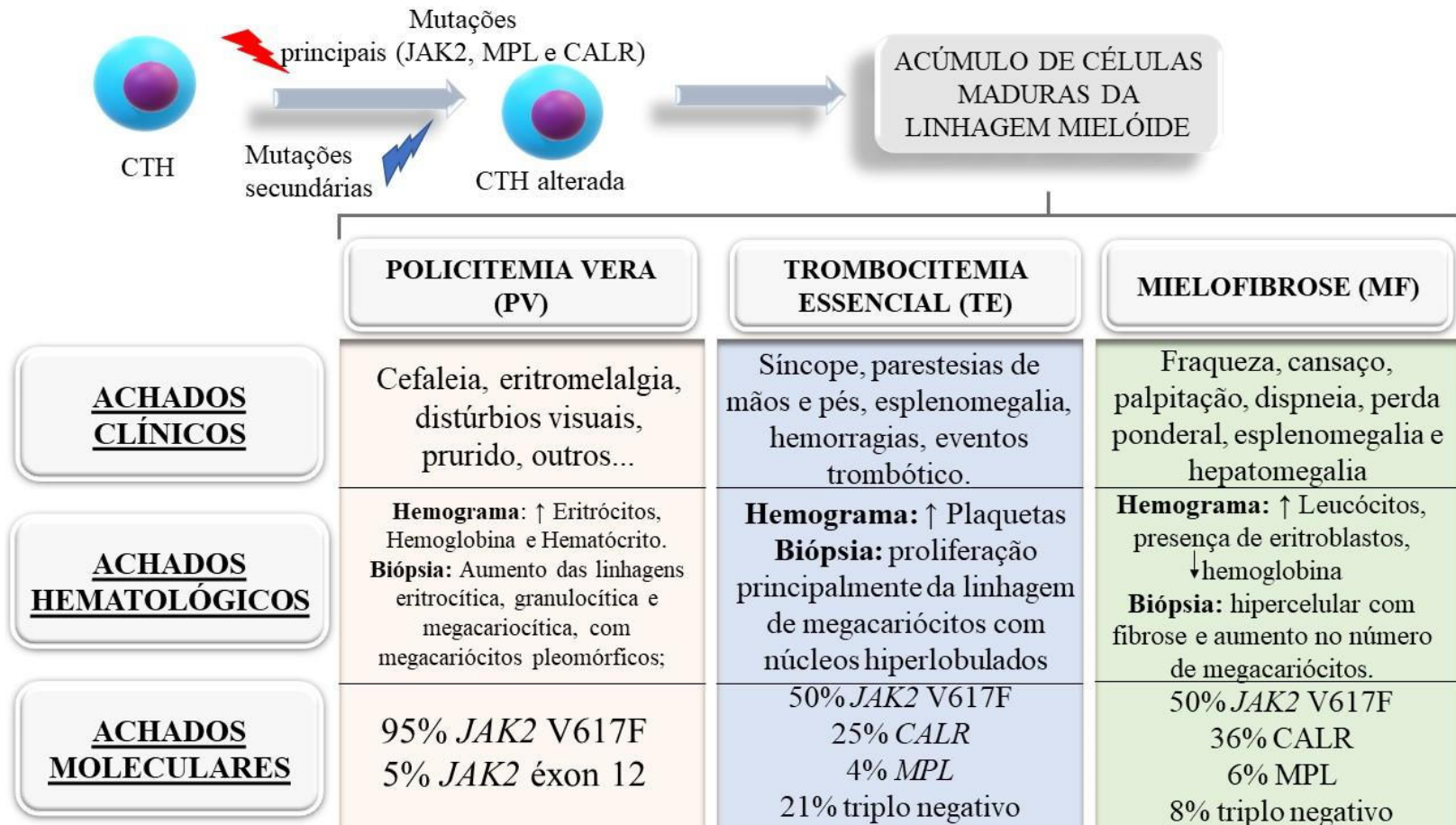
O gene *CALR*, localizado no cromossomo 19, no *locus* p13.13, codifica uma proteína que participa da regulação do cálcio intracelular (GRABEK et al., 2020). É uma proteína de ligação e armazenamento de cálcio no lúmen do retículo endoplasmático (RE) que desempenha funções no processamento e transporte de proteínas e a calreticulina atua garantindo o dobramento adequado dessas proteínas, além disso, acredita-se que ela possua atividade relacionada a proliferação, migração, adesão e apoptose celular, através da regulação do cálcio (LEE; GODFREY; NANGALIA, 2020). Mutações somáticas de inserção e/ou deleção de pares de bases (pb) no éxon 9 do gene *CALR* são divididas em dois tipos: a *CALRdel52* (deleção de 52pb) ou tipo 1 e *CALRins5* (inserção de 5pb) ou tipo 2. Elas culminam na produção da proteína calreticulina alterada, com modificação na carga dos aminoácidos localizado na região C-terminal, que é responsável pela interação

de *CALR* com o *MPL*. Com isso, ocorre a ativação defeituosa do *MPL* induzindo um fenótipo proliferativo das NMPC (GRABEK et al., 2020). O fenótipo pode variar dependendo do tipo de mutação. As do tipo 1 são vistas mais comumente na MF e as mutações do tipo 2 mais comumente na TE. Vale ressaltar que a *CALR* não está associada a um fenótipo de PV (CHACHOUA et al., 2016; HOW; HOBBS; MULLALLY, 2019; MASUBUCHI et al., 2019). Rumi e colaboradores (2014) relataram que a presença da mutação *CALR* apresenta um risco de trombose menor quando comparado com a mutação *JAK2V617F* para os pacientes com MF, por essa razão aparenta oferecer proteção (RUMI et al., 2014).

Ademais, outras mutações genéticas adquiridas em diversos genes como *TET2*, *CBL*, *AXSL1*, *SH2B3*, *SF3B1*, *U2AF1*, *TP53*, *IDH2* e *EZH2*, também podem ser encontradas em pacientes com NMPC, sendo consideradas mutações cooperantes (GRABEK et al., 2020). Sistemas de pontuação de prognóstico utilizam a identificação das mutações nos pacientes para prever o diagnóstico nas NMPC com foco específico em cada fenótipo dessas doenças. Por exemplo, a carga alélica de *JAK2V617F* e a presença das mutações de alto risco, *ASXL1*, *SRSF2*, *IDH2*, *SH2B3*, *SF3B1*, *U2AF1* e *TP53*, influenciam diretamente na patologia ocasionando uma piora no prognóstico (GRABEK et al., 2020).

Podem ocorrer diferentes tipos de combinações de mutações “driver” e cooperantes em uma célula. Isso implica na grande diversidade fenotípica encontrada em pacientes com NMPC. Ainda, é possível que pacientes que possuem o mesmo perfil genômico apresentem diferentes fenótipos pois, as alterações das células não se dão apenas entre as múltiplas mutações que podem acomete-las, mas também a interação com o microambiente (LEE; GODFREY; NANGALIA, 2020), como demonstrado na figura 1 abaixo, a PV, TE e MF apresentam achados clínicos, hematológicos e moleculares que diferem entre elas.

**Figura 1** - Representação esquemática das alterações moleculares que ocorrem na Célula Tronco Hematopoética (CTH) e principais achados clínicos, morfológicos e moleculares na Policitemia Vera (PV), Trombocitemia Essencial (TE) e Mielofibrose (MF).



Fonte: Próprio Autor, com base nas informações de BARBUI et. al., 2018; GREENFIELD et al., 2018; TEFFERI; BARBUI, 2017; TEFFERI et al., 2018; VAINCHENKER; KRALOVICS, 2017.



Os avanços científicos alcançados nos últimos 20 anos, bem como a descoberta da mutação *JAK2V617F*, auxiliaram na maior precisão do diagnóstico, novas classificações de risco e atualizações da abordagem terapêutica. No entanto, com o decorrer do tempo, o arsenal terapêutico dessas doenças permaneceu consideravelmente semelhante, consistindo no uso de medicamentos que possibilitam o controle dos sintomas e aumento da sobrevida, sendo eles o tratamento com o ruxolitinibe (inibidor da JAK), hidroxiureia, interferon, anagrelide, ácido acetil salicílico, bussulfano. Alguns pacientes alcançam diferentes taxas de remissão hematológica, porém, apenas uma pequena porcentagem dos pacientes atinge a remissão molecular, além disso o único tratamento curativo é o transplante alogênico de medula óssea (TAVARES et al., 2019).

A indicação atual para terapia medicamentosa em PV e TE é prevenir complicações trombóticas, especialmente em situações de alto risco (TEFFERI; BARBUI, 2017). Nesse sentido, a terapia com aspirina é muito importante para pacientes com mutação *JAK2*, devido ao risco aumentado de trombose arterial. Além disso, a flebotomia crônica intermitente em pacientes com PV é realizada com o objetivo de manter o hematócrito abaixo de 45%. A hidroxiureia apresenta atividade capaz de controlar a eritrocitose, trombocitose e levar à redução esplenomegalia e controle sintomático (MARCHIOLI et al., 2013; TAVARES et al., 2019; TEFFERI et al., 2018). Já para os pacientes com MF com esplenomegalia e sintomas constitucionais, é indicado como tratamento de primeira linha o ruxolitinibe, inibidor seletivo para JAK1 e JAK2. Da mesma forma, está indicado o ruxolitinibe para pacientes com PV que apresentam intolerância ou resistência à hidroxiuréia (TAVARES et al., 2019).

### **2.3 Apoptose**

A apoptose, ou morte celular programada, é regulada a nível genético por mecanismos complexos das vias extrínsecas e intrínsecas de sinalização, ambas convergem para a ativação das caspases e consequente morte celular por clivagem de proteínas celulares (D'ARCY, 2019; GREEN; LLAMBI, 2015).

A via extrínseca, também chamada de via do receptor de morte, está relacionada com ativação de receptores transmembrana. Esses receptores, membros da superfamília do fator de necrose tumoral (TNF), apresentam domínios de morte responsáveis pela transmissão do sinal de morte. Seus ligantes incluem FASL / FASR, TNF-A / TNFR1, APO3L / DR3, APO2L / DR4 E APO2L / DR5. A interação do ligante com o receptor de morte promove a dimerização do domínio efetor de morte e o recrutamento de proteínas adaptadoras que irão estimular a ativação da pró-Caspase 8. Por exemplo, a ligação do FASL ao seu receptor FAS leva ao recrutamento da proteína adaptadora FADD, enquanto a ligação de TNF ao seu receptor promove o recrutamento da proteína adaptadora TRADD. A proteína FADD ou TRADD associa-se a pro-Caspase 8 formando um complexo de sinalização indutor de morte chamado DISC. Este é capaz de induzir a apoptose através da ativação auto catalítica da pro-caspase 8 que cliva diretamente as caspases executoras (Caspase 3 e 7), iniciando a apoptose. Essa via pode ser inibida por c-FLIP, uma proteína que se liga à FADD e Caspase-8 tornando-as inativas (CARNEIRO; EL-DEIRY 2020; D'ARCY, 2019; PISTRITTO et al., 2016)

A via intrínseca ou mitocondrial, por sua vez, é disparada a partir de estímulos externos, como ausência de fatores de crescimento, citocinas e hormônios, ou pela presença de fatores como as toxinas, radiação, hipóxia, espécies reativas de oxigênio, vírus e outras moléculas. Esses estímulos são capazes de causar mudanças na membrana mitocondrial interna, alterando a sua permeabilidade e liberando proteínas pró-apoptóticas, como o citocromo c, Smac/DIABLO, HtrA2 / Omi (CARNEIRO; EL-DEIRY, 2020; D'ARCY, 2019; KALE; OSTERLUND; ANDREWS, 2018; PISTRITTO et al., 2016).

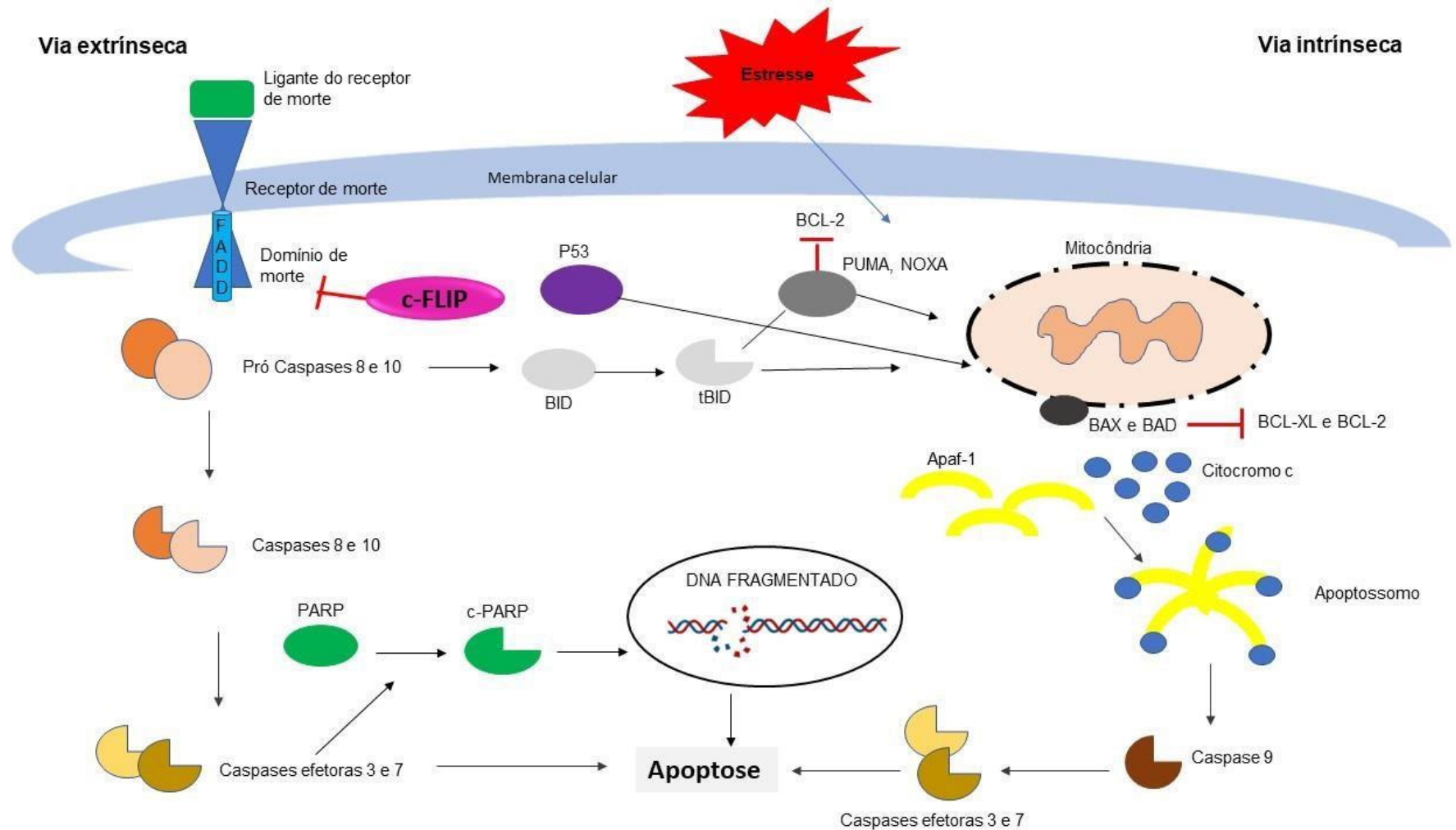
Destacam-se na via intrínseca a participação das proteínas da família BCL-2, que são divididas em pró-apoptóticas (BCL-10, BAX, BAK, BID, BAD, BIM, BIK E BLK, PUMA e NOXA) e anti-apoptóticas (BCL-2, BCL-X, BCL-XL, BCL-XS, BCL-W, BAG, MCL1). A proteína BAD, por exemplo, quando não fosforilada, se transloca para mitocôndria e induz a liberação do citocromo c ao se associar e inibir as proteínas anti-apoptóticas BCLXL e BCL-2 (KALE; OSTERLUND; ANDREWS, 2018; WARREN; WONG-BROWN; BOWDEN, 2019).

O citocromo c se liga ao APAF-1 (Fator de Ativação 1 da Protease Apoptótica) ocasionando uma mudança conformacional na qual várias outras APAF-1 se associam e formam um complexo chamado apoptossomo. Esse complexo recruta e

ativa várias pró-caspases-9 que por sua vez ativam caspases executoras (Caspase 3) que induzem a apoptose. A participação de Smac/DIABLO e HtrA2 / Omi na apoptose é atribuída a sua capacidade de inibir a atividade de IAP (inibidores de proteínas de apoptose) (CARNEIRO; EL-DEIRY, 2020; D'ARCY, 2019; XU; LAI; HUA, 2019).

Da mesma forma, as moléculas pró-apoptóticas como PUMA, NOXA após serem ativadas, acarreta à perda da supressão apoptótica e desencadeia a apoptose mediada por P53, proteína supressora de tumor, e liberação do citocromo c após a interação com BAX (pró-apoptótica) e inibição de BCL-2 (anti-apoptótica) (D'ARCY, 2019; MORTEZAEE et al., 2019; PISTRITTO et al., 2016; XU; LAI; HUA, 2019). O dano ao DNA, hipóxia e a expressão de oncoproteínas (MYC, RAS) também são capazes de ativar a via apoptótica dependente de P53 (XU; LAI; HUA, 2019). O P53 é um fator de transcrição que atua no ciclo celular, de forma a garantir uma divisão celular sem erros, através da indução da parada do ciclo, reparo dos danos ao DNA e iniciação da apoptose com a participação das proteínas citadas acima. Em resposta ao estresse, mutações e aumento da expressão de oncogenes as moléculas envolvidas na via extrínseca e intrínsecas são reguladas, tratando-se de uma via apoptótica dependente de P53 (SEVER; BRUGGE, 2015). Em relação à via intrínseca, o P53 desempenha papel modulador em BAX, NOXA, PUMA E BID (PISTRITTO et al., 2016). Portanto, sua atividade previne o desenvolvimento de diversos tipos de cânceres e por essa razão a presença da mutação no gene p53, presente em mais de 50% dos cânceres, torna a sua atividade comprometida, ocasionando maior probabilidade do surgimento de doenças. Há outros reguladores do ciclo celular além do P53 que pode influenciar a apoptose, por exemplo o P21 (MORTEZAEE et al., 2018; XU; LAI; HUA, 2019). Representação das vias apoptóticas na figura 2.

**Figura 2** - Esquema das vias extrínseca e intrínseca da apoptose, com representação das moléculas envolvidas no processo.



Fonte: Próprio Autor, com base nas informações de CARNEIRO; EL-DEIRY 2020; D'ARCY, 2019; PISTRITTO et al., 2016; XU; LAI; HUA, 2019.

A apoptose é caracterizada por mudanças na morfologia celular, incluindo condensação da cromatina, aparecimento de corpos apoptóticos associados à membrana, fragmentação do DNA e clivagem da polimerase poli (ADP-ribose) (PARP). A PARP é uma proteína nuclear de 116 kDa que apresenta um papel crucial no reparo e replicação do DNA. PARP-1 é o primeiro a responder aos danos no DNA, ele se liga a região danificada e inicia-se a síntese de poli (ADP-ribose) e recrutamento de outras proteínas necessárias para reparo do DNA (PRASAD et al., 2019). Além disso, PARP participa nos processos de necrose e apoptose celular em resposta ao estresse (SHIN et al., 2015). No primeiro caso, células expostas a grave dano ao DNA tem aumento na atividade de PARP-1, resultando depleção do pool de NAD<sup>+</sup> e ATP da célula, isto acarreta à morte celular necrótica, a não ser que ocorra a clivagem que inativa PARP-1, e promova a apoptose (CHAITANYA; STEVEN; BABU, 2010). Deste modo, PARP-1 desempenha um papel central na apoptose determinando o destino celular. PARP é um substrato da caspase 3 e 7 e a sua clivagem resulta na formação de fragmentos de 89kD e 24kD. O fragmento de 89 kDa não consegue se ligar ao DNA e é transportado para o citosol, o outro fragmento fica retido no núcleo e atua como inibidor da PARP-1 ativa (AKPOLAT et al., 2020; CHAITANYA; STEVEN; BABU, 2010; PANAGIOTIS et al., 2014). Por essa razão, a presença de PARP clivada (c-PARP) pode ser considerada um indicador de apoptose (AKPOLAT et al., 2020; SHIN et al., 2015).

O que determina se uma célula irá sofrer apoptose é, portanto, o equilíbrio entre fatores pro e anti-apoptóticos. A desregulação desse processo de morte está associada à proliferação celular não controlada, desenvolvimento e progressão do câncer e resistência às terapias medicamentosas (PISTRITTO et al., 2016; TOGNON; NUNES; CASTRO, 2013). Sabe-se que a desregulação da apoptose está envolvida na fisiopatologia de diversas patologias, como doenças degenerativas, autoimunes e neoplasias (PISTRITTO et al., 2016).

A atividade aumentada de tirosinas quinases influenciam na resistência à apoptose das células. O gene de fusão BCR-ABL presente na LMC, por exemplo, ocasiona ativação de tirosinas quinases favorecendo o surgimento da doença por desregulação da apoptose, além da proliferação e migração (CHEREDA; MELO, 2015). Na PV, Fernandez-Luna (1999), demonstrou que a expressão alterada de BCL-XL contribui para a resistência à apoptose das células. Na PV células eritróides

podem ser estimuladas mesmo na ausência de EPO, e essas células demonstraram expressar BCL-XL, principalmente nos eritroblastos mais maduros (FERNANDEZ-LUNA, 1999).

Estudo realizado por Tognon e colaboradores (2012) relatam desregulação nos genes anti-apoptóticos (A1, MCL1, BCLW, BCL2) e pró-apoptóticos (BID, BIK, BAX), em células CD34+ e leucócitos de paciente com TE e MF. Pacientes com a presença da mutação *JAK2V617F* na TE apresentaram uma expressão aumentada de genes anti-apoptóticos e diminuição de pro-apoptóticos que apresentaram correlação negativa com a carga alélica (TOGNON et al., 2012). Outros grupos também demonstraram alteração de apoptose nas NMPC. Trelinski e colaboradores (2012) mostraram que megacariócitos de pacientes com TE apresentam resistência à apoptose induzida por caspase, devido a regulação positiva de BCL-2 e regulação negativa de BAX (TRELIŃSKI et al., 2012). A mutação CALR também exerce efeito na resistência apoptose por meio da regulação da expressão, localização e função de P53 (VARRICCHIO; MIGLIACCIO, 2014). Portanto, a desregulação da apoptose está diretamente relacionada com a patogênese das NMPC.

## **2.4 Ciclo celular**

O ciclo celular é um processo complexo que envolve diversas moléculas reguladoras e sua desregulação está relacionada com o surgimento das neoplasias. O ciclo celular é dividido em 3 fases. A interfase é a fase na qual ocorre a duplicação dos cromossomos e o crescimento celular, sendo subdividida em Fase G1, fase S, e fase G2. A fase mitótica é a fase onde a célula sofre divisão do núcleo e citocinese, na qual ocorre a fissão celular dando origem a duas células filhas. Existe ainda a fase G0, que corresponde ao momento em que as células estão quiescentes, ou seja, não estão realizando mitose (VAN DEN HEUVEL, 2015). A passagem por essa sequência de fases é regulada por diversas proteínas que controlam a entrada em G1 e a transição entre demais etapas (GAO; LIU, 2019). Destacam-se as quinases dependentes de ciclina (Cdks) e os inibidores de CDK. Tem ainda papel muito importante nesse processo a proteína P53, supressora de tumor (GAO; LIU, 2019).

Desregulação de moléculas envolvidas no controle do ciclo celular está sabidamente ligada ao desenvolvimento de neoplasias hematológicas, incluindo as NMPC. A mutação *JAK2 V617F* promove alteração da expressão e atividade de proteínas reguladoras de ciclo celular como CDC25A, ciclina D2 e CDK6,

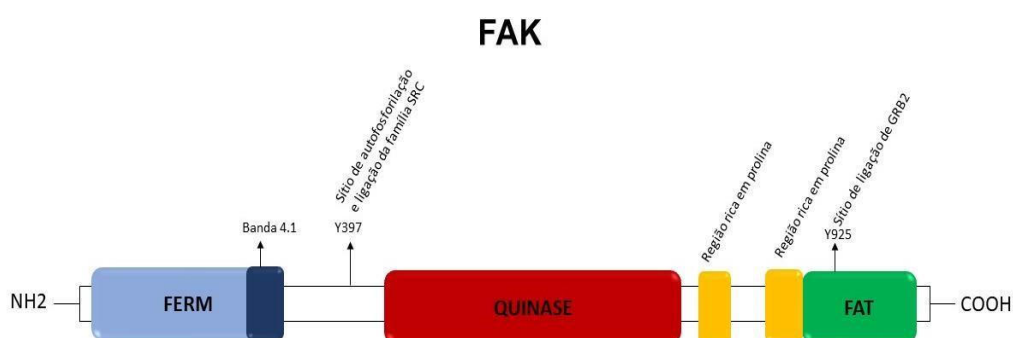
contribuindo para a mieloproliferação (RAMPAL et al., 2021). Também já foram descritos aumento de expressão de inibidores de CDK em pacientes com PV (DAI; KRANTZ, 2001), alterações no P27 e P53 nas NMPC (FURUHATA et al., 2009; TOGNON et al., 2016).

## 2.5 Quinase de adesão focal (FAK)

A FAK é uma tirosina quinase codificada pelo gene denominado *PTK2*, que se localiza na região cromossômica 8q24.3 e que tem sua expressão regulada por fatores de transcrição como NF- $\kappa$ B e P53 (SULZMAIER; JEAN; SCHLAEPFER, 2014).

A proteína FAK contém três domínios: o domínio N-terminal (FERM), composto por uma banda 4.1, ezrina, radixin, homologia de moesina; o domínio quinase central rico em prolina e o domínio C-terminal, FAT, conforme demonstrado na figura 3 (CHEN, CHENG, 2018; MOUSSON et al., 2018).

**Figura 3** - Esquema representativo da estrutura linear da FAK, demonstrando os 3 domínios (FERM, QUINASE E FAT), os resíduos de tirosina e regiões ricas em prolina.



Fonte: Próprio autor (Adaptado de CHEN H., CHENG C.Y. (2018)).

A FAK se localiza no meio citoplasmático, conectada com as integrinas, podendo ser ativada por elas e por fatores de crescimento (DEVAUD et al., 2019). Ao interagir com as integrinas e com redes de actina, ela desempenha atividade estrutural, de adesão celular e interação célula-ambiente. A FAK apresenta também atividade enzimática (DEVAUD et al., 2019). A ativação da FAK ocorre por

mecanismo de autofosforilação da tirosina 397 (Y397) e transfosforilação por interação direta com o domínio FERM N-terminal da FAK nas tirosinas Y861 e Y925, por exemplo, por interação da SRC, PI3K e GRB2 nesse domínio (MITRA; SCHLAEPFER, 2006; STAHL et al., 2020).

A FAK pode fosforilar diretamente quinases da família SRC e formar um complexo de heterodímero (PAUL et al., 2020; SULZMAIER; JEAN; SCHLAEPFER, 2014). Estudo realizado por Frolov e colaboradores (2016) observaram que a inibição da SRC em glioblastoma anula a fosforilação de FAK em células tratadas com imatinibe e nilotinibe (FROLOV et al., 2016).

O complexo FAK-SRC ativado apresenta participação em diversas funções celulares normais como sobrevivência, proliferação, adesão e motilidade celular. Por exemplo, as proteínas adaptadoras PAXILINA (PXN) e p130Cas são alvos do complexo FAK-SRC e estão envolvidas nos últimos dois processos citados acima (MITRA; SCHLAEPFER, 2006). As proteínas FAK-SRC-PXN estão associadas ao prognóstico desfavorável das neoplasias (KRATIMENOS et al., 2017). A via de sinalização ITGB1/FAK/PXN/AKT regula a adesão focal de células de câncer gástrico (ZHANG L et al., 2021) e a proteína talin-1 influencia o desenvolvimento do câncer gástrico através do eixo de sinal PTK2-PXN-VCL-E-Cadherin-CAPN2-MAPK1 (YAN et al., 2020).

Dessa forma, contribuem para progressão do câncer através da regulação positiva de vias envolvidas nesses processos, por exemplo alterando o microambiente favorecendo a angiogênese e metástase (KURENOVA, et al. 2004; MITRA; SCHLAEPFER, 2006; MOUSSON, et. al. 2018; OLIVEIRA, 2013).

Estudos sugerem que a FAK pode atuar regulando a atividade de P53, interferindo na apoptose celular. Na ausência da expressão de FAK, parece haver um aumento da apoptose, uma vez que a FAK promove a degradação de P53 mediada por MDM2 (GILLORY et al., 2015; PAUL et al., 2020). Ademais, os fatores de transcrição p53 e NF- $\kappa$ B ativam e reprimem o promotor *PTK2*, respectivamente (SULZMAIER; JEAN; SCHLAEPFER, 2014).

Além disso, sugere-se que a FAK iniba apoptose relacionada ao receptor de morte. Estudo realizado por Kurenova e colaboradores (2004), demonstrou que RIP uma serina / treonina quinase que contém um domínio de morte, quando associada a FAK está relacionada com a ativação de TNF alfa e do NF- $\kappa$ B. A associação da FAK com RIP favorecem a resistência à apoptose e promovem a sobrevivência de



células tumorais (KURENOVA et al., 2004). A FAK também ativa a via PI3K-AKT que possui papel de promover sobrevivência e proteção contra a morte celular programada (SULZMAIER; JEAN; SCHLAEPFER, 2014). Assim como a ativação de JAK / STAT3 é importante contribuinte para a progressão e invasão tumoral, a sinalização da FAK/STAT3 também exerce efeito na migração e invasão de células cancerígenas (PAUL et al., 2020; CHO et al., 2018).

O complexo FAK-SRC ativado participam da regulação de moléculas envolvidas na progressão do ciclo celular, podendo desta forma participarem da progressão tumoral (REISKE et al., 2000). Uma função bastante importante da FAK nesse contexto de ciclo celular é sua interação com as proteínas P53 e MDM2. P53 é uma proteína supressora de tumor, com papel muito importante no controle do ciclo celular. FAK, por sua vez, pode se deslocar para o núcleo e interagir diretamente com P53, limitando sua atividade, além de promover a degradação de P53 pelo mecanismo dependente de MDM2 (MITRA; SCHLAEPFER, 2006). Além disso, FAK pode aumentar a expressão de p21 e p27, proteínas inibidoras do ciclo celular, e inibir a progressão da fase G1-S (MITRA; SCHLAEPFER, 2006). Também já foi demonstrado na literatura que FAK pode regular a progressão do ciclo celular ao interagir e regular a atividade de proteínas que participam da regulação do ciclo celular, como CDC42 e RUNX1 (CANEL et al., 2017; VAN NIMWEGEN; VAN DE WATER, 2007). Desta forma, a participação da FAK nas neoplasias pode também envolver o controle do ciclo celular e, portanto, na proliferação, além de adesão/migração e apoptose.

FAK é altamente expressa em vários tipos de câncer, como mama, ovário, intestino, leucemia mieloide aguda (PAUL et al., 2020). Sulzmaier, Jean e Schlaepfer (2014) mostram níveis aumentados de mRNA da FAK em várias doenças malignas como tumores ovarianos serosos (~ 37%) e cânceres de mama invasivos (~ 26%) a partir de análise do banco de dados Atlas do Genoma do Câncer (SULZMAIER; JEAN; SCHLAEPFER, 2014).

Tem sido demonstrado na literatura que a superexpressão da FAK aumenta a motilidade e invasão de células tumorais, acarretando maior capacidade de metástase do câncer, por meio de mecanismos independentes e dependentes de quinase (FROLOV et al., 2016; PAUL et al., 2020) e que a FAK tem papel importante no desenvolvimento, migração e invasão, uma vez que sua inibição limitou a metástase e o crescimento do câncer (STAHL et al., 2020). A FAK regula vias como

APC /  $\beta$ -catenina, Raf / Ras, PI3K /Akt/ mTOR e BMP / Smad que estão desreguladas no câncer. Participa também de vias de sinalização proliferativas e anti-apoptóticas, que quando reguladas positivamente, favorecem a progressão do tumor. Essa regulação pode ocorrer em células tumorais, hematopoéticas, fibroblastos e endoteliais, essa última está envolvida com a angiogênese tumoral (DEVAUD et al., 2020; SULZMAIER; JEAN; SCHLAEPFER, 2014; SOOD et al., 2010; WARD et al., 2013).

Gustafsson e colaboradores (2014) demonstraram o envolvimento da atividade proteína FAK no aumento do número de células mielóides em modelo knockout para a proteína Shb em células BCR-ABL positivas, contribuindo para a progressão leucêmica (GUSTAFSSON et al., 2014). Já foi demonstrado também que a proteína quimérica BCR-ABL, presente na LMC, é capaz de interagir com FAK, alterando a adesão celular, culminando na liberação prematura das células da medula óssea, desregulando a hematopoese (MAIA et al., 2013). Além disso, cerca de 40% dos pacientes com LMA têm expressão de FAK aumentada, estando associada ao aumento da proliferação de blastos, celularidade aumentada e prognósticos ruins (CARTER et al., 2017).

Apesar dos avanços na identificação de mutações e desenvolvimento de medicamentos para as NMPC, mais estudos relacionados à fisiopatologia dessas doenças se justificam pelo fato das mutações identificadas não explicarem como uma mesma alteração leva a três doenças com fenótipos diferentes e como pacientes com a mesma doença podem ou não apresentar determinada mutação. Além disso, ainda não existe um tratamento farmacológico que leve todos os pacientes à remissão molecular (redução da carga alélica) e modifique a história natural dessas doenças, sendo o transplante de medula óssea o único tratamento curativo (TAVARES et al., 2019).

Desta forma, considerando que as proteínas FAK e SRC possuem influência nas vias relacionadas à proliferação e morte celular, além de adesão e migração, o presente estudo propõe avaliar o papel da via de sinalização FAK/SRC na proliferação e apoptose de linhagem celular *JAK2V617F* positiva, a fim de obter melhor compreensão dos mecanismos envolvidos na fisiopatologia dessas doenças, possibilitando no futuro a identificação de novos alvos terapêuticos.

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 *Objetivo geral*

Avaliar o papel das proteínas FAK e SRC na proliferação e apoptose na linhagem celular *JAK2V617F* positiva.

#### 3.2 *Objetivos específicos*

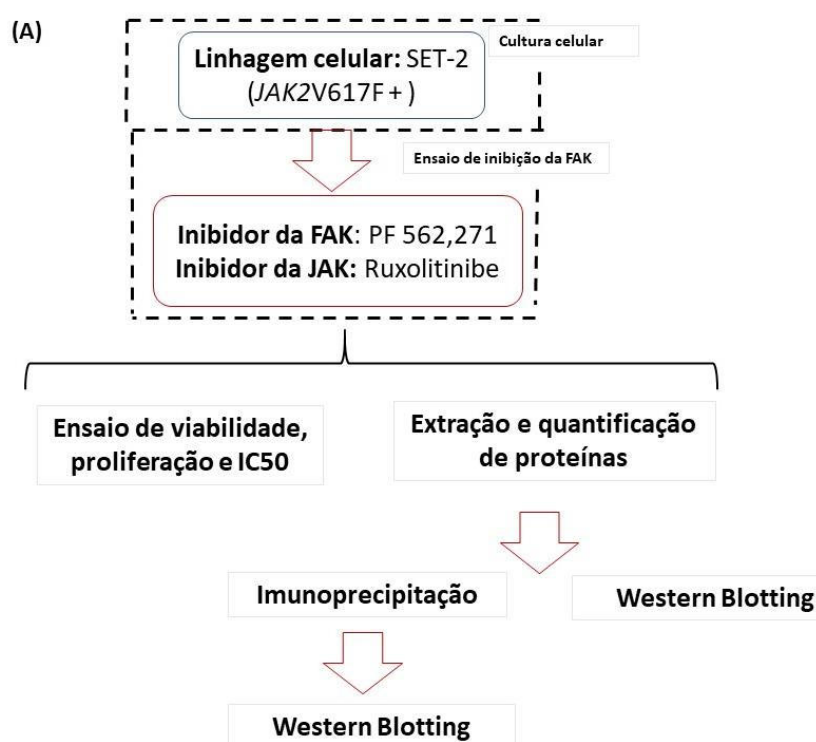
1. Avaliar interação das proteínas FAK e SRC utilizando a técnica de imunoprecipitação;
2. Avaliar o efeito do inibidor da FAK na viabilidade e proliferação celular;
3. Avaliar o efeito do inibidor da FAK na apoptose celular avaliando-se a expressão de PARP clivado e CASPASE-3 clivada por western blotting após o tratamento;
4. Avaliar o efeito do inibidor da JAK na via de sinalização da FAK/SRC através da análise de expressão das proteínas SRC e P-SRC por western blotting;
5. Avaliar, por meio de análises *in silico* de bancos públicos, a expressão gênica do gene *PTK2* e a sua correlação com genes relacionados à proliferação, sobrevivência e apoptose.

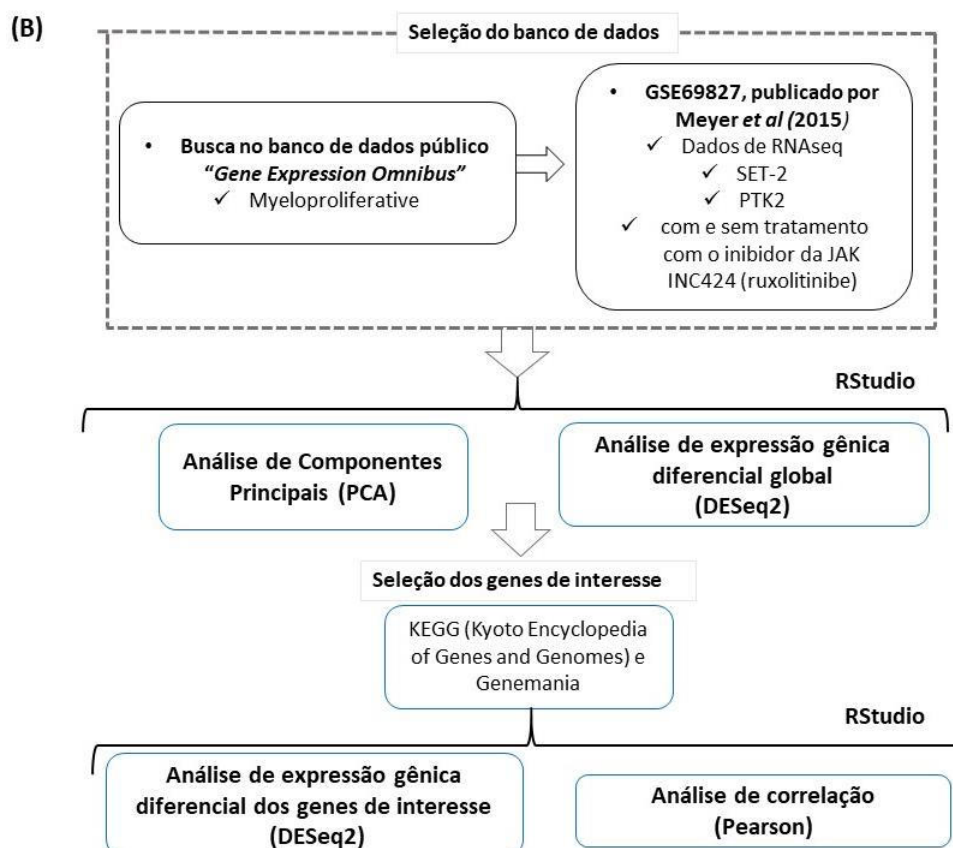
### 4 METODOLOGIA

Nesta seção, serão apresentadas as metodologias utilizadas para execução desse trabalho. Foram realizados ensaios *in vitro* de cultura celular para avaliar o papel da proteína FAK nas células, com uso dos inibidores da FAK PF-562,271 (PF-271) e da JAK (ruxolitinibe). Em paralelo, foi realizada uma análise de banco de dados de expressão gênica que continham dados de expressão do gene *PTK2*, codificador da proteína FAK.

A seguir, o delineamento experimental do projeto está representado em dois fluxogramas para facilitar a compreensão (Figura 4A e 4B):

**Figura 4** - Fluxograma do delineamento experimental. (A) Esquema representativo dos experimentos *in vitro* com a linhagem celular SET-2. (B) Esquema representativo dos experimentos *in silico* com banco de dados de expressão gênica da linhagem SET-2.





Fonte: Elaborado pelo autor (2021).

Legenda: MTT: 4,5-Dimetiltiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolio; INC424: ruxolitinibe, inibidor da JAK; PF-271: Inibidor da FAK; NMPC: neoplasias mieloproliferativas crônicas; IC50: concentração inibitória de crescimento em 50%.

#### 4.1 Cultura Celular:

Neste estudo foi utilizada a linhagem celular SET-2 como modelo para NMPC. É uma linhagem megacariocítica isolada de um paciente com Trombocitemia Essencial, heterozigota para mutação *JAK2V617F*. Esta linhagem tem capacidade de amadurecimento e produz partículas semelhantes a plaquetas sem adição de TPO e IL6. Portanto, é adequada para estudos de proliferação e mecanismos de diferenciação de células leucêmicas (UOZUMI et al., 2000). Foi gentilmente cedida pela Profa. Fabíola Attié de Castro (FCFRP- USP). A cultura celular foi realizada em meio RPMI 1640 (LONZA, 12-702F) adicionado de 1% de Penicilina/Estreptomicina (LONZA, 21F095302) e 20% de soro bovino fetal (LGC Biotecnologia, 10-BIO500) previamente inativado por tratamento em banho maria a 56°C por 30 minutos. As células foram mantidas à 37°C em estufa de CO<sub>2</sub>, sempre na concentração de 0,5 x 10<sup>6</sup> por ml. A avaliação de sua viabilidade e número de células foi realizada por

contagem em Azul de Tripán (Sigma Aldrich, 15250-061) em câmara de Neubauer (Hausser Scientific 3100).

#### **4.2 Ensaio de inibição da FAK**

O ensaio de inibição da FAK com o inibidor PF-562,271 (PF-271) (código PZ0387, Sigma Aldrich), que tem ação ATP- competitiva (ROBERTS et al., 2008), foi padronizado após o teste com várias concentrações (1  $\mu$ M; 2,5  $\mu$ M; 5  $\mu$ M; 10  $\mu$ M; 25  $\mu$ M e 50  $\mu$ M), por 72 horas e feito o cálculo de IC50. A escolha do número de células e do tempo de tratamento foi baseada na literatura (DE MARINIS et al., 2019). O inibidor da JAK INC424, denominado ruxolitinibe (MedChemExpress, código HY50856) foi utilizado na concentração de 300nM por 72 horas (MACHADO-NETO et al., 2018). A escolha da concentração do inibidor do ruxolitinibe foi baseada na literatura em que se obteve efeito sobre as células SET-2 (LIMA, LOPES, MACHADO-NETO, 2021; MACHADO-NETO et al., 2018).

Após os tratamentos, foram realizados os ensaios com MTT para determinação da viabilidade, proliferação e IC50 do inibidor da FAK PF-271. Também foi realizada a análise de expressão proteica por Western Blotting, conforme detalhado abaixo.

#### **4.3 Ensaio de viabilidade e proliferação**

Para avaliação da viabilidade celular foi realizado o ensaio com brometo de (3(4,5-Dimetiltiazol-2-yl) -2,5-diphenyltetrazolio (MTT) (Sigma Aldrich, M5655), que possui uma coloração amarelada e em células viáveis é reduzido a cristais de formazan de cor púrpura, através de enzimas chamadas redutases. A concentração de cristais formados é diretamente proporcional à concentração de células viáveis (KUMAR; NAGARAJAN; UCHIL, 2018). Para isso, foram plaqueadas  $4 \times 10^4$  células por poço em placa de 96 poços de forma que, considerando o volume de inibidor, DMSO (para controle negativo) ou doxorrubicina (controle positivo), o volume final fosse 180  $\mu$ L. Os tratamentos foram realizados em triplicata e foram realizados 3 experimentos independentes. Ressalta-se que a viabilidade celular antes do experimento foi verificada por azul de tripan, estando acima de 90%. A droga

doxorrubicina à 10  $\mu\text{M}$  foi utilizada como controle positivo para morte. Após o tempo 72 horas de tratamento, foram adicionados 20  $\mu\text{L}$  de uma solução a 5mg/mL de MTT e incubou à 37°C em estufa de CO<sub>2</sub>, durante quatro horas. Posteriormente, foram centrifugadas à 2000rpm, durante três minutos, em temperatura ambiente. Após a centrifugação, retirou o sobrenadante e adicionou 200  $\mu\text{L}$  de DMSO (Sigma Aldrich, D8418). Foram incubadas novamente à 37°C em estufa durante 30 minutos. Terminado o período de incubação, foi realizada a leitura em leitor de microplaca (ThermoFisher Multiskan FC 51119000) a 570nm. Desta leitura, foi calculada a média da absorbância das triplicatas, subtraída da média da absorbância do branco e então os controles foram considerados 100% de viabilidade para a confecção dos gráficos de viabilidade celular em porcentagem.

Para a determinação do IC<sub>50</sub> do PF-271, 4 x10<sup>4</sup> células foram tratadas com o inibidor da FAK nas concentrações de 1  $\mu\text{M}$ ; 2,5  $\mu\text{M}$ ; 5  $\mu\text{M}$ ; 10  $\mu\text{M}$ ; 25  $\mu\text{M}$  e 50  $\mu\text{M}$  por 72 horas. Em seguida, foi realizado o mesmo procedimento para determinação da viabilidade pelo teste MTT, como descrito anteriormente nessa mesma seção. A determinação do IC<sub>50</sub> foi feita conforme descrito na seção “Análise Estatística”.

Para estimar o quanto da proliferação estava sendo reduzida ao se inibir FAK, os valores de absorbância após o ensaio de MTT foram plotados na equação obtida a partir de uma curva padrão para se estimar o número de células em cada poço. Para fazer a curva padrão, foram plaqueadas 1x10<sup>4</sup>, 2x10<sup>4</sup>, 4x10<sup>4</sup>, 8x10<sup>4</sup> e 16x10<sup>4</sup> células em uma placa de 96 poços, em triplicata e realizou-se o ensaio de MTT. Foram obtidas as absorbâncias para cada ponto. A partir desta curva, foi realizada a análise de regressão linear e obtida uma equação, que permitiu estimar o número de células para cada tratamento. Posteriormente, realizou-se a análise estatística para verificar a redução no número de célula nos poços tratados e dessa forma estimou-se a redução da proliferação (MOSMANN, 1983).

#### **4.4 Extração e quantificação de proteínas**

Após o tratamento, as células foram recuperadas, centrifugadas à 1500 rpm por 10 minutos à 4°C, o meio foi retirado e então foi realizada uma lavagem com PBS estéril por 2 vezes, centrifugando-se à 1500rpm/5minutos/4°C. O lisado celular

proteico foi obtido adicionando-se 200  $\mu$ L de Tampão RIPA (ThermoFisher, 89900), acrescido no momento da utilização dos seguintes inibidores de fosfatases: Pirofosfato de Sódio 2,5mM (Sigma Aldrich, 221368); Ortovanadato de Sódio 1mM (Sigma Aldrich, S6508) e  $\beta$ -glicerofosfato 1mM (Sigma Aldrich, G9422) e 1% do coquetel inibidor de protease -PIC (Sigma Aldrich, P8340). Após a lise, foi realizado o processo de flushing com seringa de insulina, por 10 vezes e centrifugação à 6000 rpm por 20 minutos. O sobrenadante foi recuperado e o pellet descartado. O lisado foi armazenado à -80C. Para quantificação de proteínas utilizou-se o kit *BCA Protein Assay Kit* (Pierce™, 23227), de acordo com as instruções do fabricante. Após a quantificação, foi adicionado ao lisado o tampão Laemmli (Tris 1M, SDS 10%, Glicerol 20%, Azul de bromofenol, Beta mercaptoetanol 10%, Água Milli Q qsp) na proporção para diluir de 5x para 1x e fervido a 95°C por cinco minutos, procedendo-se em seguida o armazenamento à -20°C ou o SDS-PAGE (Western blotting).

#### **4.5 Imunoprecipitação:**

Para o ensaio de imunoprecipitação, que teve como objetivo analisar a interação entre FAK e SRC, foram adicionados 10  $\mu$ L do anticorpo anti-FAK policlonal (ThermoFisher, AH00502), 30  $\mu$ L de proteína A-G plus (Merck, US11P05) e 500 $\mu$ g de extrato proteico em um microtubo de 1,5mL. A mistura foi incubada a 4°C *overnight* sob agitação. No dia seguinte, as amostras contendo o lisado foram centrifugadas por um minuto à 800 rpm. Após recolher e armazenar o sobrenadante, o imunoprecipitado obtido foi então submetido a cinco sucessivos processos de lavagem com a solução tampão de lavagem constituída por: TRIS-HCl pH 7,5 a 0,1M, EDTA a 0,001M, Triton 100-X a 0,5%v/v (Sigma Aldrich, T8787) e Ortovanadato de Sódio a 0,002M (Sigma Aldrich, S6508). A cada lavagem foi adicionado 1mL de tampão de lavagem, seguido de centrifugação por 1 minuto a 800rpm, e posterior retirada do sobrenadante, preservando o pellet. Ao final das lavagens, foram adicionados 40 $\mu$ L de tampão de amostra Laemmli ao imunoprecipitado e ao sobrenadante, seguido de fervura à 95°C por cinco minutos e posteriormente armazenados a -20°C até a realização do Western blotting.



#### 4.6 Western Blotting

As proteínas foram submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE), sendo a corrida realizada a 80mV nos primeiros 30 minutos, e 100mV por cerca de uma hora e meia e 120 V por cerca de duas horas na cuba de eletroforese (Digel, código DGV10). Para a realização da corrida um tampão constituído por Tris 25 Mm pH 8.3, Glicina 192 mM, SDS 0,1%, água Milli Q qsp, foi usado. Para a etapa de transferência foi utilizada uma membrana de PVDF (Amersham Hybond P0.45), com dimensões iguais a do gel de poliacrilamida. A membrana foi ativada por dez segundos em metanol, cinco minutos em água destilada e dez minutos em tampão de transferência (Tris 25 mM pH 8.4, Glicina 192 mM, 20% de metanol, água Milli Q qsp) seguida pela montagem do *sandwich*. A transferência foi feita por 2,5h à 0,35A utilizando a cuba de transferência e fonte da BIORAD. Após a transferência, a membrana foi incubada por duas horas com solução de bloqueio constituída por albumina bovina (BSA) (Sigma Aldrich A2153) 1%, 3% ou 5% diluído em TBS-Tween 0,1% (Tris 20mM, NaCl 150 mM, 0,1% Tween 20), de acordo com o padronizado para a proteína em questão (Quadro 1). A incubação com anticorpo primário foi feita *overnight* à 4 °C, de acordo com as condições padronizadas para cada anticorpo (Quadro 1). Após a incubação *overnight* com o anticorpo primário, foram realizadas três lavagens de dez minutos com TBS-T e a membrana foi incubada por 45 minutos com o anticorpo secundário. Os anticorpos secundários utilizados foram *anti-mouse* IgG (GE Amersham, NA934V) ou *anti-rabbit* (GE Amersham, NA931V). Após a incubação, foram realizadas três lavagens de dez minutos com TBS-T e em seguida foi utilizado o kit Amersham ECL Prime (GE Health Care, RPN2232), seguindo-se as instruções do fabricante. Na sequência, o sinal quimioluminescente foi detectado em filme fotográfico iniciando-se com 1 minuto de exposição e adequando o tempo conforme a necessidade. A revelação e fixação realizada utilizando-se revelador (Carestream Dental, 6850051) e fixador (Carestream Denta, 6850069) radiográfico.

**Quadro 1 - Especificações dos anticorpos utilizados**

<b>Anticorpo</b>	<b>Espécie</b>	<b>Marca, código</b>	<b>Solução de bloqueio (TBS-Tween 0,1%)</b>	<b>Diluição do primário/Diluyente</b>	<b>Diluição do secundário/Diluyente</b>
<b>Anti-FAK</b>	Rabbit	Thermo Fisher Scientific, AHO0502	BSA 3%	1:1000/BSA1%	1:5000/BSA5%
<b>Anti-pFAK (y387)</b>	Rabbit	Cell Signaling Technology, 3283S	BSA 3%	*não padronizado	1:5000/BSA3%
<b>Anti-SRC</b>	Rabbit	Cell Signaling Technology, 2108S	BSA 3%	1:1000/BSA5%	1:5000/BSA5%
<b>Anti-p-SRC</b>	Rabbit	Cell Signaling Technology, 2101S	BSA 5%	1:1000/BSA5%	1:5000/BSA5%
<b>Anti-PARPc</b>	Rabbit	Cell Signaling Technology, 9541S	BSA 3%	1:1000/BSA5%	1:5000/BSA5%
<b>Anti-Caspase3 Clivada</b>	Rabbit	Cell Signaling Technology, 9664S	BSA 3%	1:1000/BSA1%	1:2000/BSA5%
<b>Anti-Actina</b>	Mouse	BIORAD VMA00078	BSA 5%	1:5000/ leite 5%	1:5000/BSA 5%

Legenda: BSA: albumina de soro bovino.

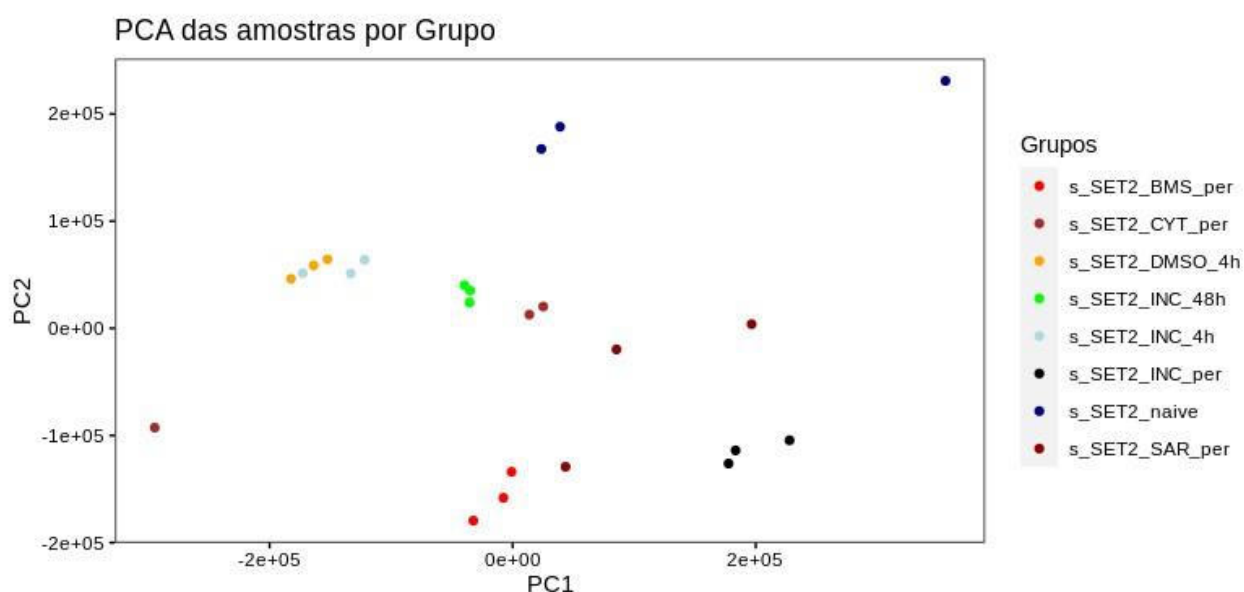
#### **4.7 Seleção e análise de banco de dados público de expressão gênica (RNAseq)**

Com o objetivo de se analisar a expressão do gene *PTK2*, codificante da FAK, em NMPC, foi realizada uma busca no banco de dados público “*Gene Expression Omnibus*” (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>) utilizando-se a palavra-chave “*myeloproliferative*”. Dos trabalhos analisados, o banco de dados GSE69827, publicado por Meyer e colaboradores (2015) foi selecionado por trazer dados de

RNaseq da linhagem celular SET-2 com e sem tratamento com o inibidor da JAK INC424 (ruxolitinibe), em diversos esquemas de tratamento.

Primeiramente, foi realizada a Análise de Componentes Principais (PCA) com todos os genes e todos os grupos de amostras do banco de dados, sendo elas BMS911543, CYT387, DMSO, 48h INC424, 4h INC424, SAR302503 e NAIVE, para permitir a visualização global do agrupamento das triplicatas de cada grupo de amostra e a distribuição dos grupos de acordo com a expressão gênica (ABDI; WILLIAMS, 2010). Foram selecionados então os seguintes grupos de amostras para análise: controle DMSO (GSM1817329, GSM1817330, GSM1817331), tratamento ruxolitinibe (700nM) INC 48h (GSM1817332, GSM1817333, GSM1817334), tratamento ruxolitinibe INC 4h (GSM1817335, GSM1817336, GSM1817337). Cada grupo é composto por suas triplicatas. A seguir, o gráfico do PCA, usado para auxiliar na definição dos grupos a serem estudados (Figura 5).

**Figura 5** - Ordenação produzida por Análise de Componentes Principais (PCA) para os grupos de amostras do banco GSE69827.



Legenda: s\_SET2\_BMS\_per: Pacientes tratados e resistentes ao inibidor da JAK; s\_SET2\_CYT\_per: Pacientes tratados e resistentes ao inibidor da JAK1/2; s\_SET2\_DMSO\_4h: Controle DMSO; s\_SET2\_INC\_48h: Pacientes tratados com inibidor da JAK ruxolitinibe por 48h; s\_SET2\_INC\_4h: Pacientes tratados com inibidor da JAK ruxolitinibe por 4h; s\_SET2\_naive: Controle; s\_SET2\_SAR\_per: Pacientes tratados e resistentes ao inibidor seletivo da JAK2.

Para a seleção dos genes a serem avaliados quanto à expressão diferencial e correlação com o gene *PTK2*, foi realizada uma busca por “PTK2” na base de dados

KEGG PATHWAY Database (*Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes*), uma base de dados que contém informações das funções dos genes ou moléculas, das vias que estão envolvidos e como estão associadas (KANEHISA; FURUMICHI; SATO, 2021). Foram selecionados 66 genes que codificam proteínas que participam de vias relacionadas à proliferação, sobrevivência, apoptose, inflamação e adesão, sendo a maioria deles participantes das vias “*Focal Adhesion* (kKO04510)” e “*PI3K/AKT*” (KO04151). Alguns genes não foram selecionados pela sua ausência no banco de dados trabalhado. Os 66 genes selecionados foram: *PTK2, ACTB, AKT1, BAD, BCAR, BCL2, BID, BMF, CAPN1, CAPS7, CASP3, CASP8, CASP9, CASS4, CCNA1, CDC42, CDKN1A, CDKN1B, CRK, CTNNB1, DCC, DOCK1, EDIL3, EFS, ELK1, FAS, FLNA, FYN, GRB2, GRB7, HRAS, IL12RB2, ITPKC, JAK2, JUN, KRAS, MCL1, MDM2, MTOR, PAK, PARP1, PARVA, PDGFRB, PDK1, PIK3IP1, PTEN, PTRH2, PXN, RAC, RAP1B, RASGRF2, RHOA, ROCK, RPTOR, SHC1, SMEK1, SOS1, SRC, STAT1, STAT5A, TLN1, TP53, VASP, VAV1, VCL* e *ZYX*.

#### **4.8 Análise Estatística**

O IC50 foi obtido após análise de regressão não linear entre a viabilidade versus logaritmo da concentração molar do PF-271 utilizando-se os softwares livres R e R studio (R CORE TEAM, 2021) e o pacote “drc” (RITZ et al., 2015). Para análise dos dados de viabilidade, foi empregado o teste de ANOVA seguido de pós-teste de Tukey e para análise da proliferação foi realizada a regressão linear. Ambas as análises foram realizadas no software JAMOVI (THE JAMOVI PROJECT, 2021). Para as análises de expressão proteica, utilizou-se o software ImageJ (SCHNEIDER; RASBAND; ELICEIRI, 2012).

Com relação às análises de expressão gênica no banco público de RNAseq, foram utilizados os softwares livres R e R studio (R CORE TEAM, 2021). Para avaliação da distribuição das amostras de acordo com a expressão gênica global foi realizada a análise de componente principal (PCA), uma técnica de análise multivariada que pode ser usada para analisar interrelações entre um grande número de variáveis e explicar essas variáveis em termos de seus componentes (ABDI; WILLIAMS, 2010). Para a análise da expressão gênica diferencial (DEG), foi utilizado o pacote DESeq2, no R (LOVE; HUBER; ANDERS, 2014). Para a confecção do

*heatmap* referente aos resultados da DEG global, foram selecionados os 40 genes mais significativos ( $p < 0,01$ ) e usado Log de “*Fold Change*” ( $\log_{2}FC$ )  $> 2$  como critério de seleção e utilizou-se o pacote ComplexHeatmap (GU; EILS; SCHLESNER, 2016).

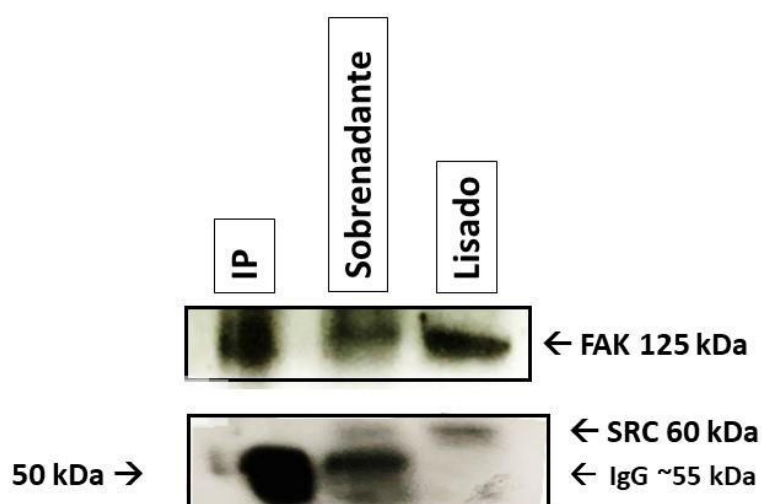
A partir dos resultados da DEG global, foram plotados os *heatmaps*, *volcanoplot* e diagrama de caixas (“*boxplot*”) dos 66 genes selecionados. Posteriormente, realizou-se a análise de correlação de Pearson entre o gene *PTK2* e os demais genes. Foram consideradas significantes as análises que apresentaram  $p < 0,05$ .

## 5 RESULTADOS

### 5.1 Interação proteínas FAK e SRC

Com o objetivo de confirmar a interação das proteínas FAK e SRC na linhagem celular SET-2, foi realizado o preparo do lisado celular, seguido de imunoprecipitação da proteína FAK e imunoblotting para SRC (Figura 6).

**Figura 6** - Imunoprecipitação da FAK e imunoblotting da FAK e da SRC (resultado de um único experimento).



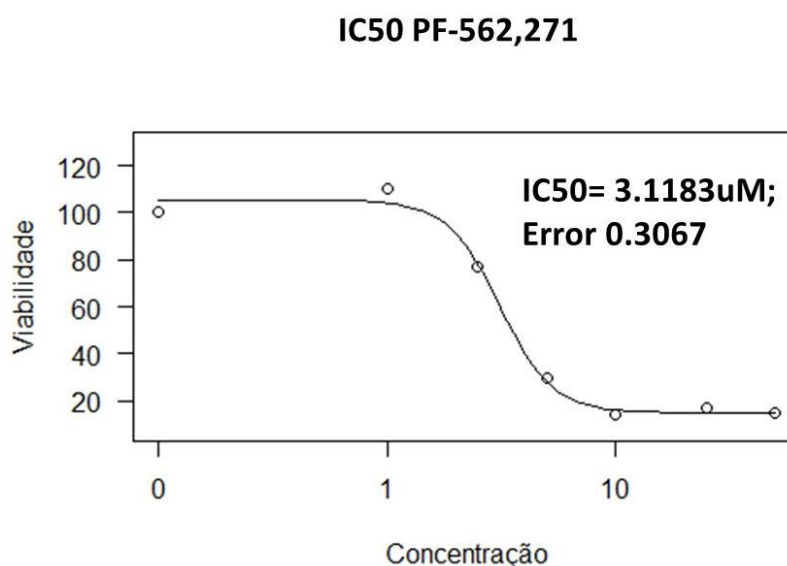
Legenda: IP: Imunoprecipitado; ~: aproximadamente

Conforme mostrado na Figura 6, foi possível observar a presença da FAK (125 KDa) e da SRC (60 KDa) no lisado, mostrando que a linhagem SET-2 expressa ambas as proteínas. No entanto, não foi possível visualizar a presença da SRC no IP, apenas no sobrenadante. Dessa forma, não foi possível demonstrar a interação FAK e SRC nesta linhagem. Destaca-se que a banda de aproximadamente 55kDa correspondente a cadeia pesada da IgG, que é a anti-FAK utilizada para realização do IP, pois as cadeias pesadas de IgG aparecem em aproximadamente 55 kDa, enquanto as cadeias leves de IgG aparecem em aproximadamente na região de 28 kDa (DECAPRIO; KOHL, 2017).

## 5.2 Ensaio de determinação do IC<sub>50</sub> do inibidor da FAK (PF271)

O valor do IC<sub>50</sub> do inibidor PF-271 foi determinado a partir do tratamento das células SET-2 por 72 horas nas concentrações de 1 µM, 2,5 µM, 5 µM, 10 µM, 25 µM e 50 µM e ensaio com MTT. Posteriormente, foi feita análise de regressão não linear e plotado um gráfico com a viabilidade em porcentagem versus log da concentração de PF-271 (Figura 7).

**Figura 7** - Gráfico de dose-resposta usado para cálculo do valor de IC<sub>50</sub>.  
(Resultado de três experimentos independentes).



Legenda: IC<sub>50</sub>: Concentração Inibitória de 50% da viabilidade das células. Error: Desvio padrão.

Conforme indicado na figura 7, a concentração que reduziu em 50% a viabilidade das células SET- 2 foi de 3.1183 µM.

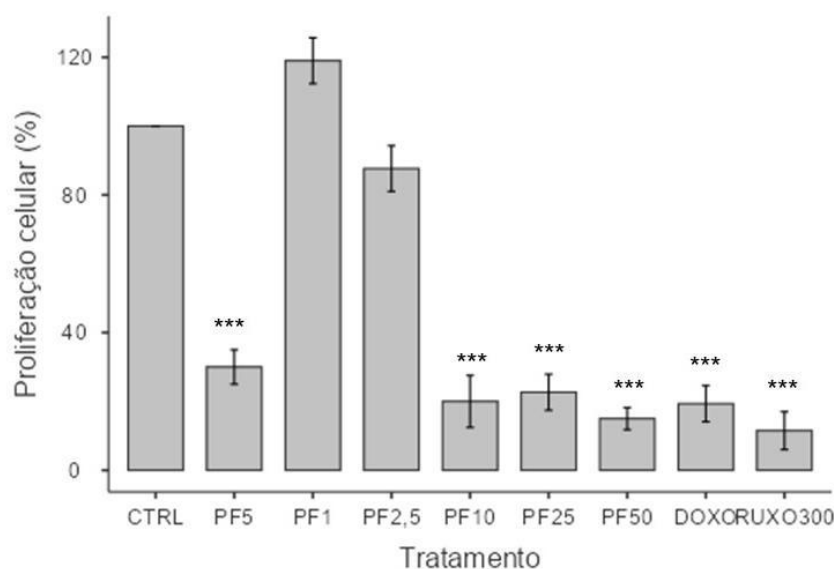
## 5.3 Avaliação do efeito inibidor da FAK PF-271 na proliferação celular de linhagem celular SET-2

Avaliou-se o efeito do inibidor da FAK (PF-271) e inibidor da JAK (ruxolitinibe) na proliferação das células SET-2 nas concentrações 1 µM, 2,5 µM, 5 µM, 10 µM, 25 µM e 50 µM para PF-271 e 300 nM para ruxolitinibe, por 72 horas. A figura 8

representa a proliferação celular em porcentagem (%) para cada amostra, tratadas e não tratadas.

**Figura 8** - Efeito do inibidor PF-271 na proliferação celular da linhagem SET2.

Porcentagem da proliferação celular para cada tratamento em relação ao controle (resultado de três experimentos independentes).



Legenda: CTRL: Controle; PF: inibidor da FAK e suas concentrações; RUXO: ruxolitinibe, inibidor da JAK utilizado na concentração 300 nM. \*\*\* $p < 0.001$ ; Barras representam desvio padrão.

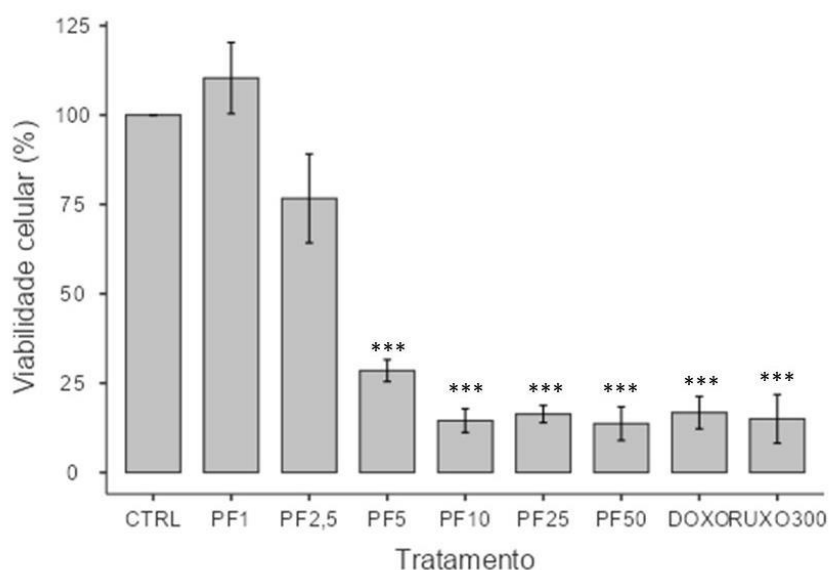
Considerando a absorbância e o número de células, pode-se estimar uma redução de 12,3%, 70,1%, 80%, 78%, e 85,6% na proliferação após tratamento com PF-271 nas concentrações 1  $\mu$ M, 2,5  $\mu$ M, 5  $\mu$ M, 10  $\mu$ M, 25  $\mu$ M e 50  $\mu$ M, respectivamente (Figura 8). Para o tratamento com ruxolitinibe 300 nM, a redução na proliferação foi de 88,5 % (Figura 8) e 80,6% para doxorubicina. A concentração de 1  $\mu$ M do inibidor da FAK não diminuiu a viabilidade celular.

#### **5.4 Avaliação do efeito inibidor da FAK PF-271 na viabilidade da linhagem celular SET-2**

Os resultados dos ensaios de viabilidade celular após tratamento com PF-271 nas concentrações 1  $\mu$ M, 2,5  $\mu$ M, 5  $\mu$ M, 10  $\mu$ M, 25  $\mu$ M e 50  $\mu$ M, ruxolitinibe 300 nM e doxorubicina 10  $\mu$ M (controle positivo), por 72 horas, estão representados na figura 9.



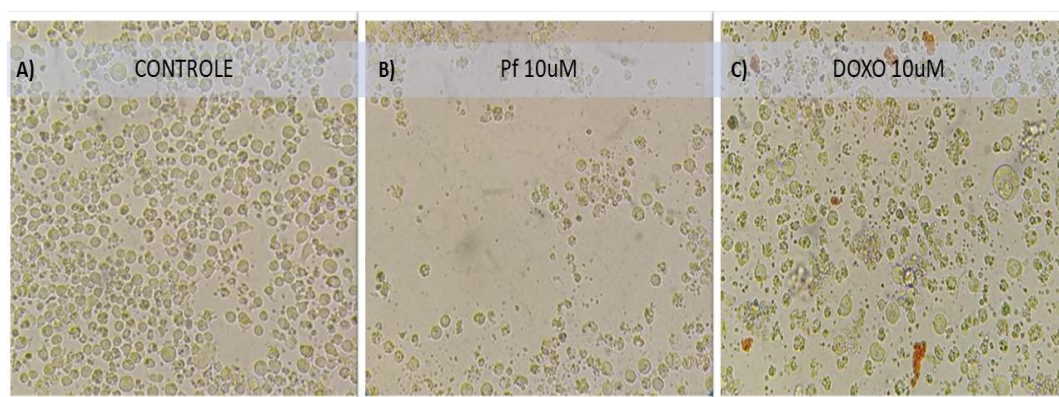
**Figura 9** - Efeito do inibidor PF-271 na viabilidade da linhagem SET-2. (Resultado de três experimentos independentes).



Legenda: \*\*\*:  $p < 0,001$  em comparação ao controle. CTRL: Controle; PF-271: inibidor da FAK; DOXO: Doxorrubicina; RUXO: Ruxolitinibe. Foi feita análise estatística utilizando-se o teste de ANOVA seguido de post-test de Tukey.

O tratamento com PF-271 nas concentrações 1  $\mu\text{M}$  e 2,5  $\mu\text{M}$  não induziram alteração significativa da viabilidade, tendo apresentado aumento de 10,3% e diminuição de 23,3%, respectivamente. Os tratamentos com 5  $\mu\text{M}$ , 10  $\mu\text{M}$ , 25  $\mu\text{M}$  e 50  $\mu\text{M}$  de PF-217 reduziram significativamente a viabilidade celular, sendo a redução de 71,5%, 85,5%, 83,7% e 86,3% respectivamente. O ruxolitinibe reduziu 85% da viabilidade celular. A doxorrubicina reduziu a viabilidade em 83,2% (Figura 9). A figura 10 ilustra o aspecto das células SET-2 no controle, após o tratamento com PF-271 na concentração de 10  $\mu\text{M}$  e após o tratamento com doxorrubicina 10  $\mu\text{M}$ , evidenciando a redução do número e alteração da morfologia no tratamento com PF-217.

**Figura 10** - Comparação da cultura celular SET-2 após tratamento com PF-271 e doxorubicina.



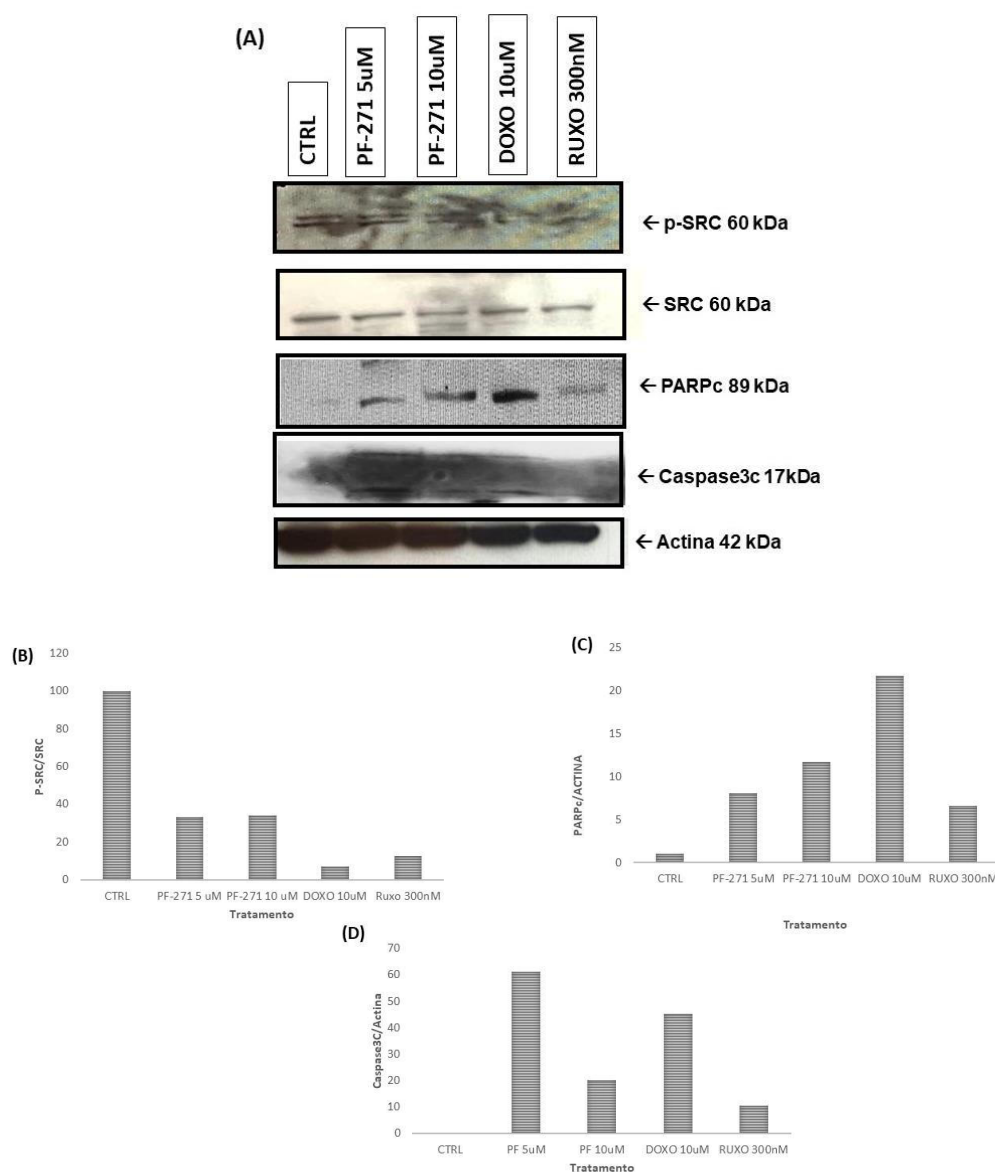
Legenda: PF 10  $\mu$ M: Inibidor da FAK PF-271 na concentração 10  $\mu$ M; DOXO: Doxorubicina, controle positivo de morte.

### **5.5 Efeito do inibidor da FAK PF-271 na apoptose da linhagem celular SET-2.**

Após tratamento com PF-271, nas concentrações 5  $\mu$ M e 10  $\mu$ M, assim como com o ruxolitinibe, na concentração 300 nM, foi realizada a detecção da proteína PARP clivada (PARPc, 89 kDa), SRC (60 kDa), p-SRC (60 kDa) e Actina (42 kDa) por western blotting (WB), representadas na figura 11A. Foi feita análise semiquantitativa do WB normalizando-se os valores de PARPc e caspase3 clivada pela actina e p-SRC pela SRC, conforme mostrado nas figuras 11B e 11C.

**Figura 11** - Efeito do inibidor PF-271 na apoptose da linhagem SET-2. Análise da expressão de PARP clivada, Caspase3 clivada, p-SRC e SRC após tratamento com

PF-271 5  $\mu$ M e 10  $\mu$ M, ruxolitinibe 300 nM e doxorrubicina 10  $\mu$ M. A actina foi utilizada como controle endógeno.



Legenda: CTRL: Controle; PF-271: inibidor da FAK; DOXO: doxorrubicina; RUXO: ruxolitinibe. Actina: Controle endógeno. PARPc: PARP clivada; kDa: Quilo Dalton.

A fim de se avaliar o efeito dos inibidores na atividade da proteína FAK, foi realizada a detecção das proteínas p-SRC e SRC, conforme mostrado na figura 11A, por WB. Foi possível verificar a diminuição da fosforilação de SRC nas células tratadas com inibidor PF-217, demonstrando que o tratamento com o inibidor teve efeito na sinalização FAK/SRC (Figura 11A). Foi possível observar que o ruxolitinibe também levou à redução da p-SRC, assim como a doxorrubicina. Por meio da análise de densitometria no programa ImageJ, foi observada diminuição da fosforilação

sendo a razão P-SRC/SRC nos tratamentos com PF-271 5  $\mu$ M e 10  $\mu$ M de 0,334 e 0,339 vezes a razão no controle. O tratamento com ruxolitinibe levou a uma diminuição mais intensa da fosforilação, sendo 0,126 vezes em comparação ao controle (Figura 11B).

A fim de verificar a ocorrência de apoptose na linhagem celular SET-2 após o tratamento com o inibidor PF-271, foi realizada a marcação de PARPc. Como pode ser observado na figura 11A, foi detectada a expressão da PARPc nas amostras tratadas com PF-271 nas duas concentrações (5  $\mu$ M e 10  $\mu$ M), assim como no controle positivo (doxorrubicina 10  $\mu$ M) e no tratamento com ruxolitinibe a 300 nM, indicando a indução da apoptose.

Ao realizar-se a quantificação por densitometria das bandas, foi observado que houve um aumento de aproximadamente 8,08 e 11,70 vezes de PARPc nos tratamentos com PF-271 nas concentrações 5  $\mu$ M e 10  $\mu$ M com relação ao controle, respectivamente. Por sua vez, a amostra tratada com doxorrubicina apresentou aumento de aproximadamente 21,73 vezes em relação ao controle e o ruxolitinibe apresentou aumento de 6,58 vezes (Figura 11C).

Ainda analisando se a inibição de FAK induz apoptose, a expressão da caspase3 clivada foi 61,25 vezes e 20,09 vezes maior nas células tratadas com PF-271 nas concentrações 5  $\mu$ M e 10  $\mu$ M respectivamente, 10,5 vezes nas células tratadas com ruxolitinibe 300nM e 54,34 vezes nas células tratadas com doxorrubicina 10  $\mu$ M (Figura 11D).

## **5.6 Análise *in silico* de banco de expressão gênica da linhagem SET-2**

Com o objetivo de analisar o perfil de expressão gênica do gene *PTK2*, que codifica a proteína FAK, tal como a sua correlação com genes envolvidos em vias de proliferação, apoptose e adesão, optou-se em trabalhar com o banco de dados GSE69827 que se trata de um banco de dados de RNAseq da linhagem celular SET-2.

### **5.6.1 ANÁLISE DE EXPRESSÃO GÊNICA DIFERENCIAL GLOBAL**

A análise da expressão gênica diferencial global (DEG) entre os grupos Controle (DMSO) e INC 4h resultou em 3623 genes diferencialmente expressos ( $P < 0.01$ ). Já a análise de DEG entre o grupo Controle (DMSO) e o grupo INC 48h resultou em 8539 genes diferencialmente expressos e 5615 entre grupo INC 4h e INC 48h. A partir destas análises, foram confeccionados *heatmaps* (mapa de calor) com os 40 genes com maior LogFC (Figura 12). A seguir constam as tabelas contendo os top10 genes que apresentaram maiores LogFC na análise entre os grupos (Tabelas 1, 2 e 3).

**Tabela 1** - Lista dos 10 genes que apresentaram maior valor de LogFC quando comparada a expressão gênica entre o grupo controle e INC 4h.

<b>CONTROLE DMSO x INC 4h</b>	
<b>Genes</b>	<b>Log2FoldChange</b>
<i>SOCS3</i>	-3,4558
<i>PIM1</i>	-2,3140
<i>CCNG2</i>	2,99394
<i>EGR1</i>	-3,9409
<i>CISH</i>	-2,4774
<i>HSPA8</i>	-1,6423
<i>ANKZF1</i>	1,5898
<i>RFX3</i>	2,1568
<i>ID1</i>	-3,3286
<i>PFKFB4</i>	1,4948

Fonte: Elaborado pelo autor (2022).

**Tabela 2** - Lista dos 10 genes que apresentaram maior valor de LogFC quando comparada a expressão gênica entre o grupo controle e INC 48h.

<b>CONTROLE DMSO x INC 48h</b>	
<b>Genes</b>	<b>log2FoldChange</b>
<i>TXNIP</i>	2,6230
<i>DUOX2</i>	3,7434
<i>WARS</i>	-2,3462
<i>TP53INP1</i>	5,3451
<i>ALAS2</i>	3,0194
<i>TIMP3</i>	-2,1443
<i>ZFP36L2</i>	2,5038
<i>UBASH3B</i>	-2,2331

CALCOCO1	2,6730
PSAT1	-3,3796

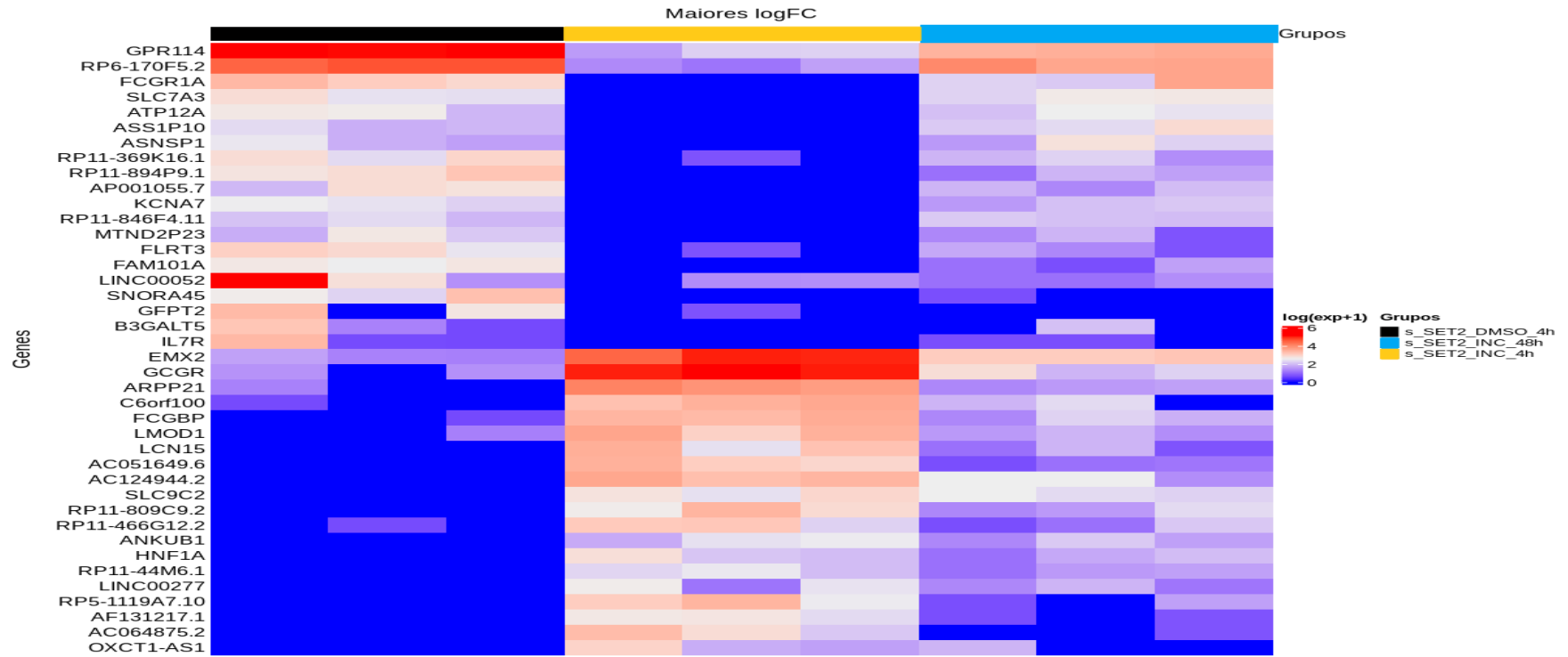
Fonte: Elaborado pelo autor (2022).

**Tabela 3** - Lista dos 10 genes que apresentaram maior valor de LogFC quando comparada a expressão gênica entre o grupo INC4h e INC 48h.

INC 4h x INC 48h	
Genes	log2FoldChange
CBS	2,6306
ALAS2	-2,5916
RNASE1	-3,1419
DUOX2	-2,8675
PSAT1	3,6050
PHGDH	3,0067
WARS	2,4820
TXNIP	-1,7970
EPB42	-2,1367
ACSM3	-1,7917

Fonte: Elaborado pelo autor (2022).

**Figura 12- HeatMap** demonstrado a análise da expressão gênica diferencial global dos 40 mais significativos/diferencialmente expressos, comparando o grupo controle DMSO e os tratamentos com INC 4h e INC 48h.



Legenda: s\_SET2\_DMSO\_4h: Controle DMSO; s\_SET2\_INC\_4h: Pacientes tratados com inibidor da JAK ruxolitinibe por 4 horas; s\_SET2\_INC\_48h: Pacientes tratados com inibidor da JAK ruxolitinibe por 48 horas; em vermelho representa o aumento da expressão e em azul a diminuição da expressão gênica

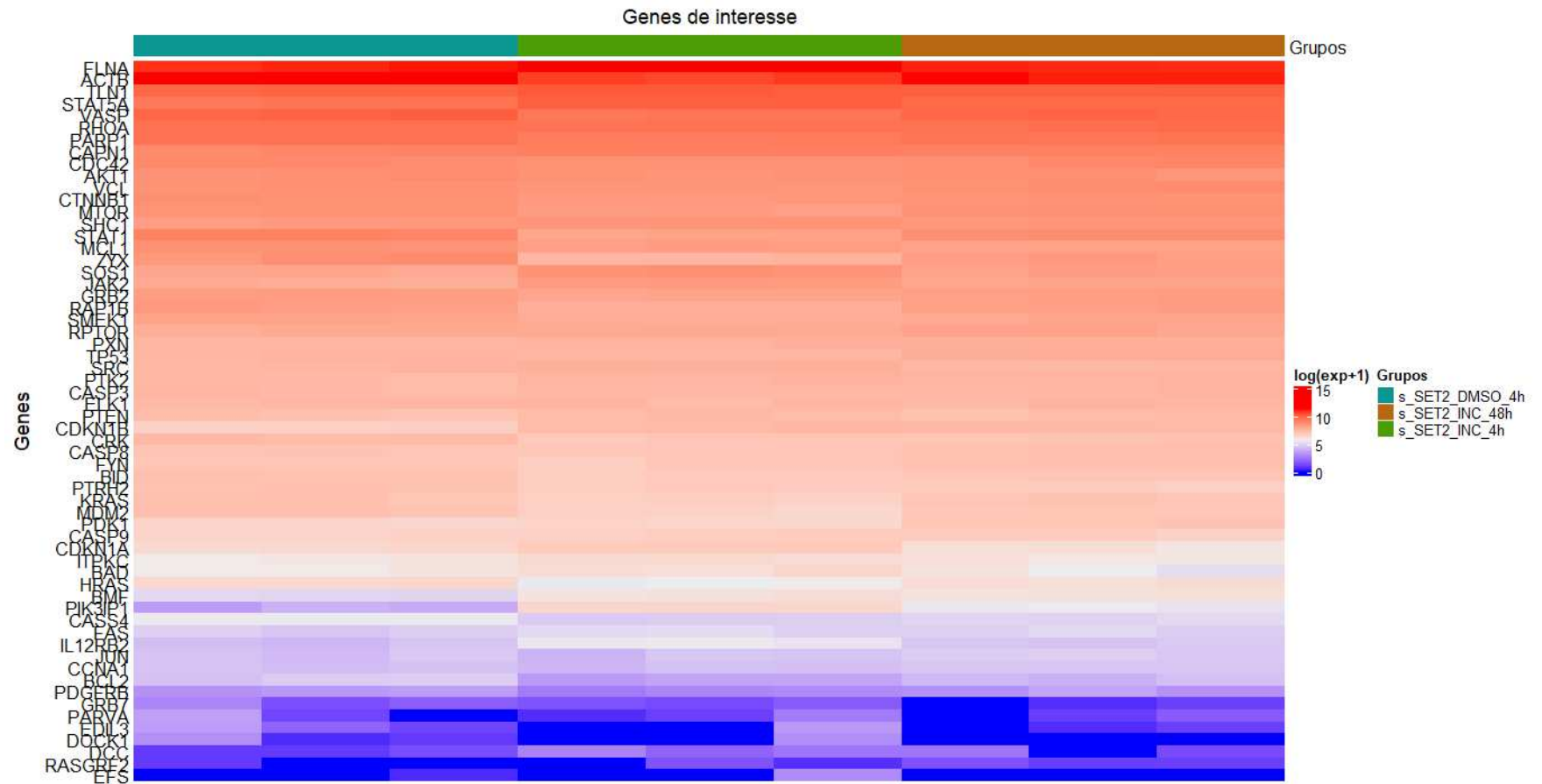


É possível observar alterações no padrão de expressão gênica entre os diferentes grupos analisados. É notável que essas alterações foram mais evidentes quando foram comparados o grupo controle (DMSO) com o tratamento em maior tempo, INC 48h (Figura 12). A diferença entre os grupos INC 4h e INC 48h também fica evidente neste mapa de calor.

### 5.6.2 ANÁLISE DE EXPRESSÃO GÊNICA DIFERENCIAL DOS GENES SELECIONADOS

A análise de expressão gênica global realizada pelo DESeq2, apresentou os seguintes resultados para os 66 genes selecionados: 21 genes se mostraram diferencialmente expressos entre o grupo controle (DMSO) e INC 4h, sendo eles *CDKN1B*, *PIK3IP1*, *BMF*, *MCL1*, *PDK1*, *STAT1*, *STAT5A*, *PTRH2*, *ZYX*, *ACTB*, *CASS4*, *CRK*, *JAK2*, *TP53*, *PXN*, *SOS1*, *RPTOR*, *EDIL3*, *CDKN1A*, *MDM2* e *BID* ( $p < 0,05$ ). Quando comparados os grupos controle (DMSO) e INC 48h, 42 genes se mostraram diferencialmente expressos, sendo eles *PIK3IP1*, *STAT1*, *ZYX*, *ACTB*, *STAT5A*, *SOS1*, *JAK2*, *CDKN1B*, *BMF*, *RAP1B*, *VASP*, *MCL1*, *HRAS*, *IL12RB2*, *MDM2*, *PARP1*, *MTOR*, *CRK*, *CASS4*, *KRAS*, *VAV1*, *BID*, *SMEK1*, *CDKN1A*, *BCL2*, *PTRH2*, *GRB2*, *CTNNB1*, *BCAR1*, *CDC42*, *TLN1*, *FLNA*, *BAD*, *ITPKC*, *RAC1*, *CAPN1*, *VCL*, *PTK2*, *SHC1*, *SRC*, *PXN* e *PTEN* ( $p < 0,05$ ). Em relação à comparação entre os grupos INC 4h e INC 48h, 38 genes apresentaram diferença na expressão, sendo eles, *STAT1*, *ZYX*, *PIK3IP1*, *RAP1B*, *VASP*, *ACTB*, *PDK1*, *CDKN1A*, *MTOR*, *FLNA*, *STAT5A*, *IL12RB2*, *TP53*, *SOS1*, *JAK2*, *HRAS*, *KRAS*, *MDM2*, *VAV1*, *VCL*, *PARP1*, *SRC*, *GRB2*, *CDC42*, *FYN*, *RPTOR*, *SMEK1*, *BID*, *CASP8*, *ITPKC*, *RHOA*, *CTNNB1*, *BCL2*, *MCL1*, *BCAR1*, *BAD*, *ROCK1* e *CASP7* ( $p < 0,05$ ). Os resultados da expressão diferencial dos 66 genes foram utilizados para a confecção do *heatmap*, conforme mostrado na figura 13.

**Figura 13 - HeatMap** demonstrado a análise da expressão gênica diferencial dos genes selecionados comparando o grupo controle DMSO com o tratamento INC 4h e tratamento INC 48h.

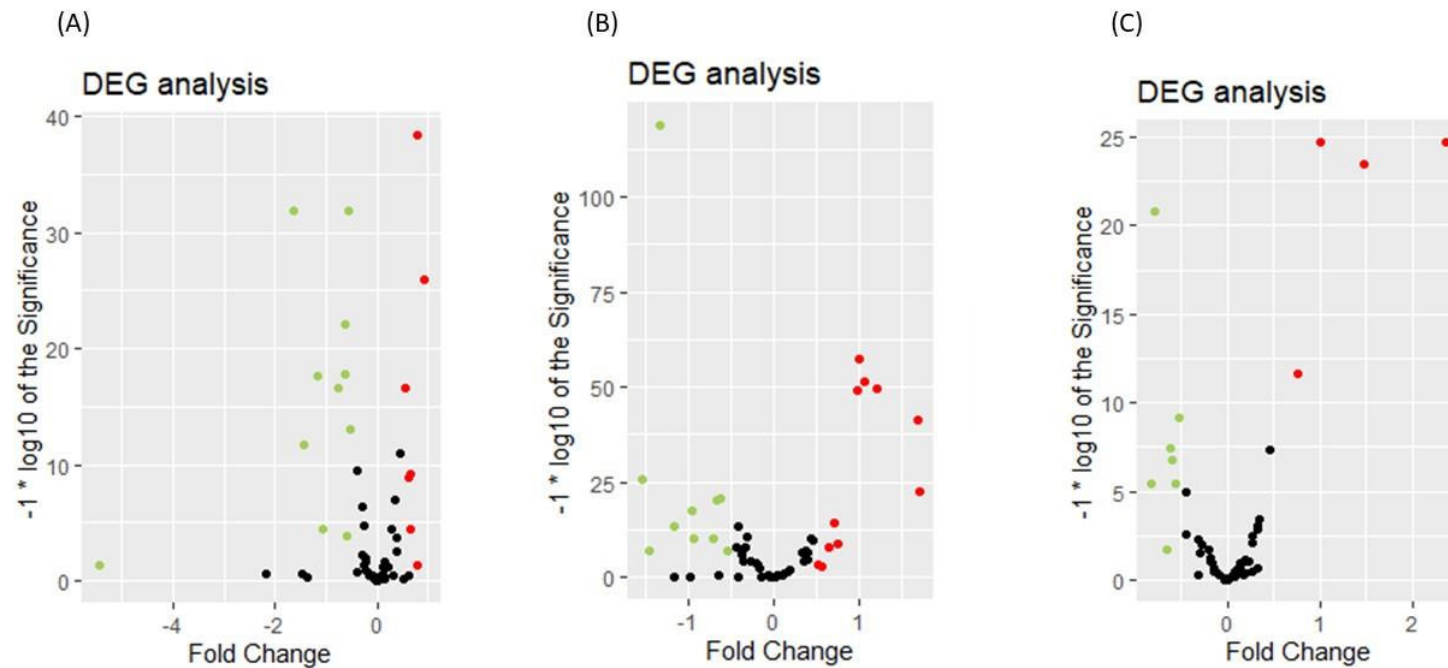


Legenda: s\_SET2\_DMSO\_4h: Controle DMSO; s\_SET2\_INC\_4h: Pacientes tratados com inibidor da JAK ruxolitinibe por 4 horas; s\_SET2\_INC\_48h: Pacientes tratados com inibidor da JAK ruxolitinibe por 48 horas. Em vermelho observamos aumento da expressão e em azul a diminuição da expressão dos genes

Conforme demonstrado na figura 13, o tratamento com INC 48h levou a alterações mais evidentes na expressão gênica quando comparado ao controle (DMSO), tendo perfil semelhante ao resultado da análise de expressão gênica global.

Foi realizada a plotagem do gráfico *Volcano plot* para possibilitar melhor visualização dos genes que apresentaram diferencialmente expressos, sendo possível constatar se os genes foram regulados mais positivamente ou negativamente, conforme demonstrado na figura 14.

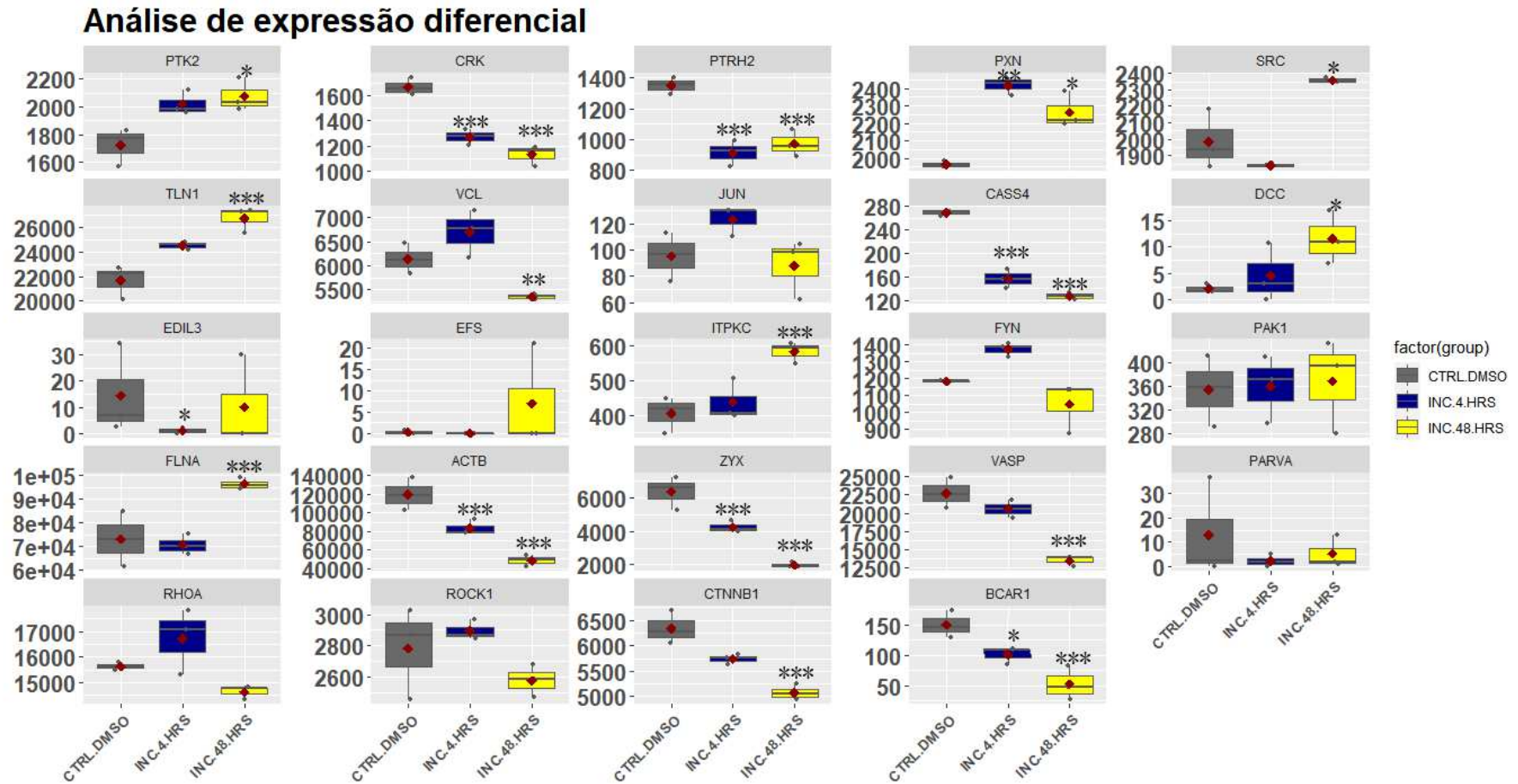
**Figura 14** - Genes regulados positivamente e negativamente dos 66 genes selecionados, entre os grupos controle DMSO, tratamento INC 4h e tratamento INC 48h. (A) Comparação entre INC 4h e INC48h. (B) Comparação entre controle DMSO e INC48h. (C) Comparação entre controle DMSO e INC4h



Legenda: Em preto: Genes não significativos; Vermelho: regulados positivamente; Verde: Regulados negativamente. Significância  $p < 0,05$ .

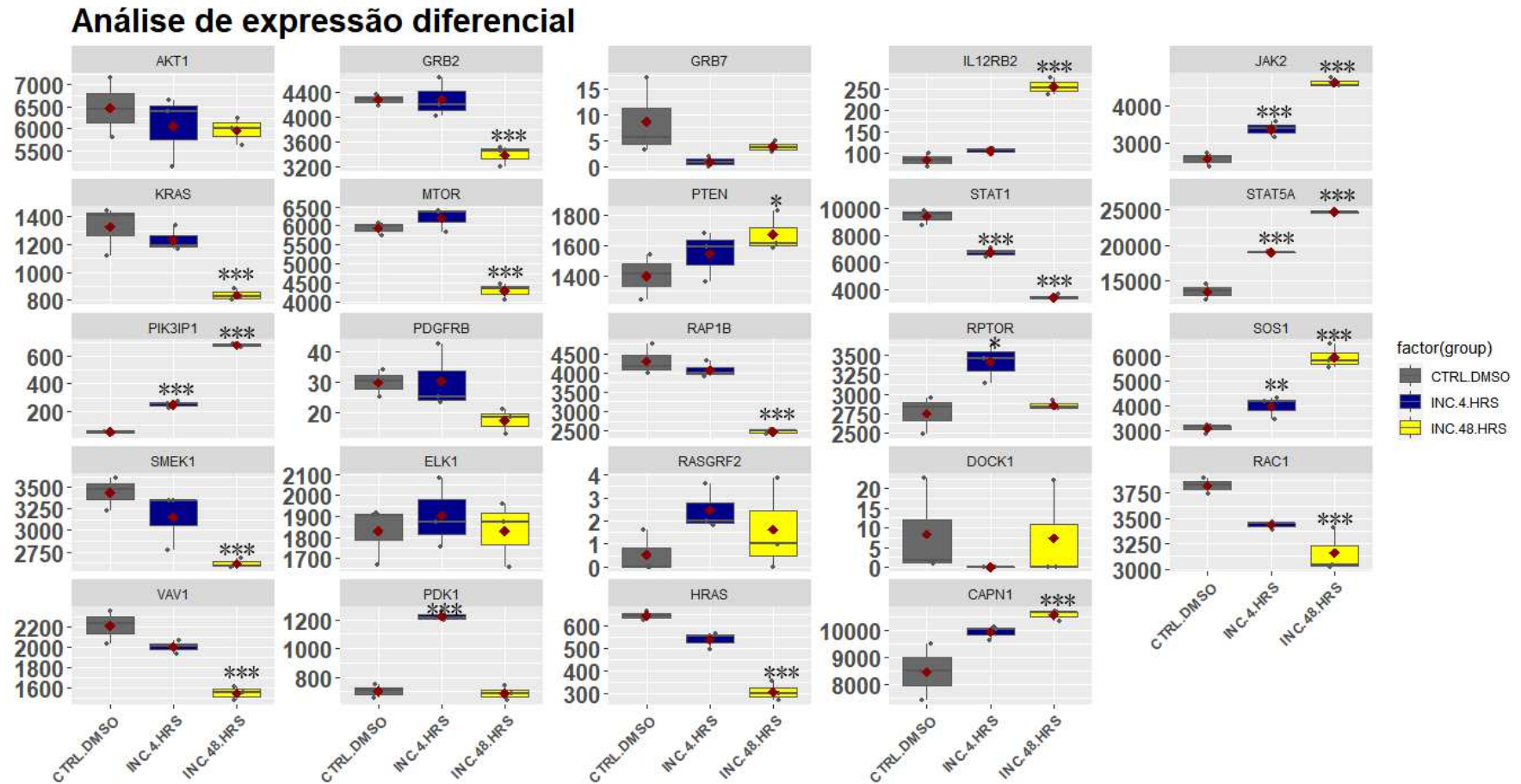
Os diagramas de caixa (“*boxplot*”) mostrados a seguir (Figuras 15, 16, 17 e 18), representam a expressão dos genes de interesse nos três grupos, divididos por seus papéis relacionados a apoptose, proliferação/sobrevivência, ciclo celular e adesão/migração.

**Figura 15** - Análise de expressão diferencial dos genes relacionados com adesão/migração nos grupos controle DMSO, tratamento ruxolitinibe (INC424) 4 horas e 48 horas.



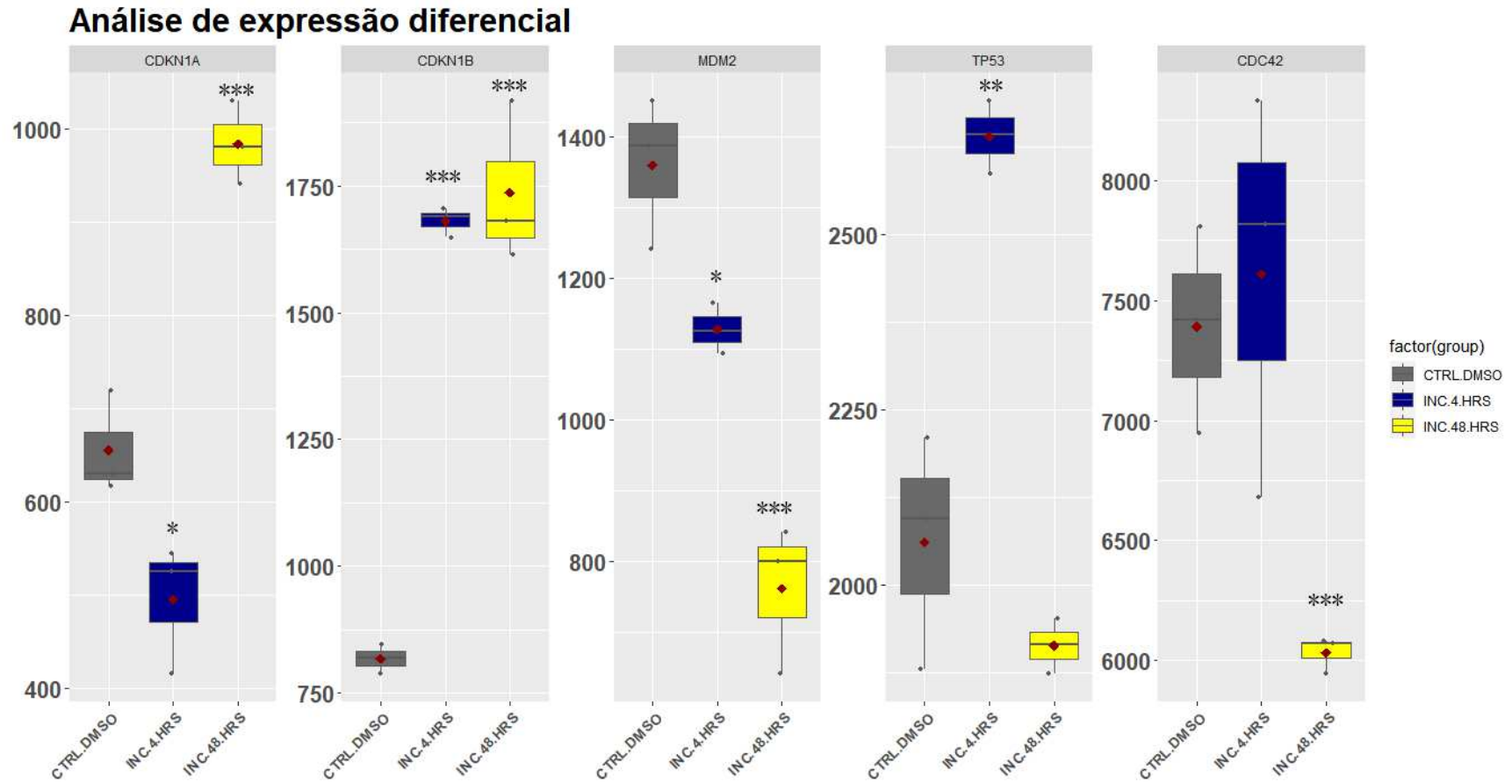
Legenda: \* <0,05; \*\* <0,01; \*\*\*<0,001. Valores significativos entre tratamento 4 horas e 48 horas em comparação ao controle DMSO. CTRL.DMSO: controle positivo; INC.4.HRS: tratamento com inibidor da JAK, ruxolitinibe (INC424) por 4 horas; INC.48.HRS: tratamento com inibidor da JAK, ruxolitinibe (INC424) por 48 horas.

**Figura 16** - Análise de expressão diferencial dos genes relacionados com proliferação/sobrevivência nos grupos controle DMSO, tratamento ruxolitinibe (INC424) 4 horas e 48 horas.



Legenda: \* <0,05; \*\* <0,01; \*\*\*<0,001. Valores significativos entre tratamento 4 horas e 48 horas em comparação ao controle DMSO. CTRL.DMSO: controle positivo; INC.4.HRS: tratamento com inibidor da JAK, ruxolitinibe (INC424) por 4 horas; INC.48.HRS: tratamento com inibidor da JAK, ruxolitinibe (INC424) por 48 horas.

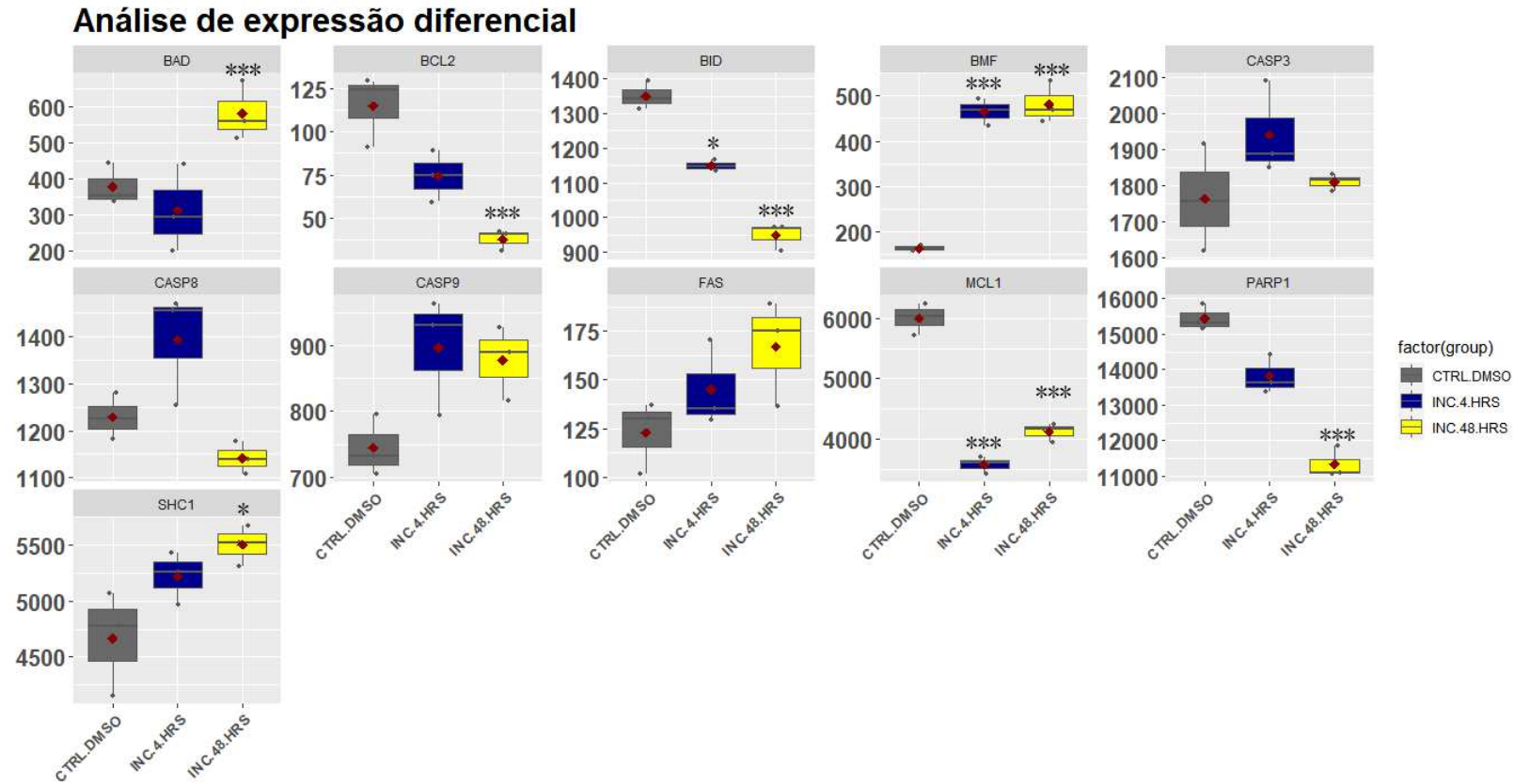
**Figura 17** - Análise de expressão diferencial dos genes relacionados com ciclo celular nos grupos controle DMSO, tratamento ruxolitinibe (INC424) 4 horas e 48 horas.



Legenda: \* <0,05; \*\* <0,01; \*\*\*<0,001. Valores significativos entre tratamento 4 horas e 48 horas em comparação ao controle DMSO. CTRL.DMSO: controle positivo; INC.4.HRS: tratamento com inibidor da JAK, ruxolitinibe (INC424) por 4 horas; INC.48.HRS: tratamento com inibidor da JAK, ruxolitinibe (INC424) por 48 horas.



**Figura 18** - Análise de expressão diferencial dos genes relacionados com a apoptose nos grupos controle DMSO, tratamento ruxolitinibe (INC424) 4 horas e 48 horas.



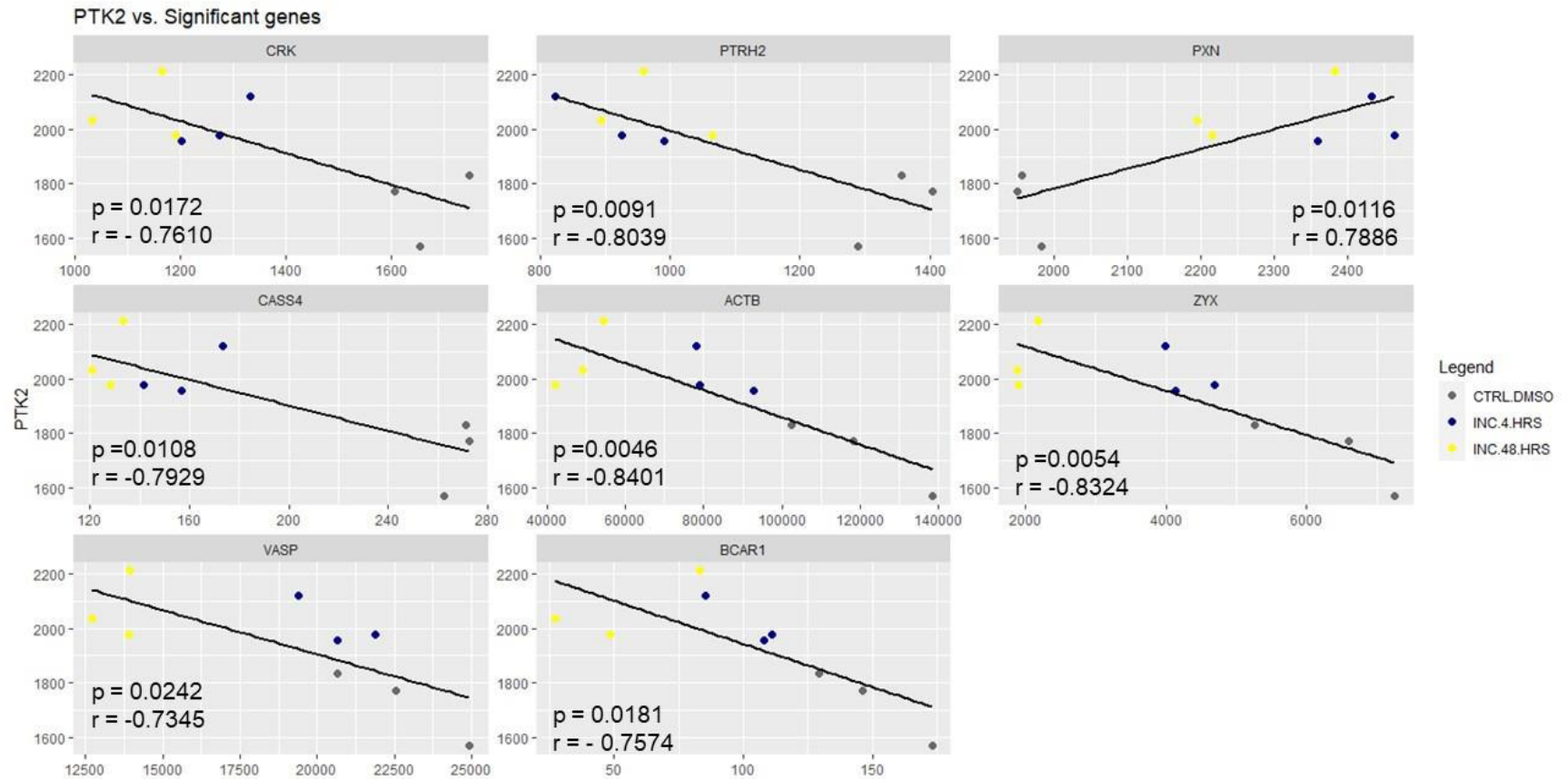
Legenda: \* <0,05; \*\* <0,01; \*\*\*<0,001. Valores significativos entre tratamento 4 horas e 48 horas em comparação ao controle DMSO. CTRL.DMSO: controle positivo; INC.4.HRS: tratamento com inibidor da JAK, ruxolitinibe (INC424) por 4 horas; INC.48.HRS: tratamento com inibidor da JAK, ruxolitinibe (INC424) por 48 horas.

A expressão do gene *PTK2* apresentou-se aumentada no grupo INC 48h comparado ao controle (DMSO) ( $p = 0,012$ ). Da mesma maneira, os genes *PXN*, *SRC*, *TLN1*, *DCC*, *ITPKC*, *FLNA*, *IL12RB2*, *JAK2*, *PTEN*, *STAT5A*, *PIK3IP1*, *SOS1*, *CAPN1*, *CDKN1A*, *CDKN1B*, *BAD*, *BMF* e *SHC1* apresentaram expressão aumentada enquanto os genes *BCL2*, *BID*, *CASS4*, *CRK*, *GRB2*, *KRAS*, *MCL1*, *MDM2*, *MTOR*, *PARP1*, *PTRH2*, *RAP1B*, *STAT1*, *VCL*, *ACTB*, *ZYX*, *VASP*, *CTNNB1*, *BCAR1*, *SMEK1*, *RAC1*, *VAV1*, *HRAS* e *CDC42* apresentaram expressão diminuída após tratamento de 48 horas com INC em comparação ao controle DMSO (Figuras 15 a 18). Comparando o grupo controle DMSO e INC 4h, os genes *CDKN1B*, *BMF*, *PXN*, *STAT5A*, *TP53*, *JAK2*, *PIK3IP1*, *RPTOR*, *SOS1* e *PDK1* tiveram sua expressão aumentada e os genes *CASS4*, *MCL1*, *PTRH2*, *STAT1*, *BID*, *CRK*, *EDIL3*, *ACTB*, *ZYX*, *BCAR1*, *CDKN1A* e *MDM2* mostraram-se com a expressão diminuída. No que concerne à comparação INC 4horas x INC 48 horas os genes *STAT1*, *ZYX*, *RAP1B*, *VASP*, *ACTB*, *PDK1*, *MTOR*, *TP53*, *HRAS*, *KRAS*, *MDM2*, *VAV1*, *VCL*, *PARP1*, *GRB2*, *CDC42*, *FYN*, *RPTOR*, *SMEK1*, *BID*, *CASP8*, *RHOA*, *CTNNB1*, *BCL2*, *BCAR1* e *ROCK1* apresentaram aumento da expressão e os genes *PIK3IP1*, *CDKN1A*, *FLNA*, *STAT5A*, *IL12RB2*, *SOS1*, *JAK2*, *SRC*, *ITPKC*, *MCL1*, *BAD* e *CASP7* diminuíram (Figuras 15 a 18).

### 5.6.3 ANÁLISE DE CORRELAÇÃO

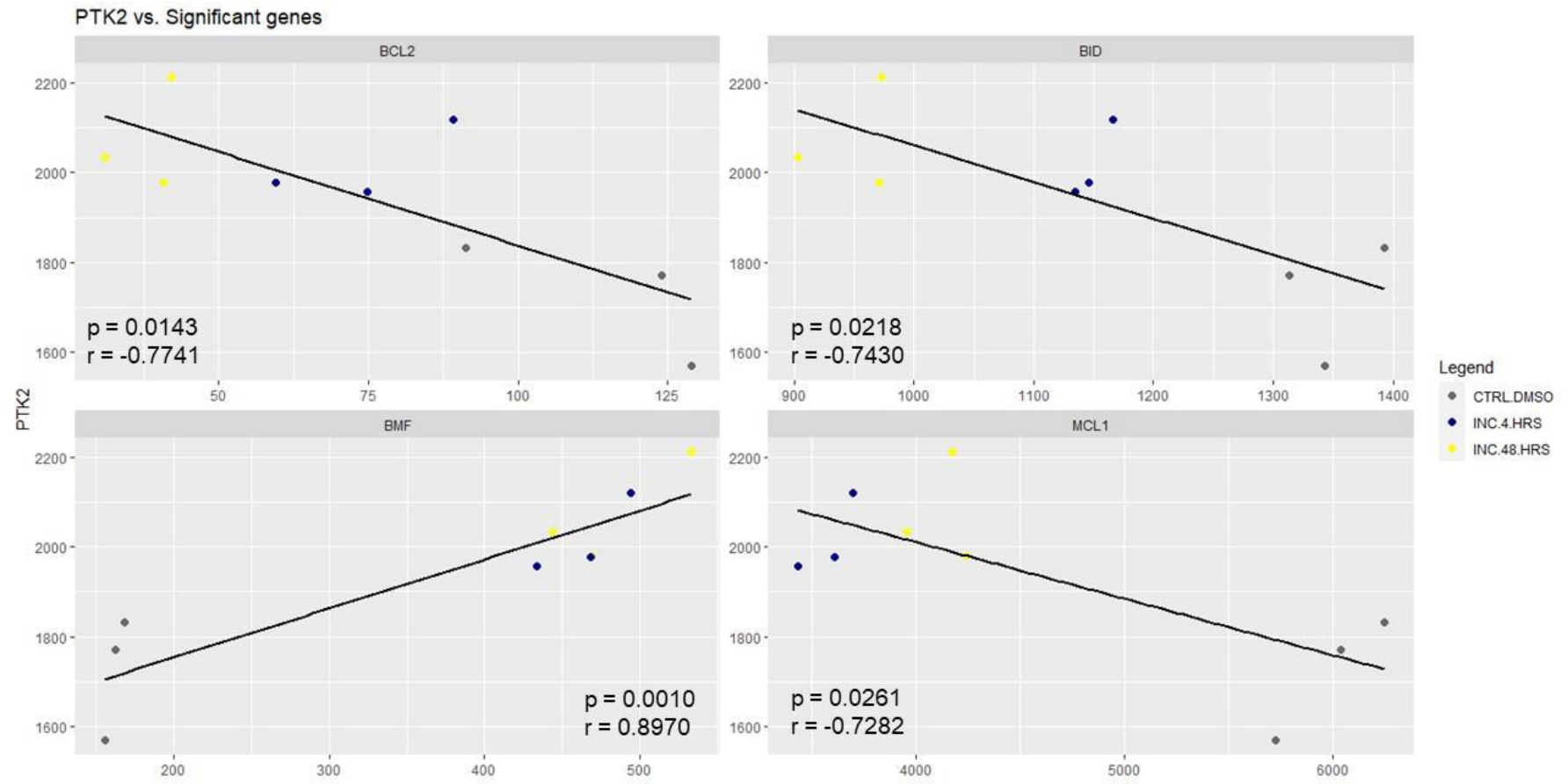
A análise da correlação entre a expressão do gene *PTK2* com os 65 genes selecionados foi feita utilizando-se o teste de Correlação de Pearson e foram plotados os gráficos dos genes que apresentaram significância, separados pelas vias em que suas funções estão relacionadas ( $p < 0,05$ ) (Figura 19).

**Figura 19** - Correlação entre a expressão do gene *PTK2* e os genes *ACTB*, *BCAR1*, *BCL2*, *BID*, *BMF*, *CASS4*, *CDKN1B*, *CRK*, *JAK2*, *MCL1*, *MDM2*, *PIK3P1*, *PTEN*, *PTRH2*, *PXN*, *SOS1*, *STAT1*, *STAT5*, *VASP*, *VAV1* e *ZYX*.

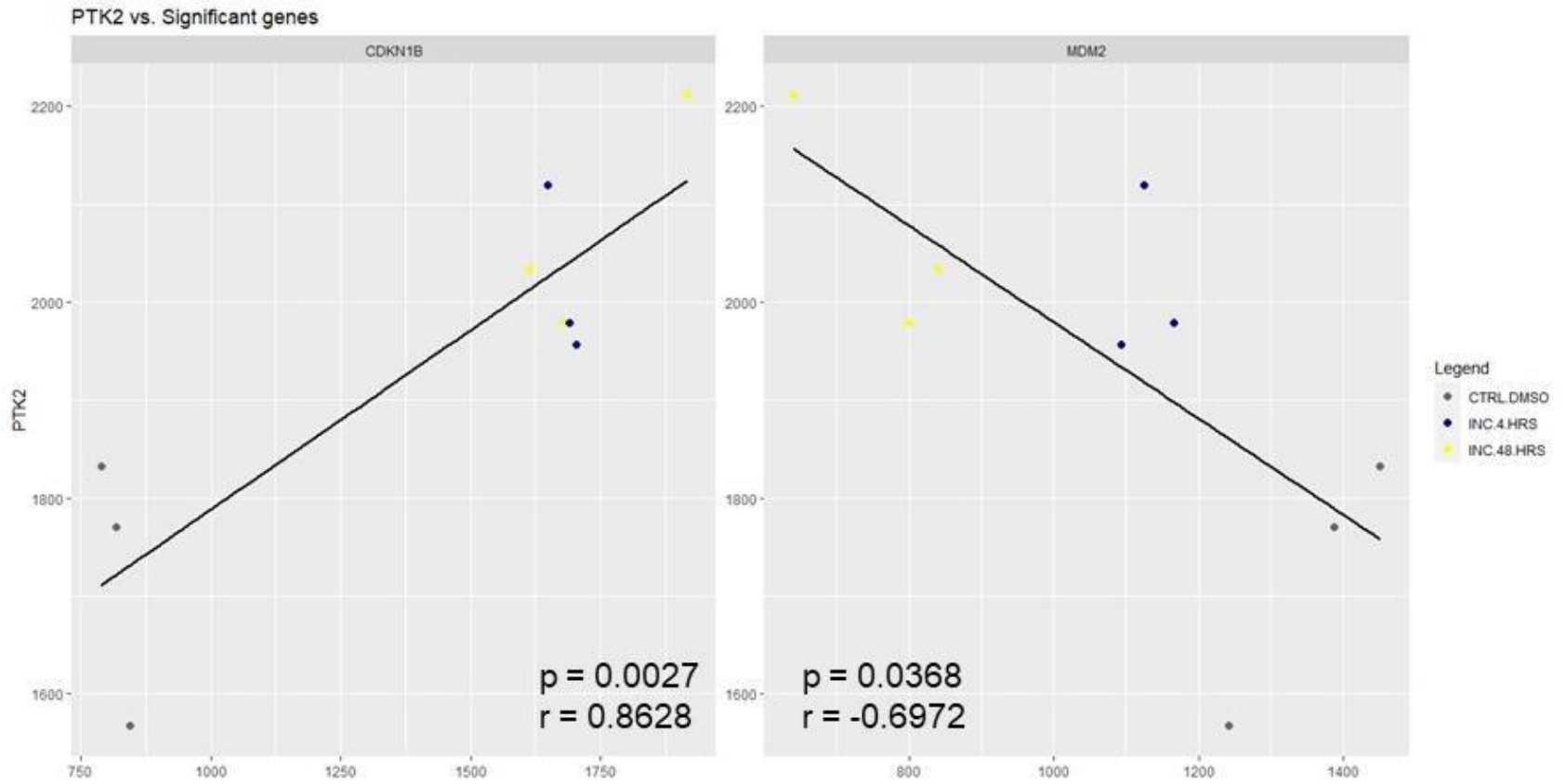


Continua...

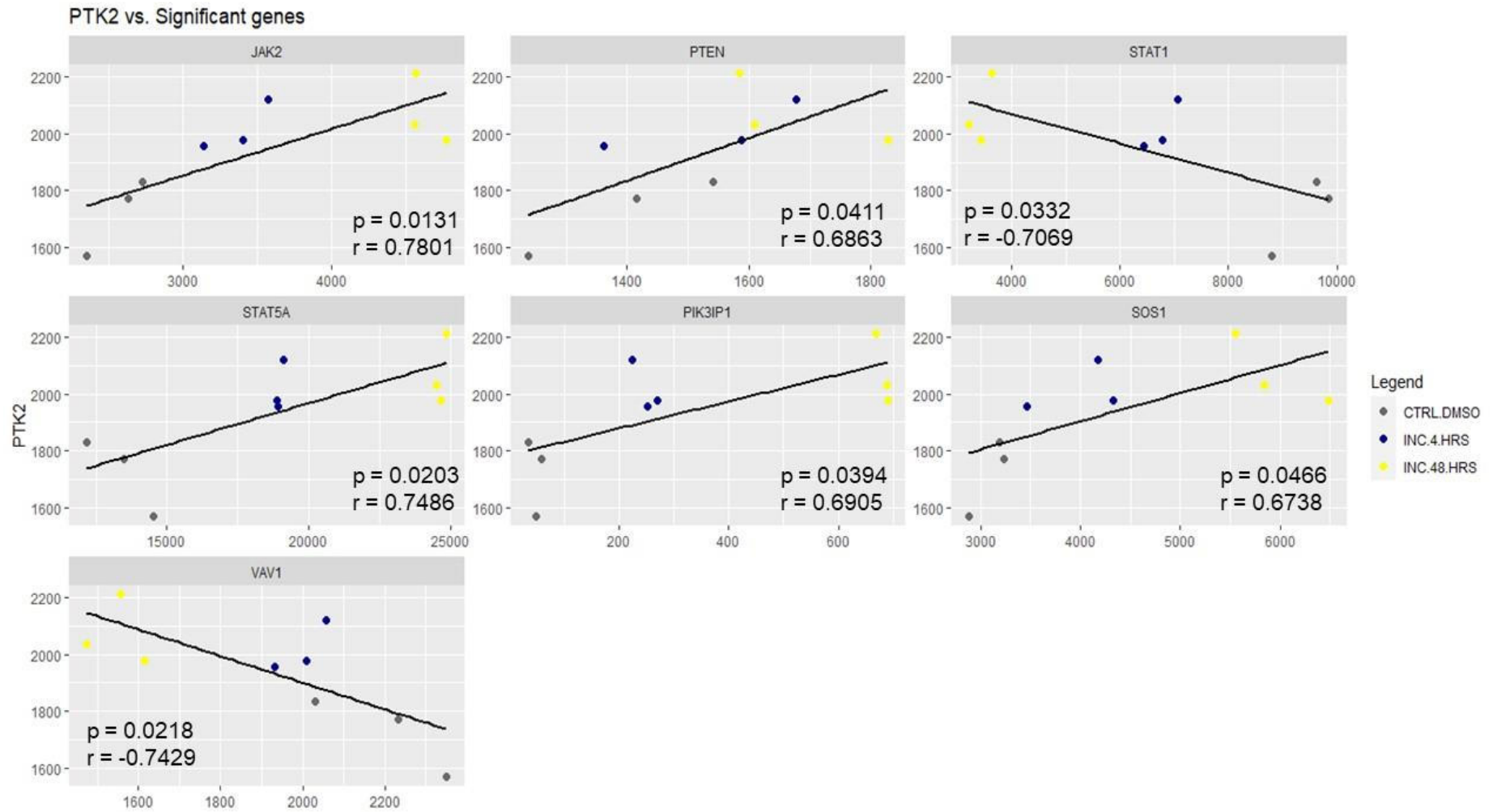
Continuação



Continua...



Continuação



Legenda: p: significância; r: valor da correlação.

O *PTK2* apresentou correlação positiva com o gene *BMF*, pró-apoptótico, com o gene *CDK1NB* que inibe ciclo celular, com o gene da *Paxilina (PXN)* que atua no controle da adesão e migração celular e com os genes da *JAK2*, *PTEN*, *STAT5*, *PIK3P1* e *SOS1* que exercem participam da regulação da proliferação celular.

*PTK2* apresentou correlação negativa com genes anti-apoptóticos *BCL-2* e *MCL1*, com gene *BID* um pró-apoptótico, com o gene *PTRH2* que participa na indução da apoptose por perda de adesão (anoikis), com *ACTB*, *ZYX*, *BCAR1* e *VASP* genes relacionados a adesão e migração celular, com gene *MDM2* que promove degradação de p53 e com genes *CRK*, *CASS4*, *VAV1* e *STAT1*, relacionados com proliferação celular.

A tabela 4 a seguir descreve as interações que ocorrem entre *PTK2* e os 21 genes que apresentaram correlação significativa.

**Tabela 4** - Genes com correlação significativa e suas respectivas relações com o *PTK2*.

<b>Genes</b>	<b>Correlação</b>	<b>Interação</b>
<i>PXN</i>	Positiva	Interação física Participação na mesma via. Predição
<i>JAK2</i>	Positiva	Co- expressão Interação física Predição Domínios de proteína compartilhados
<i>PTEN</i>	Positiva	Interação física Predição
<i>STAT5</i>	Positiva	Co- expressão
<i>PIK3IP1</i>	Positiva	Interação genética
<i>SOS1</i>	Positiva	Interação física Participação de via
<i>BMF</i>	Positiva	Interação genética
<i>CDKN1B</i>	Positiva	Co- expressão
<i>CRK</i>	Negativa	Interação física
<i>PTRH2</i>	Negativa	Participação de via
<i>CASS4</i>	Negativa	Interação física
<i>ACTB</i>	Negativa	Interação física
<i>ZYX</i>	Negativa	Participação de via
<i>VASP</i>	Negativa	Participação de via
<i>BCAR1</i>	Negativa	Co- expressão Interação genética Participação de via



		Interação física
		Predição
<i>STAT1</i>	Negativa	Interação física
		Co- localização
		Predição
<i>VAV1</i>	Negativa	Participação de via
<i>BCL2</i>	Negativa	Interação genética
<i>BID</i>	Negativa	Co- expressão
<i>MCL1</i>	Negativa	Participação de via
<i>MDM2</i>	Negativa	Interação física

Fonte: geneMANIA (<http://www.genemania.org>)

Muitas dessas correlações não podem ser explicadas considerando apenas o papel de cada proteína codificada por esses genes na célula. No entanto, os achados dessas análises abrem a possibilidade de estudar e validar a relação entre essas moléculas e a FAK em células *JAK2V617F* positivas.

## 6 DISCUSSÃO

O entendimento do papel das proteínas FAK e SRC nas NMPC é interessante pois, sabe-se que o complexo FAK-SRC tem envolvimento na adesão, migração, sobrevivência, apoptose e progressão do ciclo celular. FAK-SRC são encontradas ativadas em células tumorais e foram correlacionadas com a metástase e angiogênese tumoral por meio de mecanismos dependentes e independentes de quinase (MITRA, SCHLAEPFER, 2006; SULZMAIER, JEAN, SCHLAEPFER, 2014).

SRC é uma proteína relacionada com a motilidade, apoptose, adesão, controle do ciclo celular, diferenciação celular e transdução de sinal, ela é formada por um domínio SH N-terminal, um domínio SH3, um domínio SH2, um domínio quinase e uma região reguladora C-terminal e tem 60kDa (VENKATA et al., 2016). A FAK, uma tirosina quinase não receptora, participa de eventos de sinalização capazes de regular a sobrevivência, proliferação e migração celular (LV et al., 2018).

As proteínas FAK e SRC podem fosforilar várias proteínas adaptadoras, além de se relacionar com outras vias, elas interagem entre si, formando um complexo

para que elas sejam capazes de exercer suas funções nas células. FAK e SRC interagem por meio dos domínios SH2 e SH3 (VENKATA et al., 2016). Lindfors e colaboradores (2011), sintetizaram peptídeos derivados de FAK (motivos de ligação SH3 e SH2) a fim de compreender a função desses domínios. Eles observaram que para FAK ser ativada tem que ocorrer a interação inicial de SH3 em SRC e posterior SH2 que estabelece uma interação mais forte, juntamente com a auto fosforilação de FAK (LINDFORS et al., 2011). Frolov e colaboradores (2016) relataram que o uso de inibidor da SRC leva uma inibição da fosforilação de tirosina da FAK (FROLOV et al., 2016). Dessa forma, para exercer sua função nas células essas proteínas exercem interação entre elas.

A análise proteica permite elucidar as funções das proteínas em condições normais e patológicas. Na avaliação da interação entre FAK e SRC não foi possível detectar banda referente a SRC no IP, apenas. A ausência da detecção da proteína na amostra do IP pode ser explicada pela baixa quantidade de proteína obtida no processo de extração proteica, influência do tampão de lise, perda de afinidade do anticorpo usado na detecção, tempo curto de incubação, degradação ou perda da proteína no processo ou pode ser devido a não fosforilação prévia da FAK, ficando inativada e assim impossibilitando a interação com SRC (DECAPRIO; KOHL 2017; LINDFORS et al., 2011; VENKATA et al., 2016).

Submeter as células à diferentes concentrações de um determinado composto e avaliar o seu efeito sobre a viabilidade delas em comparação ao controle (não tratados) nos permite avaliar a susceptibilidade das células à diferentes moléculas, sendo possível verificar se existe uma relação entre a dose de um composto e a resposta do ensaio. Com isso, a partir dessa análise de viabilidade em relação ao logaritmo da concentração do inibidor pode-se obter a curva dose-resposta usada para estimar o IC50 do inibidor da FAK (SEBAUGH, 2011; VIS et al., 2016). A determinação do IC50 é uma prática laboratorial comumente empregada que contribui na descoberta de novas drogas por auxiliar na padronização das concentrações dos compostos a serem testados in vitro e prever valores a serem usados em ensaios pré-clínicos. Por essa razão, compreender as fontes de variabilidade e usar métodos padronizados é importante para o desenvolvimento da pesquisa (KALLIOKOSKI et al., 2013; VOLPE; HAMED; ZHANG, 2014). O valor da IC50 do PF-271 na SET-2 foi de 3,1887  $\mu$ M.

No presente estudo foi observada redução da proliferação e da viabilidade após tratamento com o inibidor da FAK, PF-271. Tancioni e colaboradores (2015) avaliaram efeito desse inibidor à 0,1  $\mu\text{M}$  no câncer de mama e revelaram redução da fosforilação de AKT e de uma proteína do complexo mTOR, confirmando que FAK pode estimular a ativação dessa via. PI3K/AKT/mTOR encontra-se frequentemente ativada em vários cânceres e participa de processos de proliferação, angiogênese, metabolismo, diferenciação e sobrevivência (FANG et al., 2013; TANCIONI et al., 2015). O bloqueio dessa via inibe a proliferação in vitro de células-tronco do câncer colorretal (AOKI; FUJISHITA, 2017; FANG et al., 2013; XIA; XU, 2015). O uso do PF-271 estabilizou o quadro de pacientes com câncer pancreático, célula escamosa carcinoma e câncer de próstata resistente à castração (INFANTE et al., 2012). Da mesma forma a inibição de FAK com PF-271 diminuiu o crescimento do câncer de tireoide em modelo animal (KESSLER et al., 2016). Stokes e colaboradores (2011) correlacionaram o início do tratamento com PF-271 com a diminuição de macrófagos, proliferação de células tumorais e redução no volume tumoral no câncer pancreático (STOKES et al., 2011). O tratamento com um outro inibidor da FAK (PF-573,228) diminuiu a viabilidade, migração, invasão e adesão do câncer cervical por reverter a regulação positiva da glicoproteína de matriz extracelular FN1 que tem papel importante na diferenciação, crescimento, migração celular e transformação oncogênica, sugerindo participação na via de sinalização da FAK (ZHOU; SHU; HUANG, 2019). A eficácia do PF-271 na inibição da proliferação de tumores sólidos em modelos animais foi demonstrada por estudos que relataram que o crescimento do tumor e a capacidade do tumor de se recuperar foram afetados após tratamento (BAGI; ROBERTS; ANDRESEN, 2008; ROBERTS et al., 2008; SLACK-DAVIS et al., 2009). O efeito dos inibidores na viabilidade se dá pelo envolvimento dessas proteínas na ativação de vias a jusante relacionada a sobrevivência celular (CHO et al., 2018; GUO et al, 2020; SAJADIMAJD et al., 2020; TANCIONI et al., 2015; ZHAO; GUAN, 2011; ZHOU; SHU; HUANG, 2019).

O efeito do ruxolitinibe na diminuição da proliferação já é conhecido visto que foi desenvolvido para inibir seletivamente a tirosina quinase JAK, mais especificamente JAK1 e JAK2, pois esta tirosina quinase apresenta a mutação V617F, responsável pela ativação constitutiva da mesma e consequente ativação do transdutor de sinal e ativador da transcrição denominado STAT e vias à jusante, desregulando a expressão de genes relacionados à proliferação e morte celular (XIN et al., 2020). De

forma semelhante, a fosforilação de FAK também leva à ativação de STAT3 (CHO et al., 2018; JOHNSON; O'KEEFE; GRANDIS, 2018). Nossos resultados demonstram que a inibição da JAK levou a diminuição da fosforilação de SRC. É conhecido que SRC é capaz de fosforilar JAK2, estando localizada à montante dela (LIU; ZHOU; LI, 2018). Além disso, as quinases da família SRC juntamente a JAK ativam vias de sinalização intracelulares, incluindo a fosforilação de STAT (SZILVESZTER; NÉMETH; MÓCSAI, 2019; TUNDWAL; ALAM, 2012).

De maneira promissora, no presente estudo, o inibidor da FAK nas concentrações 5  $\mu$ M, 10  $\mu$ M, 25  $\mu$ M e 50  $\mu$ M, apresentou efeito bem semelhante ao ruxolitinibe na concentração de 300 nM na linhagem celular SET-2, sugerindo assim participação da FAK na sobrevivência dessas células.

A verificação e quantificação da apoptose pode ser feita por diversas técnicas. A identificação de alterações da morfologia nuclear por ensaio de Marcadores de DNA (DAPI), avaliação de modificações na composição da membrana (externalização da fosfatidilserina) através da detecção de Anexina V por citometria de fluxo e a detecção de caspases ativas e de produtos de clivagem de caspases como PARP clivada (PARPc) e caspase 3 clivada por técnica de WB são exemplos (PALMA, 2005).

A detecção de PARPc e Caspase 3 clivada nos tratamentos realizados indicam que a inibição da FAK tem efeito na apoptose das células SET-2. Zhou, Shu e Huang (2019) demonstraram que o tratamento com inibidor da FAK (PF573,228) diminuiu a expressão da proteína BCL-2 e aumentou a expressão de BAX e Caspase-3 clivada contribuindo para o entendimento que a superexpressão de FAK inibe a apoptose em células cancerosas, possivelmente, por também atuar nas vias PI3K/AKT (ZHOU; SHU; HUANG, 2019).

Os resultados do WB corroboram com os resultados dos ensaios de viabilidade e proliferação, pois como discutido anteriormente, há indícios da participação da FAK na proliferação e resistência à apoptose nessas células. Em concordância com os resultados apresentados, a FAK já foi descrita como relacionada com proteínas envolvidas em processos apoptóticos, proliferativos e de ciclo celular, como BCL2, STATs, AKT, mTOR, P53, ciclinas, ou seja, participando das mesmas vias através da regulação da atividade dessas vias (BACHS *et al.*, 2018; GOLUBOVSKAYA; CANCE, 2011; SULZMAIER; JEAN; SCHLAEPFER, 2014)

Zhu e colaboradores (2021), sugerem que AKT pode atuar como um fator a jusante da FAK, pois ao inibir FAK com PF-562,271 inibiu os níveis basais e de fosforilação de AKT (ZHU et al., 2021). A via de sinalização FAK/AKT se correlaciona com a proliferação e metástase celular (XU; ZHANG, 2021; QIAO et al., 2021). A FAK atua na proliferação do câncer por regulação do ciclo celular, Canel e colaboradores (2017) identificaram atraso na fase G1 do ciclo celular em células tumorais que houve deleção da FAK (CANEL et al., 2017; ZHANG et al., 2019). A proteína ciclo de divisão celular 42 (Cdc42) e a proteína quinase B (Akt) são ativadas por FAK (VAN NIMWEGEN; VAN DE WATER, 2007).

Portanto, a redução da proliferação das células da linhagem SET-2 pode ser decorrente da diminuição da ativação de vias como PI3K/AKT, mTOR e outras vias de bastante importância para a proliferação de neoplasias mieloides (GUO et al, 2020; NEPSTAD et al., 2020).

Ainda com a finalidade de avaliar o papel da FAK nas NMPC, de maneira interessante, os resultados *in silico* proporcionaram informações adicionais.

Utilizou-se um banco de dados na qual foi feito o sequenciamento do transcriptoma (RNAseq), técnica eficaz na análise de genes diferencialmente expressos. Essa técnica fornece dados para avaliar alterações na expressão gênica em condições patológicas ou sobre influência de tratamentos (COSTA-SILVA; DOMINGUES; LOPES, 2017). O RNAseq é uma técnica capaz de analisar dezenas de amostras através do mapeamento de leitura sendo que seus resultados são trabalhados por meio da bioinformática e, dentre as diversas etapas, as contagens dos níveis de expressão são normalizadas (BARKAS et al., 2019; COSTA-SILVA; DOMINGUES; LOPES, 2017; GE; SON; YAO, 2018).

O DESeq2, método utilizado para realizar a análise de expressão diferencial, é adequado para experimentos com grande número de amostras, estudos com poucas réplicas e pode ser usado para amostras de RNAseq (GE; SON; YAO, 2018; LOVE, HUBER, ANDERS, 2014). Ele apresenta boa precisão, exatidão e sensibilidade quando comparado com resultados obtidos pelo qPCR (COSTA SILVA, DOMINGUES, LOPES, 2017; LOVE, HUBER, ANDERS, 2014).

Meyer e colaboradores (2015) analisaram a expressão de 25084 genes e investigaram se a alteração na expressão de genes que participam da sobrevivência celular apresenta relação com a persistência das células após tratamento com

inibidor da JAK, ruxolitinibe (MEYER et al., 2015). A partir da análise de expressão gênica desse banco de dados, Lima, Lopes e Machado-neto (2021) conseguiram demonstrar que o tratamento com ruxolitinibe também tem impacto na expressão de genes relacionados à sinalização redox (LIMA; LOPES; MACHADO-NETO, 2021). No presente estudo observamos uma possível modulação na expressão de genes envolvidos no processo de adesão e migração celular após tratamento com INC424 (ruxolitinibe). Serão abordados a seguir, na discussão, os genes que apresentaram expressão diferencial significativa entre os grupos controle DMSO e INC 48h.

Proteínas que participam de vias relacionadas à adesão/migração, proliferação/sobrevivência, ciclo celular e apoptose exercem papéis no estabelecimento e desenvolvimento das neoplasias (HAMIDI, IVASKA, 2018; ZHAO, GUAN, 2011; CHANG et al., 2020; PARK, PYUN, PARK, 2020; ZHANG et al., 2018; KNUDSEN et al., 2019; PISTRITTO et al., 2016).

As proteínas de adesão celular participam na progressão do câncer e na metástase, devido a possibilidade de sofrerem alterações em um microambiente tumoral. Alterações na expressão de moléculas de adesão e seus ligantes afetam a evasão imune e a metástase pois, as interações célula-célula e célula-matriz modulam a proliferação, a diferenciação, a sobrevivência e a migração da célula (LÄUBLI; BORSIG, 2019; SOUSA; PEREIRA; PAREDES, 2019; ZHAO, GUAN, 2011). A participação de proteínas de adesão nesses processos pode ser fundamentada no entendimento da anoikis, morte celular apoptótica que ocorre por perda de interações entre a célula e matriz extracelular (AYLA; KARAHÜSEYINOGLUC, 2019; CAO; LIVAS; KYPRIANOU, 2016). A morte celular por interações célula-célula e célula-matriz (anoikis) ocorre por meio da via intrínseca e extrínseca da apoptose, na qual culmina na ativação de caspases e fragmentação do DNA. As caspases atuam clivando moléculas de adesão como FAK, Cas e PXN, acarretando na perda da arquitetura de adesão focal e consequentemente do sinal de sobrevivência. Além disso, a clivagem de moléculas de adesão bloqueia o ciclo celular, como a clivagem de p130Cas regulador da transcrição do p21 (TADDEI et al., 2012). As células tumorais adquirem capacidade de resistir a esse processo de morte, sendo contribuinte para invasão e metástase de diversos tipos de cânceres (AYLA; KARAHÜSEYINOGLUC, 2019; CAO; LIVAS; KYPRIANOU, 2016; WANG et al., 2018).

De modo curioso, os genes *PTK2*, *PXN*, *SRC*, *TLN1*, *DCC*, *ITPKC*, *FLNA*, *CRK*, *PTRH2*, *VCL1*, *CASS4*, *ACTB*, *ZYX*, *VASP*, *CTNNB1* e *BCAR1*, que codificam as proteínas relacionadas aos processos de adesão e migração celular, se apresentaram significativamente aumentados ou diminuídos após tratamento com o inibidor da JAK, quando comparados entre grupo controle e INC48h (CANER; ASIK; OZOPOLAT, 2021; CHEN et al., 2020; FANG et al., 2021; NOH et al., 2021; WU et al., 2020; YI et al., 2021; YOU et al., 2020).

O gene *PTK2*, codificador da proteína FAK, apresentou aumento da expressão após o tratamento com o inibidor da JAK (INC 48h), o que não era esperado visto que a FAK, assim como a SRC, participa também de vias que promovem proliferação. No entanto, analisando no contexto de migração celular, parece existir uma regulação positiva de genes que favorecem a migração celular após o tratamento com o inibidor da JAK na linhagem SET-2 por 48 horas. Ainda há poucos relatos sobre a relação de *PTK2* e *JAK2*, bem como com outros genes envolvidos na migração/adesão celular. Um estudo avaliou o papel do IFN $\gamma$  em controlar o potencial invasivo de sinoviócitos semelhantes a fibroblastos. E ele demonstrou uma relação da JAK2 na atividade da FAK pois o IFN $\gamma$  induziu a fosforilação de FAK na tirosina na posição 925, ao inibir JAK2 por *knockdown* com pequeno RNA houve a supressão da ativação da FAK (KARONITSCH et al., 2018).

A PAXILINA, codificada pelo gene *PXN*, é uma proteína que é fosforilada após a ativação de FAK e SRC pelas integrinas e, então, recruta moléculas estruturais e de sinalização aumentando a movimentação e migração, ela também tem participação no anoikis (LÓPEZ-COLOMÉ et al., 2017; TADDEI et al., 2012). A proteína Talina, codificada pelo gene *TLN1*, participa do eixo PTK2-PXN-VCL, aumentando migração e já foi mostrada como envolvida no desenvolvimento de câncer gástrico (YAN et al, 2020). Ambos genes *PXN* e *TLN1* apresentaram aumento da sua expressão após inibição da JAK2.

O gene *DCC* codifica a proteína conhecida como supressor de câncer colorretal ou receptor Netrin DCC. Essa proteína participa do processo de migração das células e da hematopoese normal e foi mostrado que sua desregulação pode contribuir para a patogênese da LMA e SMD (INOKUCHI et al., 1996; HEDRICK et al., 1994). O gene *FLNA* codifica a proteína filamina, ela serve também como andaime para proteínas de sinalização, como as tirosinas quinases. A mutação nesse gene interfere na linhagem megacariocítica, alterando a produção de plaquetas, o que

aumenta o risco de trombose (ROSA, RASLOVA, BRYCKAERT, 2019). Há uma interação entre as proteínas *FLNA* e *JAK2*, na regulação do citoesqueleto de actina e motilidade celular por ativação da prolactina, na qual há formação do complexo *JAK2-PAK1-FLNa* (RIDER, DIAKONOVA, 2011). A expressão desses genes foi aumentada após inibição da *JAK2*.

O gene *PTRH2* codifica a proteína Peptidil-tRNA hidrolase 2 e participa da regulação da adesão celular e anoikis (morte celular induzida por perda de adesão). Quando a célula está aderida à matriz extracelular, a proteína *PTRH2* se complexa com *FAK* na membrana e promove ativação das vias *PI3K/AKT* e *ERK* e aumenta a expressão de *BCL-2*. Quando a célula aderente perde a adesão, ou seja, perde a sinalização das integrinas, a proteína *PTRH2* passa a interagir com outras proteínas levando a anoikis. Um estudo demonstrou que o knockdown de *PTRH2* em células aderentes diminui a ativação da via *PI3K/AKT* e a expressão de *BCL-2* (CORPUZ; RAMOS; MATTER, 2020).

Observamos que o tratamento em maior tempo com inibidor da *JAK2* modulou a expressão de proteínas de adesão, positivamente principalmente, levando a indagar o papel dessa via na sobrevivência dessas células. Alguns pacientes tratados com ruxolitinibe apresentam refratariedade ao tratamento após um tempo. A investigação de formas de resistência e refratariedade ao tratamento se faz necessária e adicionalmente aos resultados obtidos, traz possibilidades da avaliação do papel desses genes nesse processo. Complexos de adesão focal, interação célula e matriz extracelular demonstraram contribuir para resistência das células tumorais à radiação e quimioterapia, por exemplo a interação de *FAK* com coractina, um modulador da actina tem efeito sobre a resistência à radiação. Relacionando *FAK*, integrinas e moléculas de adesão à resistência à tratamentos contra o câncer (EKE; CORDES, 2015). Outro fator importante, relacionado a fisiopatologia das NMPC, na qual as moléculas de adesão podem estar relacionadas é na hematopoese extramedular (CHERNAK; RAMPAL, 2021). As moléculas de adesão medeiam a ligação de células precursoras da medula aos componentes da matriz extracelular, dessa forma a expressão dessas moléculas em células neoplásicas podem determinar sua localização e capacidade de migração (CHERNAK; RAMPAL, 2021).

Os genes avaliados nesse trabalho relacionados com os processos de proliferação e sobrevivência celular, apresentaram diferença significativa na



expressão no grupo INC48h em relação ao controle, sendo eles *IL12RB2*, *JAK2*, *PTEN*, *STAT5A*, *PIK3P1*, *SOS1*, *CAPN1*, *GRB2*, *KRAS*, *MTOR*, *STAT1*, *RAP1B*, *SMEK1*, *RAC1*, *VAV1* e *HRAS* (EDIRIWEERA; TENNEKON; SAMARAKOON, 2019; FRANKE *et al.*, 2020; IJAZ *et al.*, 2018; TORNILLO; DEFILIPPI; CABODI, 2014; UPRETY; ADJEI, 2020; WANG *et al.*, 2019; ZHANG *et al.*, 2020).

Os genes da *JAK2* e da *STAT5* apresentaram aumento da expressão após o tratamento INC 48h. Este trabalho avaliou a expressão de transcritos (RNA) e não a expressão das proteínas, fato este, importante para a interpretação dos resultados, pois os efeitos celulares não dependem apenas do número de transcritos, mas também dos processos pós transcricionais, como adições químicas que influenciam no dobramento e função do RNA, bem como na sua tradução para que então a proteína possa ser ativada para exercer sua função (NACHTERGAELE; HE, 2017). Com os resultados apresentados, não é possível afirmar, com certeza, por qual motivo *JAK2* e *STAT5* apresentaram aumento da expressão, mas já é bem estabelecido que o ruxolitinibe atua inibindo a atividade da proteína *JAK2*. Entretanto, há indivíduos que apresentam resistentes ao tratamento com o inibidor da *JAK2* após certo período de uso, sugerindo talvez, que por mecanismo de feedback positivo, ocorra o aumento na expressão gênica de *JAK2* e *STAT5*, o que confere resistência ao tratamento.

A resistência ao tratamento com ruxolitinibe tem sido associada principalmente à perda da capacidade da redução esplênica (HARRISON; SCHAAP; MESA, 2020). Pacientes em uso do ruxolitinibe demonstraram resistência após 2 a 3 anos de terapia. Ainda não há uma explicação exata para a causa da falha do ruxolitinibe, mas alguns estudos correlacionaram com presença de 3 ou mais mutações como em *RAS/CBL*, exposição crônica ao inibidor que leva a uma reativação da sinalização da via *JAK-STAT* por heterodimerização de *JAK2* com outras quinases (HARRISON; SCHAAP; MESA, 2020; TEFFERI, 2021). Novos tratamentos e alvos tem sido estudado como opções para pacientes intolerantes, resistentes e refratários ao ruxolitinibe, por exemplo o fedratinib, outro inibidor de *JAK2*, aprovado pela FDA em 2019, para uso em falhas de ruxolitinibe (TEFFERI, 2021).

Estudos demonstram o comportamento das proteínas *JAK2* e *STAT5* após a inibição da *JAK2*, por exemplo, estudo feito por Andraos e colaboradores (2012) mostrou que ocorre aumento na fosforilação da *JAK2* após exposição de células SET-2 à inibidores da *JAK*, mas a fosforilação de *STAT5* encontrava-se diminuída,

sugerindo diminuição da atividade quinase de JAK2 (ANDRAOS *et al.*, 2021). Em um outro estudo que analisou por WB células SET-2 tratadas com ruxolitinibe, foi detectada diminuição da fosforilação de STAT3 e STAT5, mas STATs total não apresentou diferença significativa (MACHADO-NETO *et al.*, 2020). Nieborowska-Skorska e colaboradores (2017) demonstraram que o ruxolitinibe diminuiu a fosforilação de STAT5 e não STAT5 total (NIEBOROWSKA-SKORSKA *et al.*, 2017). Dessa forma, o ruxolitinibe parece interferir não apenas na atividade proteica, mas também na transcrição desses genes.

A patogênese das NMPC está também relacionada com desregulação de processos inflamatórios, como por exemplo o a expressão e função das citocinas IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-8, VEGF, PDGF, IFNs e TGF-  $\beta$  que estão relacionadas a progressão e prognóstico da doença. Além disso, as plaquetas liberam fatores pró-inflamatórios que funcionam como imunoreguladores relacionados com eventos trombóticos e resultam em piora de doenças, como câncer (MACEDO *et al.*, 2016; REPSOLD; JOUBERT, 2021; WANG; ZUO, 2019). Os megacariócitos displásicos também secretam citocinas inflamatórias que atuam na formação de tecido fibrótico (BAUMEISTER *et al.*, 2021; HERMOUET; BIGOT-CORBEL; GARDIE, 2015).

O gene *IL12RB2* codifica uma subunidade do receptor da interleucina 12 (IL12). A IL12 participa de processos inflamatórios, secretada por células dendríticas e fagócitos, participa da resposta do tipo Th1 e promove a produção de INF- $\gamma$  e atua na imunidade antitumoral (BYRNE-HOFFMAN *et al.*, 2020; MIRLEKAR, PYLAYEVA-GUPTA, 2021). Em um estudo com animais knockout para *IL12RB2*, foi demonstrado que em animais mais velhos foi observado plasmocitoma de linfonodo ou carcinoma de pulmão, sugerindo que o surgimento dos tumores está associado à deficiência de INF- $\gamma$ , devido a falha na sinalização da IL12 (AIROLDI, 2005). Foi demonstrado que no modelo celular para melanoma, as células são capazes de religar a resposta canônica à IL-12 para iniciar a sinalização PI3K-AKT, o que promove a sobrevivência da célula. (BYRNE-HOFFMAN *et al.*, 2020). Além disso, camundongos knock-out para *IL12RB2* apresentam predisposição ao adenocarcinoma de pulmão na qual o polimorfismo desse gene pode estar relacionado ao aumento da suscetibilidade a este tipo de câncer (PRIGIONE *et al.*, 2016). Ativação das NF -  $\kappa$ B e JAK1/STAT1 estimula a produção da citocina IL12 (BAUMEISTER *et al.*, 2021; LUSSANA; RAMBALDI, 2017). Um estudo demonstrou que camundongos knockout STAT3 apresentaram a

secreção reduzida de citocinas bem como a gravidade da doença (LUSSANA; RAMBALDI, 2017). Além disso, há relatos de uma correlação fenotípica direta em PV incluiu níveis de IL-12 com hematócrito (LUSSANA; RAMBALDI, 2017; VAIDYA *et al.*, 2012). Dessa forma, podemos observar que o tratamento com ruxolitinibe pode atuar modulando a secreção e atividade de citocinas ao inibir a atividade de JAK2. Após o tratamento com inibidor da JAK2 houve aumento da expressão desse gene, sugerindo uma ativação da imunidade antitumoral. Diversos estudos têm demonstrado que o processo inflamatório está envolvido na fisiopatologia das NMPC como discutido anteriormente (REPSOLD; JOUBERT, 2021). Todas as células sofrem influência do microambiente tumoral, tanto as com mutações genéticas quanto as sem alterações. Elas secretam citocinas que se relacionam com o perfil clínico e a evolução da doença (BAUMEISTER *et al.*, 2021; WANG; ZUO, 2019). Níveis plasmáticos elevados de IL2R foram correlacionados com piora da sobrevida em pacientes com PMF (BAUMEISTER *et al.*, 2021).

O gene *PTEN* codifica a proteína PTEN, ele regula negativamente a via PI3K/Akt, inibindo a conversão de PIP2 em PIP3. Deleções ou mutações nesse gene estão presentes em diversos cânceres. Mutações foram identificadas com maior frequência na doença residual do câncer de mama triplo negativo, sugerindo resistência ao tratamento quimioterápico, assim também suprimir a via PI3K/PTEN/Akt/mTOR auxiliaria no tratamento das leucemias e outros distúrbios hematopoéticos. (WEIN, LOI, 2017; MCCUBREY *et al.*, 2008). A sua expressão foi aumentada após o tratamento com ruxolitinibe, sugerindo uma regulação negativa da via PI3K/AKT após tratamento, inibindo a proliferação e sobrevivência do modelo células para NMPC.

O gene *SOS1* obteve sua expressão aumentada após tratamento com ruxolitinibe. Esse gene codifica a molécula denominada “Fator de troca de nucleotídeo guanina Son of Sevenless (SOS), ele atua regulando proliferação celular por meio da ativação de Ras, sendo associados no desenvolvimento da fibrose, por regular proliferação e migração de fibroblastos. (FUENTES-CALVO, MARTINEZ-SALGADO, 2021). Entretanto, o *KRAS* e *HRAS*, que são regulados pelo *SOS1*, apresentaram diminuição da expressão gênica. O RAS existe em três isoformas diferentes o K-RAS, H-RAS e N-RAS. A mutação em RAS acarreta na sua ativação constitutiva e está relacionado a tumorigênese. (UPRETY, ADJEI, 2020) Mutações em *RAS* estão

presentes em alguns pacientes com MF e que estão associados a características fenotípicas adversas (COLTRO *et al.*, 2020). Um estudo de bioinformática demonstrou que o inibidor de JAK2 e de FLT3 denominado Fedratinib, poderia ter atividade anticâncer em adenocarcinoma ductal pancreático por, possivelmente, reverter a assinatura gênica orientada por KRAS (LIU, HSIEH, YANG, 2020). RAS e JAK2 se relacionam, pois, a ativação da via ERK2/MAPK, após ligação do hormônio de crescimento (GH) ao receptor que acarreta ativação de JAK2 é dependente de RAS e RAF. (WINSTON; HUNTER; 1995).

Quando analisamos os genes relacionados à apoptose modulado pelo tratamento INC 48h, foi possível observar que os genes anti-apoptóticos *BCL2* e *MCL1* apresentaram expressão diminuída e os genes pro-apoptóticos *BAD*, *BMF* apresentaram expressão aumentada após tratamento com inibidor da JAK, estando coerente com o efeito indutor apoptótico esperado do inibidor da JAK. O estímulo da via JAK/STAT por citocinas levam à regulação positiva de *MCL1* (JOHNSON; O'KEEFE; GRANDIS, 2018). No entanto, o gene *BID*, pro-apoptótico, apresentou expressão diminuída no tratamento INC 48h.

O gene *PARP1*, que codifica a proteína PARP, desempenha função de reparo à danos a fita dupla de DNA e é clivada por caspase no processo apoptótico. Um estudo mostrou que o ruxolitinibe reduz a atividade de moléculas envolvidas no reparo aos danos a fita dupla de DNA e sensibiliza as células a inibidores de PARP em modelo murino, mas não detectaram alteração da expressão da proteína PARP (NIEBOROWSKA-SKORSKA *et al.*, 2017).

O gene *SHC1* teve sua expressão aumentada, é um gene que codifica 3 isoformas de proteínas, a p66, p52 e p46. O aumento de sua expressão está relacionado a carcinogênese. Ele atua na via como Ras-ERK e o aumento do p66 foi associado a promoção da apoptose induzida por estresse (SHIH *et al.*, 2012). SHC se liga a JAK2 ativada por IL6 (GIORDANO *et al.*, 1997).

Além da modulação de genes envolvidos nas vias relacionadas à migração, proliferação e apoptose, o tratamento com o inibidor da JAK também levou ao aumento da expressão dos genes *CDKN1A* e *CDKN1B* que inibem o ciclo celular e, dessa forma, podem diminuir a proliferação celular.

O tratamento com ruxolitinibe resultou na diminuição da expressão de *MDM2* e *CDC42*. *CDC42* é uma proteína envolvida na regulação do ciclo celular. A citocina IL6 capaz de ativar JAK2, ocasiona também a rápida ativação de *CDC42*, foi demonstrado que a perda de JAK2 ou de STAT3 impediu a ativação de *CDC42*, indicando que IL6 ativa *CDC42* por meio da ativação de JAK2 e STAT3 (RAZIDLO, BURTON, MCNIVEN, 2018). Esses resultados evidenciam uma interação entre a atividade de JAK2 e *CDC42*, na qual alteração da JAK2 pode influenciar na atividade de *CDC42* e até mesmo na expressão do seu gene, na qual apresentou expressão diminuída após tratamento com inibidor da JAK2, ruxolitinibe.

A proteína MDM2 é um regulador negativo supressor tumoral p53. MDM2 encontra-se superexpresso em vários cânceres. A expressão de MDM2 é regulada positivamente em vários cânceres (OLINER; SAIKI; CAENEPEEL, 2016; WANG W. *et al.*, 2020). Estudos mostraram o aumento de *MDM2* em células positivas para *JAK2V617F*, em pacientes com PV apresentaram aumento de p-MDM2 (ESKANDARI *et al.*, 2021; TOGNON *et al.*, 2020). A mutação de JAK2 afeta a resposta de p53 por aumentar o mRNA de MDM2, ocasionando a degradação de p53. Sua inativação está relacionada a progressão da doença (NAKATAKE *et al.*, 2012). O bloqueio da atividade de MDM2 favorece as células NMPC CD34+ a morte celular programada, além de melhorar a eficácia de tratamentos, como do IFN-alfa (LU *et al.*, 2014; KARANTANOS; MOLITERNO, 2018).

Portanto, de modo geral, é possível observar que o inibidor da JAK diminuiu a expressão de genes envolvidos na apoptose como PARP1 e os anti-apoptóticos importantes como *BCL-2* e *MCL-1*, assim como aumentou a expressão de *PTEN*, que regula inibindo a via PI3K-AKT. O tratamento diminuiu a expressão de *MDM-2*, que promove degradação da P53, e aumentou a expressão de *CDKN1A* e *CDKN1B*, que inibem ciclo celular, levando a célula a diminuir a proliferação e entrar em apoptose. De modo intrigante, o tratamento com o inibidor da JAK por 48h levou ao aumento da expressão dos genes que codificam *FAK* e *SRC*, o que não era esperado visto que *FAK* e *SRC* atuam promovendo proliferação e diminuindo apoptose ao ativar vias como PI3K-AKT e promover degradação de P53. Mas, observando o aumento da expressão dos genes da *Paxilina (PXN)*, da *Talina (TLN1)*, *DCC* e *FLNA*, que promovem migração, é possível sugerir que a inibição da JAK2 leva a uma regulação positiva da expressão de genes de adesão e migração celular. Vale ressaltar que foi

avaliada a expressão desses genes em células SET-2 tratadas e não tratadas, não foi feita comparação com grupo de células normais, então, nas células já havia uma desregulação da expressão gênica por ser uma célula neoplásica, com presença da mutação em *JAK2* e outros mecanismos fisiopatológicos. A comparação com células normais é interessante para o entendimento do comportamento da alteração da expressão desses genes, como também a comparação na expressão desses genes em células de pacientes e indivíduos saudáveis.

Adicionalmente, a análise de correlação nos permitiu avaliar o comportamento dos genes em relação ao *PTK2*. Ressalta-se que análises de correlações não implicam em causalidade, mas é interessante tentar entender como esses genes se relacionam nas vias. Além disso, muito dessas correlações decorrem do efeito do tratamento, como fica evidente nos gráficos.

Como abordado na discussão do tópico anterior, *PTK2* e *PXN* estão envolvidas em processo de migração e crescimento celular, na qual a proteína *PXN* é fosforilada pela *FAK* e *SRC* após interação com integrinas, fazendo sentido a correlação positiva encontrada nesta análise. Por sua vez, *CRK* apresentou correlação negativa com *PTK2*, com base na literatura não conseguimos explicar essa correlação considerando as funções dessas proteínas. Um estudo demonstrou que as proteínas da família *CRK* aumentam a sinalização *FAK/SRC* nas vias de adesão focal e a deficiência de *CRK* em linhagens celulares de câncer colorretal levou à diminuição da fosforilação de *FAK/SRC* (FRANKE *et al.*, 2020). O mesmo acontece com o gene *CASS4* a respeito da correlação, sabe-se que ele interage fisicamente com a região rica em prolina da *FAK* e regula sua atividade (BATEMAN *et al.*, 2021).

A análise de correlação entre *PTK2* e *PTRH2* resultou em uma correlação negativa, que pode ter sido influenciada pelo fato do tratamento com o inibidor da *JAK* ter reduzido a expressão de *PTRH2*. Assim como discutido anteriormente, *PTRH2* participa de vias de sinalização envolvidas na sobrevivência, crescimento, diferenciação e adesão celular, modulando a sinalização de *PI3K/AKT* e *ERK* e a expressão de *BCL2*. Ele apresenta papel no estabelecimento de em alguns cânceres, como mama, pulmão e esôfago (CORPUZ; RAMOS; MATTER, 2020).

O gene *ACTB* codifica a beta-actina, uma das isoformas existentes de actina. A actina tem papel na adesão, motilidade, estrutura celular, mitose e meiose. (PARKER, BABOOLAL, PECKHAM, 2020). A beta-actina exerce papel,

principalmente na contração e adesão celular (DUGINA, SHAGIEVA, KOPNIN, 2019; PARKER, BABOOLAL, PECKHAM, 2020). Mutações nesse gene estão envolvidas em diversas patologias, como deficiência intelectual, perda auditiva, defeitos cardíacos e renais e mais recentemente associadas a distúrbios hemorrágicos, e está expressa anormalmente em vários cânceres alterando o citoesqueleto celular afetando a invasividade e na capacidade de metastatase do tumor (GU *et al.*, 2021; PARKER, BABOOLAL, PECKHAM, 2020). O gene *ACTB* apresentou correlação negativa com o *PTK2*. A FAK, proteína codificada pelo *PTK2*, interage diretamente com lipídios de membrana específicos e proteínas conectoras que ligam adesões focais ao citoesqueleto de actina (MALIK-SHERIFF *et al.*, 2018; TAPIAL MARTÍNEZ, LÓPEZ NAVAJAS, LIETH, 2020). Estudo avaliando a expressão gênica, com base em conjunto de dados do *omnibus*, demonstrou que além do seu envolvimento na infiltração de células imunes e na invasão celular, a FAK está relacionada com a função da *ACTB* (GU *et al.*, 2021). Além disso, a via da FAK regula a polimerização da actina em espermatozoides, corroborando com o fato da FAK está relacionada com a função da actina (SALGADO-LUCIO *et al.*, 2020).

O gene *ZYX* codifica a proteína Zyxin, assim como a FAK, ela Zyxin e a proteína estimulada por vasodilatador (*VASP*) atuam na camada superior de formação de complexos das adesões focais (LEGERSTEE, HOUTSMULLER, 2021). As adesões focais ancoram as fibras de actina contráteis com a matriz extracelular (MALIK-SHERIFF *et al.*, 2018). Tanto *ZYX* e *VASP* apresentaram correlação negativa com *PTK2*. Um estudo demonstrou interação entre FAK e Zyxin por co-imunoprecipitação, além disso, o silenciamento do gene diminuiu significativamente a migração celular e as capacidades de invasão das células e o Zyxin pode regular vias de sinalização que estão relacionadas ao câncer (NGUYEN *et al.*, 2019). *VASP* é necessária para a sinalização de  $\beta$ 1-integrina-FAK-YAP1/TAZ mediada pela matriz extracelular em células cancerígenas gastrointestinais e suas metástases hepáticas, pois o knockdown de *VASP* suprimiu a fosforilação de FAK. Essa via de sinalização está relacionada com sobrevivência e migração de células do câncer (XIANG *et al.*, 2018). Demonstrando assim uma relação direta entre *VASP* e *PTK2*.

O gene *BCAR1* codifica a proteína 1 de resistência ao estrogênio contra o câncer de mama, ele apresentou correlação negativa com o *PTK2*. Essa proteína está envolvida no aumento da invasão de células do câncer, bem como a FAK, ao se ligar ao TP53 mutante de modo dependente das quinases da família SRC (GUO *et al.*,

2021). Além disso, BCAR1/p130Cas apresenta papel na imunoevasão de células tumorais circulantes invasivas no adenocarcinoma de pulmão (MAO *et al.*, 2021). A fosforilação de P130Cas/BCAR1 é dependente de FAK e SRC (COWELL *et al.*, 2006). Com isso, nota-se que a atividade de BCAR1 está relacionada com FAK.

As STATs são fatores de transcrição ativadas principalmente pela via JAK/STAT, atuam em nível nuclear na transcrição de genes relacionados à apoptose, proliferação e sobrevivência celular (OWEM; BROCKWELL; PARKER, 2019; PERNER *et al.*, 2019; SUBRAMANIAM *et al.*, 2020). Estudos demonstram relação entre FAK/SRC e STAT (CHO *et al.*, 2018; WANG D *et al.*, 2020).

Ao analisar a correlação entre FAK e JAK, foi encontrada uma correlação positiva. Sabe-se que a ativação de um mesmo receptor de citocina ou de fator de crescimento podem levar a ativação tanto de FAK quanto de JAK2 na célula, sendo que em um estudo foi observado que o bloqueio da atividade de um fator de crescimento diminuiu a fosforilação de JAK2, STAT3, FAK e PXN (RYU *et al.*, 2000), demonstrando assim que *JAK2* e *PTK2* participam de vias em comum.

O gene *PTK2* mostrou correlação positiva com o gene *PTEN*. PTEN atua inibindo a conversão de PIP2 em PIP3, que participam na via PI3K/AKT, envolvida na proliferação celular (CHEN *et al.*, 2018; KANEHISA *et al.*, 2021). Diferentemente do resultado encontrado na presente análise, a expressão de mRNA de PTEN e FAK apresentaram correlação negativa em um estudo com mieloma múltiplo (WANG *et al.*, 2012).

*PIK3IP1*, codifica a proteína 1 que interage com a fosfoinositida-3-cinase, que é uma enzima. Não há relatos de uma relação direta com FAK, mas participa de vias em comum com *PTK2*. Essa proteína exerce papel supressor da via PI3K/Akt/mTOR. Ras suprime a atividade de PIK3IP1 que mantém a via PI3K ativada em células cancerígenas (LEE *et al.*, 2020; OTTENS *et al.*, 2020). SOS1, como discutido anteriormente, participa da proliferação celular, é uma proteína chave na sinalização intracelular, atuando na transdução de sinal (FUENTES-CALVO, MARTINEZ-SALGADO, 2021; HAO *et al.*, 2018). Um estudo demonstra que o complexo FAK/p52 Shc ligou-se SOS1 (WU *et al.*, 2016). Ainda não há descrição da atividade de VAV1 envolvida com FAK, é uma proteína que participa no desenvolvimento, ativação, proliferação e função das células T, com isso, está envolvida no desenvolvimento de doenças autoimunes, câncer e outras condições clínicas (ZHANG, CHEN, 2018).



No final das vias PI3K/AKT e adesão focal há participação de BCL2, sua ativação promove a sobrevivência celular por meio da inibição da apoptose (KANEHISA et al., 2021). FAK também participa dessas vias, dessa forma, há constatando participação de ambas as proteínas nas mesmas vias de sinalização.

BID é uma proteína que promove a apoptose por meio da permeabilização da membrana da mitocôndria, ela é clivada por caspases e interage com BAX e BCL2 para exercer sua função na célula (DEBERNARDI et al., 2018; EDLICH, 2018). Do mesmo modo, BMF é uma proteína pró apoptótica, na qual o silenciamento do seu gene promove proliferação celular e reduz a apoptose (XIE et al., 2018). Ainda não se sabe a relação entre BID e BMF com FAK. O MCL-1 anti-apoptótico participa do início da cascata de eventos que leva à liberação do citocromo c pela mitocôndria, devido ao seu papel ele é capaz de promover sobrevivência em neoplasias hematológicas. Foi demonstrado, também que os níveis de MCL-1 são reduzidos após silenciamento da FAK (WANG X et al., 2020; WEI et al., 2020).

FAK participa do bloqueio da atividade transcricional de *P53* e *P21(CDK1NB)*, *BAX* e *MDM2*. A interação MDM2-FAK é responsável pela degradação de P53 por meio de ubiquitinação (GOLUBOVSKAYA; CANCE, 2011). Na análise realizada neste trabalho, o gene *PTK2*, que codifica FAK, mostrou correlação negativa com *MDM2*.

*CDK1NB* codifica a proteína p27 que atua interrompendo ou desacelerando o ciclo celular e também como regulador transcricional, a perda da expressão de *CDK1NB* está associado a agressividade de tumores (BACHS et al., 2018). A presente análise encontrou uma correlação positiva entre *PTK2* e *CDKN1B*.

Apoiando o fato da FAK exercer papel importante nas NMPC, os resultados de correlação constata que o *PTK2* se correlaciona não apenas com genes que interagem diretamente com ele, mas também com genes de vias importantes como da apoptose, ciclo celular

A análise de expressão gênica diferencial e a correlação de bancos de expressão gênica permitem uma observação de alterações globais e escolha de moléculas potenciais para estudos de fisiopatologia e alvos moleculares para tratamento. No presente trabalho, esta análise evidenciou alguns genes importantes para controle de sobrevivência, proliferação, adesão e migração celular que são modulados pela inibição da JAK na linhagem SET-2 e o possível envolvimento das

vias nas quais a FAK participa. Deste modo, o estudo da expressão gênica por RNAseq instiga a investigar os papéis desses genes também após a inibição da FAK para se validar as correlações encontradas e entender melhor o envolvimento da FAK na fisiopatologia das NMPC. Da mesma forma, é interessante realizar estudos a fim de compreender o impacto do tratamento com ruxolitinibe nos genes relacionados a adesão e migração celular, e se as modificações na expressão e atividade desses genes irá influenciar na fisiopatologia e tratamento das NMPC.

## 7 CONCLUSÃO:

Os experimentos *in vitro* demonstraram que a inibição da FAK leva a uma diminuição da viabilidade, da proliferação celular e ao aumento da apoptose, efeito esse semelhante a inibição de JAK2 com ruxolitinibe.

Os resultados da análise dos dados de RNAseq proporcionaram uma avaliação do efeito da inibição da JAK2 na modulação da expressão de genes relacionados com a via de adesão focal, ciclo celular e apoptose. Os resultados dessa análise mostraram que o tratamento com o inibidor da JAK2 INC424 influencia na expressão do gene *PTK2* e outros genes relacionados.

Assim, o presente estudo demonstrou que a proteína FAK parece participar dos mecanismos envolvidos na resistência das células dos pacientes com NMPC à apoptose, assim como na resistência ao tratamento, sendo interessante a realização de mais estudos para elucidar a participação da FAK na fisiopatologia das NMPC.

## FINANCIAMENTO:

FAPEMIG (APQ02185/16); CT\_INFRA2013/FINEP; ACMMV recebe bolsa de mestrado FAPEMIG.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDI. H. WILLIAMS, L.J. Principal component analysis. **Wiley Interdisciplinary Reviews: Computational Statistics**, Hoboken, v. 2, p.433-459, 2010.

ADAN, A., KIRAZ, Y., BARAN, Y. Cell Proliferation and Cytotoxicity Assays. **Current Pharmaceutical Biotechnology**, Sharjah, v.17, n. 14, p.1213–1221, 2016.

- AKPOLAT, M., *et al.* X irradiation induced colonic mucosal injury and the detection of apoptosis through PARP-1/p53 regulatory pathway. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, Nova York, v.127, n.110134, p. 1-8, 2020.
- ANDRAOS, R., *et al.* Modulation of Activation-Loop Phosphorylation by JAK Inhibitors Is Binding Mode Dependent. **Cancer Discovery**, Filadelfia, v.2, n.6, p.512–523, 2012.
- AOKI M.; FUJISHITA T. Oncogenic Roles of the PI3K/AKT/mTOR Axis. **Curr Top Microbiol Immunol**, Heidelberg, v.407, p.153-189, 2017.
- ARBER, D.A., *et al.* The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. **Blood**, Nova York, v.127, n.20, p. 2391–2405, 2016.
- AIROLDI, I. Lack of Il12rb2 signaling predisposes to spontaneous autoimmunity and malignancy. **Blood**, Nova York, v.106, p.3846–3853, 2005.
- AYLA S.; KARAHÜSEYINOGLUC S. Cancer Stem Cells, Their Microenvironment and Anoikis. **Crit Rev Oncog**, Nova York, v.24, n.1, p.27-34, 2019.
- BACHS O., *et al.* Role of p27Kip1 as a transcriptional regulator. **Oncotarget**, Albany, v.9, n.40, p.26259-26278, 2018.
- BAGI C.M.; ROBERTS G.W.; ANDRESEN C.J. Dual focal adhesion kinase/Pyk2inhibitor has positive effects on bone tumors: implications for bone metastases. **Cancer**, Nova York, v.112, p.2313–21, 2008.
- BARBUI, T., *et al.* The 2016 WHO classification and diagnostic criteria for myeloproliferative neoplasms: document summary and indepth discussion. **Blood Cancer Journal**, Nova York, v.8, n.15, 2018.
- BARKAS, N., *et al.* Joint analysis of heterogeneous single-cell RNA-seq dataset collections. **Nature Methods**, Nova York, v.16, p.695–698, 2019.
- BASLAN T.; HICKS J. Unravelling biology and shifting paradigms in cancer with single-cell sequencing. **Nat Rev Cancer**, Londres, v.17, n. 9, p. 557-569, 2017.
- BATEMAN, A., *et al.* UniProt: the universal protein knowledgebase in 2021. **Nucleic Acids Research**, Londres, v. 49, p. 480–489, 2021.
- BAUMEISTER J. *et al.* Progression of Myeloproliferative Neoplasms (MPN): Diagnostic and Therapeutic Perspectives. **Cells**, Basiléia, v.10, n.12, p. 3551, 2021.
- BAXTER, E. J., *et al.* Acquired mutation of the tyrosine kinase JAK2 in human myeloproliferative disorders. **Lancet**, Londres, v. 365, n. 9464, p. 1054-61, 2005.
- BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. CONITEC. Ruxolitinibe para tratamento de pacientes com mielofibrose primária, mielofibrose pós policitemia vera ou mielofibrose pós trombocitemia essencial, de risco intermediário-2 ou alto. Brasília, DF, 2020. Disponível em:

[http://conitec.gov.br/images/Relatorios/2020/Ruxolitinibe\\_mielofibrose\\_531\\_2020\\_FI\\_NAL.pdf](http://conitec.gov.br/images/Relatorios/2020/Ruxolitinibe_mielofibrose_531_2020_FI_NAL.pdf). Acesso em: 09/06/2022.

BYRNE-HOFFMAN, C.N., *et al.* Interleukin-12 elicits a non-canonical response in B16 melanoma cells to enhance survival. **Cell Communication and Signaling**, Londres, v.18, 2020.

BYUN J.M., *et al.* Real world epidemiology of myeloproliferative neoplasms: a population based study in Korea 2004-2013. **Annals of hematology**, Berlim, v., 96, n. 3, p. 373-381, 2017.

CANEL M., *et al.* Nuclear FAK and Runx1 Cooperate to Regulate IGFBP3, Cell-Cycle Progression, and Tumor Growth. **Cancer Res**, Chicago, v.77, n.19, p.5301-5312, 2017.

CANER A.; ASIK E.; OZPOLAT B. SRC Signaling in Cancer and Tumor Microenvironment. **Adv Exp Med Biol**, Nova York, v. 1270, p. 57-71, 2021.

CAO Z.; LIVAS T.; KYPRIANOU N. Anoikis and EMT: Lethal "Liaisons" during Cancer Progression. **Crit Rev Oncog**, Nova York, v.21, n.3-4), p.155-168, 2016.

CARNEIRO B.A.; EL-DEIRY W.S. Targeting apoptosis in cancer therapy. **Nat Rev Clin Oncol**, Londres, v.17, n. 7, p. 395-417, 2020.

CARTER, B. Z., *et al.* Focal Adhesion Kinase as a Potential Target in AML and MDS. **Molecular cancer therapeutics**, Filadélfia, v. 16, n. 6, p. 1133–1144, 2017.

CHACHOUA, I., *et al.* Thrombopoietin receptor activation by myeloproliferative neoplasm associated calreticulin mutants. **Blood**, Nova York, v. 127, n. 10, p.1325–1335, 2016.

CHAITANYA G.V.; STEVEN A.J.; BABU P.P. PARP-1 cleavage fragments: signatures of cell-death proteases in neurodegeneration. **Cell Commun Signal**, Dordrecht, v. 8, n. 3, p. 1-11, 2010.

CHANG Y.S., *et al.* Pathway Mutations in Breast Cancer Using Whole-Exome Sequencing. **Oncol Res**, Nova York, v.28, n.2, p107-116, 2020.

CHATTERJEE A., *et al.* Regulation of Stat5 by FAK and PAK1 in Oncogenic FLT3- and KIT-Driven Leukemogenesis. **Cell Rep**, Cambridge, v. 9, n. 4, p. 1333-48, 2014.

CHEN C.Y., *et al.* PTEN: Tumor Suppressor and Metabolic Regulator. **Front Endocrinol**, Lausanne, v. 9, n. 338, 2018.

CHEN H., *et al.* SOX9-activated PXN-AS1 promotes the tumorigenesis of glioblastoma by EZH2-mediated methylation of DKK1. **J Cell Mol Med**, Bucarest, v. 24, n. 11, p. 6070-6082, 2020.

CHEREDA, B.; MELO, J.V. Natural course and biology of CML. **Annals of Hematology**, Berlim, v. 94, n.2, p. 107–121, 2015.

CHERNAK B.J.; RAMPAL RK. Extramedullary hematopoiesis in myeloproliferative neoplasms: Pathophysiology and treatment strategies. **Int Rev Cell Mol Biol**, Amsterdam, v.365, p.97-116, 2021.

CHO H.J., *et al.* Ascochlorin Suppresses MMP-2-Mediated Migration and Invasion by Targeting FAK and JAK-STAT Signaling Cascades. **J Cell Biochem**, Nova York, v.119, n.1, p. 300-313, 2018.

CHUNG, S., *et al.* Quantitative analysis of cell proliferation by a dye dilution assay: Application to cell lines and cocultures. **Cytometry Part A**, Nova York, v. 91, n.7, p. 704–712, 2017.

CHURCHMAN M.L., *et al.* Synergism of FAK and tyrosine kinase inhibition in Ph+ B-ALL. **JCI Insight**, Michigan, v. 1, n. 4, e86082, 2016.

COLTRO G., *et al.* RAS/CBL mutations predict resistance to JAK inhibitors in myelofibrosis and are associated with poor prognostic features. **Blood Adv**, Washington, v.4, n.15, p.3677-3687, 2020.

CORPUZ A.D.; RAMOS J.W.; MATTER M.L. PTRH2: an adhesion regulated molecular switch at the nexus of life, death, and differentiation. **Cell Death Discov**, Nova York, v. 6, n. 1, p. 124-135, 2020.

COSTA-SILVA, J.; DOMINGUES, D.; LOPES, F.M. RNA-Seq differential expression analysis: An extended review and a software tool. **PLOS ONE**, São Francisco, v. 12, n.12, e0190152, 2017.

COWELL L.N., *et al.* Tamoxifen treatment promotes phosphorylation of the adhesion molecules, p130Cas/BCAR1, FAK and Src, via an adhesion-dependent pathway. **Oncogene**, Basingstoke, v.25, n.58, p.7597-607, 2006.

DAI C.; KRANTZ S.B. Increased expression of the INK4a/ARF locus in polycythemia vera. **Blood**, Nova York, v. 97, p.3424–3432, 2001.

D'ARCY, M.S. Cell death: a review of the major forms of apoptosis, necrosis and autophagy. **Cell Biol Int**, Londres, v. 43, n.6, p.582–592, 2019.

DEBERNARDI, J., *et al.* Differential role of FL-BID and t-BID during verotoxin-1induced apoptosis in Burkitt's lymphoma cells. **Oncogene**, Basingstoke, v. 37, n.18, p. 2410– 2421, 2018.

DECAPRIO J.; KOHL T.O. Immunoprecipitation. **Cold Spring Harb Protoc**, Cold Spring Harbor, v.2017, n. 12, p. 1003-1009, 2017.

DE MARINIS E., *et al.* Ruxolitinib binding to human serum albumin: bioinformatics, biochemical and functional characterization in JAK2V617F+ cell models. **Sci Rep**, Londres, v. 9, n. 1, 2019.

DEVAUD C., *et al.* FAK alternative splice mRNA variants expression pattern in colorectal cancer. **Int J Cancer**, Nova York, v. 145, n. 2, p. 494-502, 2019.

DUGINA V.B.; SHAGIEVA G.S.; KOPNIN P.B. Biological Role of Actin Isoforms in Mammalian Cells. **Biochemistry**, Moscou, v.84, n.6, p.583-592, 2019.

EDIRIWEERA M.K.; TENNEKOON K.H.; SAMARAKOON S.R. Role of the PI3K/AKT/mTOR signaling pathway in ovarian cancer: Biological and therapeutic significance. **Semin Cancer Biol**, Londres, v. 59, p. 147-160, 2019.

EDLICH F. BCL-2 proteins and apoptosis: Recent insights and unknowns. **Biochem Biophys Res Commun**, Nova York, v. 500, n. 1, p. 26-34, 2018.

EKE I.; CORDES N. Focal adhesion signaling and therapy resistance in cancer. **Semin Cancer Biol**, Londres, v.31, p.65-75, 2015.

ESKANDARI M., *et al.* The expression of MDM2, MDM4, p53 and p21 in myeloid neoplasms and the effect of MDM2/MDM4 dual inhibitor. **Leuk Lymphoma**, Filadélfia, v.62, n.1, p.167-175, 2021.

FANG D.D., *et al.* Antitumor efficacy of the dual PI3K/mTOR inhibitor PF-04691502 in a human xenograft tumor model derived from colorectal cancer stem cells harboring a pik3ca mutation. **PLoS One**, São Francisco, v. 8, n. 6, p.1-12, 2013.

FANG R., *et al.* EGFR/SRC/ERK-stabilized YTHDF2 promotes cholesterol dysregulation and invasive growth of glioblastoma. **Nat Commun**, Londres, v. 12, n. 1, p. 177195, 2021.

FERNANDEZ-LUNA J.L. Apoptosis and polycythemia vera. **Curr Opin Hematol**, Filadélfia, v. 6, n.2, p.94-9,1999.

FRANKE F.C., *et al.* Novel role for CRK adaptor proteins as essential components of SRC/FAK signaling for epithelial-mesenchymal transition and colorectal cancer aggressiveness. **Int J Cancer**, Nova York, v.147, n. 6, p. 1715-1731, 2020.

FROLOV A., *et al.* Imatinib and Nilotinib increase glioblastoma cell invasion via Abl independent stimulation of p130Cas and FAK signaling. **Sci Rep**, Londres, v.13, n.6, p.27378, 2016.

FUENTES-CALVO I.; MARTINEZ-SALGADO C. Sos1 Modulates Extracellular Matrix Synthesis, Proliferation, and Migration in Fibroblasts. **Front Physiol**, Lausanne, v.6, n.12, p.645044, 2021.

FURUHATA A., *et al.* P27 deregulation by Skp2 overexpression induced by the JAK2V617 mutation. **Biochem Biophys Res Commun**, Nova York, v. 383, p.411–416 2009.

GAO S.W., LIU F. Novel insights into cell cycle regulation of cell fate determination. **J Zhejiang Univ Sci B**, Hangzhou, v.20, n.6, p.467-475, 2019.

GE, S.X.; SON, E.W.; YAO, R. iDEP: an integrated web application for differential expression and pathway analysis of RNA-Seq data. **BMC Bioinformatics**, Londres, v. 19, n.1, p. 534- 558, 2018.

GILLORY L.A., *et al.* Focal adhesion kinase and p53 synergistically decrease neuroblastoma cell survival. **J Surg Res**, Nova York, v. 196, n. 2, p. 339–349, 2015.

GIORDANO V., *et al.* Shc mediates IL-6 signaling by interacting with gp130 and Jak2 kinase. **J Immunol**, Bethesda, v.158, n.9, p.4097-103, 1997.

GOLUBOVSKAYA V.M; CANCE W.G. FAK and p53 protein interactions. **Anticancer Agents Med Chem**, Amsterdam, v. 11, n. 7, p. 617-9, 2011.

GRABEK, J., *et al.* MPN: The Molecular Drivers of Disease Initiation, Progression and Transformation and their Effect on Treatment. **Cells**, Basileia, v. 9, n.8, p.1901 - 1933, 2020.

GREEN D.R.; LLAMBI F. Cell Death Signaling. **Cold Spring Harb Perspect Biol**, Cold Spring Harbor, v. 7, n. 12, p. 1-24, 2015.

GREENFIELD, G., *et al.* The ruxolitinib effect: understanding how molecular pathogenesis and epigenetic dysregulation impact therapeutic efficacy in myeloproliferative neoplasms. **Journal of Translational Medicine**, Londres, v.16, n. 1, p. 360 - 376, 2018.

GU Z., EILS R.; SCHLESNER M. “Complex heatmaps reveal patterns and correlations in multidimensional genomic data.” **Bioinformatics**, Oxford, v. 32, n. 16, p. 2847-9, 2016.

GU Y., *et al.* A pan-cancer analysis of the prognostic and immunological role of  $\beta$ -actin (ACTB) in human cancers. **Bioengineered**, Filadélfia, v.12, n.1, p.6166-6185, 2021.

GUO, D., *et al.* THBS4 promotes HCC progression by regulating ITGB1 via FAK/PI3K/AKT pathway. **The FASEB Journal**, Bethesda, v. 34, n. 8, p. 10668–10681, 2020.

GUO A.K., *et al.* Mutant TP53 interacts with BCAR1 to contribute to cancer cell invasion. **Br J Cancer**, Londres, v.124, n.1, p.299-312, 2021.

GUSTAFSSON, K., *et al.* The Src homology-2 protein Shb modulates focal adhesion kinase signaling in a BCR-ABL myeloproliferative disorder causing accelerated progression of disease. **J Hematol Oncol**, Londres, v. 7, n. 1, p. 45 -58, 2014.

HAMIDI H.; IVASKA J. Every step of the way: integrins in cancer progression and metastasis. **Nat Rev Cancer**, Londres, v.18, n.9, p.533-548, 2018.

HAO P.Q., *et al.* Research progress on pathophysiological function of SOS1 protein. **Sheng Li Xue Bao**, Pequim, v.70, n.5, p.565-570, 2018.

HARRISON C.N., *et al.* The impact of myeloproliferative neoplasms (MPNs) on patient quality of life and productivity: results from the international MPN Landmark survey. **Ann Hematol**, Berlim, v. 96, n. 10, p. 1653-1665, 2017.

HARRISON C.N.; SCHAAP N.; MESA R.A. Management of myelofibrosis after ruxolitinib failure. **Ann Hematol**, Berlim, v.99, n.6, p.1177-1191, 2020.

HAUSMAN D.M. What Is Cancer? **Perspect Biol Med**, Chicago, v. 62, n. 4, p. 778-784, 2019.

HEDRICK L., *et al.* The DCC gene product in cellular differentiation and colorectal tumorigenesis. **Genes Dev**, Nova York, v.8, n.10, p.1174-83, 1994.

HERMOUET S.; BIGOT-CORBEL E.; GARDIE B. Pathogenesis of Myeloproliferative Neoplasms: Role and Mechanisms of Chronic Inflammation. **Mediators Inflamm**, Oxford, v. 2015, p. 145293, 2015.

HOW, J.; HOBBS, G.S.; MULLALLY, A. Mutant calreticulin in myeloproliferative neoplasms. **Blood**, Nova York, v.134, n. 25, p. 2242–2248, 2019.

IJAZ M., *et al.* The Role of Grb2 in Cancer and Peptides as Grb2 Antagonists. **Protein Pept Lett**, Hilversum, v. 24, n. 12, p. 1084-1095, 2018.

INFANTE J.R., *et al.* Safety, pharmacokinetic, and pharmacodynamic phase I dose escalation trial of PF-00562271, an inhibitor of focal adhesion kinase, in advanced solid tumors. **J Clin Oncol**, Nova York, v. 30, n. 13, p. 1527–33, 2012.

INOKUCHI K., *et al.* DCC protein expression in hematopoietic cell populations and its relation to leukemogenesis. **J Clin Invest**, New Haven, v.97 n.3, p.852-7, 1996.

INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER (Brasil). Estatísticas de câncer. [Brasília, DF]: Instituto Nacional do Câncer, 2020. Disponível em: <https://www.inca.gov.br/numerosde-cancer>. Acesso em: 23 nov. 2021.

INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER (INCA). ABC do câncer, abordagens básicas para o controle do câncer. Rio de Janeiro, RJ, 2011. Disponível em: [https://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/abc\\_do\\_cancer.pdf](https://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/abc_do_cancer.pdf). Acesso em: 05 set. 2022.

IRANZO J.; MARTINCORENA I.; KOONIN E.V. Cancer-mutation network and the number and specificity of driver mutations. **Proc Natl Acad Sci U S A**, Washington, v.115, n.26, p. E6010-E6019, 2018.

JOHNSON D.E.; O'KEEFE R.A.; GRANDIS J.R. Targeting the IL-6/JAK/STAT3 signaling axis in cancer. **Nat Rev Clin Oncol**, Londres, v. 15, n. 4, p. 234-248, 2018.



- KALE J.; OSTERLUND E.J.; ANDREWS D.W. BCL-2 family proteins: changing partners in the dance towards death. **Cell Death Differ**, Londres, v. 25, n. 1, p. 65-80, 2018.
- KALLIOKOSKI, T., *et al.* Comparability of Mixed IC50 Data – A Statistical Analysis. **PLOS ONE**, São Francisco, v. 8, n. 4, e61007, 2013.
- KANEHISA, M., *et al.* KEGG: integrating viruses and cellular organisms. **Nucleic Acids Research**, Londres, v. 49, n. 1, p.545–551, 2021.
- KARANTANOS T., MOLITERNO A.R. The roles of JAK2 in DNA damage and repair in the myeloproliferative neoplasms: Opportunities for targeted therapy. **Blood Rev**, Nova York, v.32, n.5, p.426-432, 2018.
- KARONITSCH T., *et al.* Targeted inhibition of Janus kinases abates interferon gamma-induced invasive behavior of fibroblast-like synoviocytes. **Rheumatology**, Oxford, v.57, n.3,p.572-577, 2018.
- KESSLER, B.E., *et al.* FAK Expression, Not Kinase Activity, Is a Key Mediator of Thyroid Tumorigenesis and Pro tumorigenic Processes. **Molecular Cancer Research**, Filadélfia, v. 14, n. 9, 869–882, 2016.
- KHOURY J., *et al.* The 5th edition of the World Health Organization Classification of Haematolymphoid Tumours: Lymphoid Neoplasms. **Leukemia**, Londres, v.36, n.7, p.1720-1748, 2022
- KNUDSEN E.S., *et al.* Cell Cycle and Beyond: Exploiting New RB1 Controlled Mechanisms for Cancer Therapy. **Trends Cancer**, Cambridge, v.5, n.5, p.308-324, 2019.
- KRATIMENOS P., *et al.* FAK-Src-paxillin system expression and disease outcome in human neuroblastoma. **Pediatr Hematol Oncol**, Washington, v.34, n.4, p.221-230, 2017.
- KUMAR P.; NAGARAJAN A.; UCHIL P.D. Analysis of Cell Viability by the MTT Assay. **Cold Spring Harb Protoc**, Nova York, v. 2018, n. 6, 2018.
- KURENOVA, E., *et al.* Focal Adhesion Kinase Suppresses Apoptosis by Binding to the Death Domain of Receptor-Interacting Protein. **Mol. Cell. Biol**, Washington,v. 24, n. 10, p. 4361–4371, 2004.
- LANNUTTI, B.J., *et al.* Incomplete restoration of Mpl expression in the mpl<sup>-/-</sup> mouse produces partial correction of the stem cell-repopulating defect and paradoxical thrombocytosis. **Blood**, Nova York, v. 113, n.8, p.1778–1785, 2009.
- LÄUBLI H.; BORSIG L. Altered Cell Adhesion and Glycosylation Promote Cancer Immune Suppression and Metastasis. **Front Immunol**, Lausanne, v.10, n.2120, 2019.

LEE, J.; GODFREY, A.L.; NANGALIA, J. Genomic Heterogeneity in Myeloproliferative Neoplasms and Applications to Clinical Practice. **Blood**, Nova York, v. 42, 2020.

LEE K., *et al.* A Ras-LSD1 axis activates PI3K signaling through PIK3IP1 suppression. **Oncogenesis**, Nova York, v.9, n.1, p.2, 2020.

LEGERSTEE K.; HOUTSMULLER A.B. A Layered View on Focal Adhesions. **Biology**, Basel, v.10, n.11, p.1189, 2021.

LEITE, A.B., *et al.* Trombocitemia Essencial. **Rev.bras.hematol.hemoter**, Rio de Janeiro, v. 23, n. 1, p. 49-51, 2001.

LEVINE, R.L.; GILLILAND, G. Myeloproliferative disorders. **BLOOD**, Nova York, v. 112, n. 6, p. 2190-2198, 2008.

LIMA K.; LOPES L.R.; MACHADO-NETO J.A. Exploring redox vulnerabilities in JAK2V617F-positive cellular models. **Hematol Transfus Cell Ther**, Rio de Janeiro, v. 43, n. 4, p. 430-436, 2021.

LINDFORS H.E., *et al.* Linker length dependent binding of a focal adhesion kinase derived peptide to the Src SH3-SH2 domains. **FEBS Lett**, Amsterdam, v. 585, n. 4, p. 601-5, 2011.

LIU L.W.; HSIEH Y.Y.; YANG P.M. Bioinformatics Data Mining Repurposes the JAK2 (Janus Kinase 2) Inhibitor Fedratinib for Treating Pancreatic Ductal Adenocarcinoma by Reversing the KRAS (Kirsten Rat Sarcoma 2 Viral Oncogene Homolog)-Driven Gene Signature. **J Pers Med**, Basileia, v.10, n.3, p.130, 2020.

LIU Q.; ZHOU Y.; LI Z. PDGF-BB promotes the differentiation and proliferation of MC3T3-E1 cells through the Src/JAK2 signaling pathway. **Mol Med Rep**, Atenas, v.18, n.4, p.3719-3726, 2018.

LÓPEZ-COLOMÉ A.M., *et al.* Paxillin: a crossroad in pathological cell migration. **J Hematol Oncol**, Londres, v.10, n. 1, p. 50-65, 2017.

LOVE, M.I.; HUBER, W.; ANDERS, S. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. **Genome Biology**, Londres, v.15, p.550, 2014.

LU M., *et al.* The orally bioavailable MDM2 antagonist RG7112 and pegylated interferon  $\alpha$  2a target JAK2V617F-positive progenitor and stem cells. **Blood**, Nova York, v.124, n. 5, p.771-9, 2014.

LUSSANA F., RAMBALDI A. Inflammation and myeloproliferative neoplasms. **J Autoimmun**, Londres, v.85, p.58-63, 2017.

LV P.C., *et al.* FAK inhibitors in Cancer, a patent review. **Expert Opin Ther Pat**, Londres, v. 28, n. 2, p.139-145, 2018.

MACEDO, J., *et al.* Policitemia vera: a propósito de um caso clínico. **Nascer e crescer**, Porto, v. 24, n. 2, p. 83-87, 2015.

MACEDO L.C., *et al.* Association of TNF polymorphisms with JAK2 (V617F) myeloproliferative neoplasms in Brazilian patients. **Blood Cells Mol Dis**, La Jolla, v.57, p.54-7, 2016.

MACHADO-NETO, J.A., *et al.* Autophagy inhibition potentiates ruxolitinib-induced apoptosis in JAK2V617F cells. **Investigational New Drugs**, Boston, v. 38, n. 3, 733–745, 2020.

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

MAIA, V., *et al.* C3G forms complexes with Bcr-Abl and p38 $\alpha$  MAPK at the focal adhesions in chronic myeloid leukemia cells: implication in the regulation of leukemic cell adhesion. **Cell communication and signaling**, Londres, v. 11, n. 1, p. 9- 26, 2013.

MALIK-SHERIFF R.S., *et al.* Diverse patterns of molecular changes in the mechano-responsiveness of focal adhesions. **Sci Rep**, Londres, v.8, n.1, p.2187, 2018.

MAO C.G., *et al.* BCAR1 plays critical roles in the formation and immunoevasion of invasive circulating tumor cells in lung adenocarcinoma. **Int J Biol Sci**, Lake Haven, v.17, n.10, p.2461-2475, 2021.

MARCHIOLI R., *et al.* Cardiovascular events and treatment intensity in polycythemia vera. **N Engl J Med**, Boston, v. 368, n. 1, p. 22-33, 2013.

MARTINCORENA I.; CAMPBELL P.J. Somatic mutation in cancer and normal cells. **Science**, Nova York, v.349, n.6255, p.1483-9, 2015.

MASAROVA L., *et al.* Prognostic Value of Blasts in Peripheral Blood in Myelofibrosis in the Ruxolitinib Era. **Cancer**, Nova York, v.126, n. 19, p. 4322-4331, 2020.

MASUBUCHI, N., *et al.* Mutant calreticulin interacts with MPL in the secretion pathway for activation on the cell surface. **Leukemia**, Nova York, v. 34, n.2, p. 499–509, 2019.

MCCUBREY J.A., *et al.* Targeting survival cascades induced by activation of Ras/Raf/MEK/ERK, PI3K/PTEN/Akt/mTOR and Jak/STAT pathways for effective leukemia therapy. **Leukemia**, Nova York, v.22, n.4, p.708-22, 2008.

MEYER S.C., *et al.* CHZ868, a Type II JAK2 Inhibitor, Reverses Type I JAK Inhibitor Persistence and Demonstrates Efficacy in Myeloproliferative Neoplasms. **Cancer Cell**, Cambridge, v. 28, n. 1, p.15-28, 2015.

MIRLEKAR, B.; PYLAYEVA-GUPTA, Y. IL-12 Family Cytokines in Cancer and Immunotherapy. **Cancers**, Basileia, v. 13, p. 167, 2021.

MITRA S.K.; SCHLAEPFER D.D. Integrin-regulated FAK-Src signaling in normal and cancer cells. **Curr Opin Cell Biol**, Filadélfia, v.18, n.5, p. 516-23, 2006.

MORTEZAEI, K., *et al.* Mechanisms of apoptosis modulation by curcumin: Implications for cancer therapy. **Journal of Cellular Physiology**, Nova York, v. 234, n. 8, p. 12537-12550, 2019.

MOSMANN T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **J Immunol Methods**, Amsterdã, v.65, n.1-2, p.55-63, 1983.

MOULARD, O., *et al.* Epidemiology of myelofibrosis, essential thrombocythemia, and polycythemia vera in the European Union. **European Journal of Haematology**, Copenhagen, v. 92, n.4, p. 289–297, 2013.

MOUSSON, A., *et al.* Targeting Focal Adhesion Kinase Using Inhibitors of Protein-Protein Interaction. **Cancers**, Basileia, v. 10, n. 278, p. 610-615, 2018.

NACHTERGAELE, S.; HE, C. The emerging biology of RNA post-transcriptional modifications. **RNA Biology**, Georgetown, v. 14, n. 2, p. 156–163, 2017.

NAKATAKE M., *et al.* JAK2(V617F) negatively regulates p53 stabilization by enhancing MDM2 via La expression in myeloproliferative neoplasms. **Oncogene**, Basingstoke, v.31, n.10, p.1323-33, 2012.

NEPSTAD I, *et al.* The PI3K-Akt-mTOR Signaling Pathway in Human Acute Myeloid Leukemia (AML) Cells. **Int J Mol Sci**, Basileia, v. 21, n. 8, p. 2907-2929, 2020.

NGUYEN B.T., *et al.* Identification of new binding proteins of focal adhesion kinase using immunoprecipitation and mass spectrometry. **Sci Rep**, Londres, v.9, n.1, p.12908, 2019.

NI M., *et al.* Identification of Candidate Biomarkers Correlated With the Pathogenesis and Prognosis of Non-small Cell Lung Cancer via Integrated Bioinformatics Analysis. **Front Genet**, Lausanne, v. 9, p. 469-483, 2018.

NIEBOROWSKA-SKORSKA, M., *et al.* Ruxolitinib-induced defects in DNA repair cause sensitivity to PARP inhibitors in myeloproliferative neoplasms. **Blood**, Nova York, v. 130, n. 26, p. 2848–2859, 2017.

NOH K., *et al.* The hidden role of paxillin: localization to nucleus promotes tumor angiogenesis. **Oncogene**, Basingstoke, v. 40, n. 2, p. 384-395, 2021.

OLIVEIRA, D. A. B. **Estudo teórico de inibidores da proteína quinase de adesão focal**. 2013. Tese (Doutorado em química) - Universidade de Brasília, 2013.

OLINER J.D.; SAIKI A.Y.; CAENEPEEL S. The Role of MDM2 Amplification and Overexpression in Tumorigenesis. **Cold Spring Harb Perspect Med**, Woodbury, v.6, n.6, p.a026336, 2016.

OTTENS K., *et al.* PIK3IP1 Promotes Extrafollicular Class Switching in T-Dependent Immune Responses. **J Immunol**, Bethesda, v.205, n.8, p.2100-2108, 2020.

OWEN, K.L.; BROCKWELL, N.K.; PARKER, B.S. JAK-STAT Signaling: A DoubleEdged Sword of Immune Regulation and Cancer Progression. **Cancers**, Basileia, v. 11, n. 12, p. 2002 – 2028, 2019.

PALMA, P.R. **Avaliação da Anexina V e Calceína AM como Marcadores de Apoptose em Linfócitos**. 2005. Dissertação (Mestrado em Farmácia Área de Concentração Análises Clínicas) - Universidade Federal De Santa Catarina, Florianópolis, 2005.

PANAGIOTIS T. *et al.* "PARP1-Driven Apoptosis in Chronic Lymphocytic Leukemia ". **BioMed Research International**, Nova York, v. 2014, p.1-6, 2014.

PARK J.H., PYUN W.Y., PARK H.W. Cancer Metabolism: Phenotype, Signaling and Therapeutic Targets. **Cells**, Basileia, v.9, n.10, p.2308, 2020.

PARKER F., BABOOLAL T.G., PECKHAM M. Actin Mutations and Their Role in Disease. **Int J Mol Sci**, Basileia, v.21, n.9, p.3371, 2020.

PAUL, R., *et al.* FAK activates AKT-mTOR signaling to promote the growth and progression of MMTV-Wnt1-driven basal-like mammary tumors. **Breast Cancer Research**, Londres, v.22, n. 1, p. 1-15, 2020.

PEDRAZZANI, F. S. **Impacto da análise molecular da mutação jak2v617f no diagnóstico de neoplasias mieloproliferativas crônicas de acordo com os critérios da OMS**. 2016. Dissertação (Mestrado em Medicina: ciências médicas) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, de Porto Alegre, 2016.

PERNER F., *et al.* Roles of JAK2 in Aging, Inflammation, Hematopoiesis and Malignant Transformation. **Cells**, Basileia, v. 8, n. 8, p. 854- 873, 2019.

PISTRITTO, G., *et al.* Apoptosis as anticancer mechanism: function and dysfunction of its modulators and targeted therapeutic strategies. **Aging**, Albany, v. 8, n. 4, 2016.

PORTO-SOARES, M.A., *et al.* Clinical and molecular profile of a Brazilian cohort of patients with classical BCR-ABL1- negative myeloproliferative neoplasms. **Hematol Transfus Cell Ther**, Rio de Janeiro, v. 42, n. 3, 238-244, 2020.

PRASAD R., *et al.* Repair pathway for PARP-1 DNA-protein crosslinks. **DNA Repair Amst**, Amsterdã, 73:71-77. 2019.

PRIGIONE I., *et al.* IL12RB2 Polymorphisms correlate with risk of lung adenocarcinoma. **Immunobiology**, Estugarda, v.221, n.2, p.291-9, 2016.

QIAO D., *et al.* Baicalein Inhibits Gastric Cancer Cell Proliferation and Migration through a FAK Interaction via AKT/mTOR Signaling. **Am J Chin Med**, Garden City, v.49, n.2, p.525-541, 2021.

R CORE TEAM (2021). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. 2021 URL: <https://www.R-project.org/>.

RAMPAL R.K., *et al.* Therapeutic Efficacy of Combined JAK1/2, Pan-PIM, and CDK4/6 Inhibition in Myeloproliferative Neoplasms. **Clin Cancer Res**, Denville, v.15, n.2712, p.3456-3468, 2021

RAZIDLO G.L.; BURTON K.M.; MCNIVEN M.A. Interleukin-6 promotes pancreatic cancer cell migration by rapidly activating the small GTPase CDC42. **J Biol Chem**, Baltimore, v.293, n.28, p.11143-11153, 2018.

REISKE, H.R., *et al.* Analysis of FAK-associated signaling pathways in the regulation of cell cycle progression. **FEBS Letters**, Amsterdam, v.486, p.275–280, 2000

REPSOLD L.; JOUBERT A.M. Platelet Function, Role in Thrombosis, Inflammation, and Consequences in Chronic Myeloproliferative Disorders. **Cells**, Basileia, v.10, n.11, p.3034, 2021.

RIDER L., DIAKONOVA M. Adapter protein SH2B1beta binds filamin A to regulate prolactin-dependent cytoskeletal reorganization and cell motility. **Mol Endocrinol**, Baltimore, v.25, n.7, p.1231-43, 2011.

RITZ, C., *et al.* (2015) Dose-Response Analysis Using R. **PLOS ONE**, São Francisco, v. 10, n. 12, p. e0146021, 2015.

ROBERTS, W. G., *et al.* Antitumor activity and pharmacology of a selective focal adhesion kinase inhibitor, PF-562,271. **Cancer Res**, Chicago, v. 68, n. 6, p. 1935-44, 2008.

ROSA J,P.; RASLOVA H.; BRYCKAERT M. Filamin A: key actor in platelet biology. **Blood**, Nova York, v.134, n.16, p.1279-1288, 2019.

ROY P.S.; SAIKIA B.J. Cancer and cure: A critical analysis. **Indian J Cancer**, Mumbai, v. 53, n. 3, p. 441-442, 2016.

RUMI E; CAZZOLA M. Diagnosis, risk stratification, and response evaluation in classical myeloproliferative neoplasms. **Blood**, Nova York, v. 129, n. 6, p. 680-692, 2017.

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

RUSS A., *et al.* Blocking "don't eat me" signal of CD47-SIRP $\alpha$  in hematological malignancies, an in-depth review. **Blood Rev**, Nova York, v. 32, n. 6, p. 480-489, 2018.

RYU H., *et al.* Regulation of neutrophil adhesion by pituitary growth hormone accompanies tyrosine phosphorylation of Jak2, p125FAK, and paxillin. **J Immunol**, Bethesda, v. 165, n. 4, p. 2116-23, 2000.

SAJADIMAJD S., *et al.* Advances on Natural Polyphenols as Anticancer Agents for Skin Cancer. **Pharmacol Res**, Londres, v. 151, p.104584, 2020.

SALGADO-LUCIO M.L., *et al.* FAK regulates actin polymerization during sperm capacitation via the ERK2/GEF-H1/RhoA signaling pathway. **J Cell Sci**, Londres, v.133, n.8, p.239186, 2020.

SANTOS F.P.; VERSTOVSEK S. Therapy with JAK2 inhibitors for myeloproliferative neoplasms. **Hematol Oncol Clin North Am**, Filadélfia, v. 26, n. 5, p. 1083-99, 2012.

SCHERBER R.M.; MESA R.A. Managing myelofibrosis (MF) that "blasts" through: advancements in the treatment of relapsed/refractory and blast-phase MF. **Hematology Am Soc Hematol Educ Program**, Washington, v.2018, n.1, p.118-126, 2018.

SCHNEIDER, C.A.; RASBAND, W.S.; ELICEIRI, K.W. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. **Nature Methods**, Nova York, v. 9, n. 7, p. 671-675, 2012.

SEBAUGH J.L. Guidelines for accurate EC50/IC50 estimation. **Pharm Stat**, Chichester, v. 10, n. 2, p. 128-34, 2011.

SEVER R.; BRUGGE J.S. Signal transduction in cancer. **Cold Spring Harb Perspect Med**, Woodbury, v. 5, n. 4, p. a006098, 2015.

SHIN, H.J., *et al.* Doxorubicin-induced necrosis is mediated by poly-(ADP-ribose) polymerase 1 (PARP1) but is independent of p53. **Sci Rep**, Londres, v. 5, n. 15798, 2015.

SHIH H.J., *et al.* "The targeting MCT-1 oncogene inhibits the Shc pathway and xenograft tumorigenicity". **Oncotarget**, Albany, v.3, n.11, p.1401-15, 2012.

SLACK-DAVIS J.K., *et al.* Differential requirement for focal adhesion kinase signaling in cancer progression in the transgenic adenocarcinoma of mouse prostate model. **Mol Cancer Ther**, Filadélfia, v. 8, p. 2470-7, 2009.

SOOD, A. K. *et al.* Adrenergic modulation of focal adhesion kinase protects human ovarian cancer cells from anoikis. **J. Clin. Invest**, New Haven, v. 120, n. 5, p. 1515-1523, 2010.

SOUSA B.; PEREIRA J.; PAREDES J. The Crosstalk Between Cell Adhesion and Cancer Metabolism. **Int J Mol Sci**, Basileia, v. 20, n. 8, p. 1933, 2019.

STAHL, E., *et al.* Computational-based discovery of FAK FERM domain chemical probes that inhibit HER2-FAK cancer signaling. **Chem Biol Drug Des**, Oxford, v. 95, n. 6, p.584–599, 2020.

STOKES J.B., *et al.* Inhibition of focal adhesion kinase by PF-562,271 inhibits the growth and metastasis of pancreatic cancer concomitant with altering the tumor microenvironment. **Mol Cancer Ther**, Filadélfia, v. 10, n. 11, p. 2135-45, 2011.

SUBRAMANIAM D., *et al.* Suppressing STAT5 signaling affects osteosarcoma growth and stemness. **Cell Death Dis**, Nova York, v. 11, n. 2, p.149-164, 2020.

SULZMAIER F.J.; JEAN C.; SCHLAEPFER D.D. FAK in cancer: mechanistic findings and clinical applications. **Nat Rev Cancer**, Londres, v. 14, n. 9, p.598-610, 2014.

SZILVESZTER K.P.; NÉMETH T.; MÓCSAI A. Tyrosine Kinases in Autoimmune and Inflammatory Skin Diseases. **Front Immunol**, Lausanne, v. 10; p.1862, 2019.

SZKLARCZYK D., *et al.* The STRING database in 2021: customizable protein-protein networks, and functional characterization of user-uploaded gene/measurement sets. **Nucleic Acids Res**, Londres, v. 49, n. 1, p. 605-612, 2021.

TADDEI M.L., *et al.* Anoikis: an emerging hallmark in health and diseases. **J Pathol**, Londres, v.226, n.2, p.380-93, 2012.

TANCIONI, *et al.* FAK activity protects nucleostemin in facilitating breast cancer spheroid and tumor growth. **Breast Cancer Research**, Londres, v. 17, p. 47- 64, 2015.

TAPIAL MARTÍNEZ P.; LÓPEZ NAVAJAS P.; LIETHA D. FAK Structure and Regulation by Membrane Interactions and Force in Focal Adhesions. **Biomolecules**, Basel, v.10, n.2, p.179, 2020.

TAVARES, R.S., *et al.* Guideline on myeloproliferative neoplasms: Associação Brasileira de Hematologia, Hemoterapia e Terapia Celular Project guidelines: Associação Médica Brasileira – 2019. **Hematol Transfus Cell Ther**, Rio de Janeiro v. 41, n. 1, p. 1– 73, 2019.

TEFFERI, A., *et al.* Essential thrombocythemia treatment algorithm 2018. **Blood Cancer Journal**, Nova York, v. 8, n. 2, 2018.

TEFFERI, A. Primary myelofibrosis: 2019 update on diagnosis, risk-stratification and management. **Am J Hematol**, Nova York, v. 93, n. 12, p.1551–1560, 2018.

TEFFERI A. Primary myelofibrosis: 2021 update on diagnosis, risk-stratification and management. **Am J Hematol**, Nova York, v.96, n.1, p.145-162, 2021.



TEFFERI, A.; BARBUI, T. Polycythemia vera and essential thrombocythemia: 2017 update on diagnosis, risk-stratification, and management. **Am. J. Hematol**, Nova York, v. 92, n.1, p. 94– 108, 2017.

TEFFERI, A.; PARDANANI, A. Myeloproliferative Neoplasms. A Contemporary Review. **JAMA Oncology**, Chicago, v. 1, n. 1, p 97 – 105, 2015.

The jamovi project (2021). jamovi (Version 1.6) [Computer Software]. Retrieved from <https://www.jamovi.org>

TIEDT, R., *et al.* Pronounced thrombocytosis in transgenic mice expressing reduced levels of Mpl in platelets and terminally differentiated megakaryocytes. **Blood**, Nova York, v. 113, n. 8, p. 1768–1777, 2009.

TITMARSH, G.J., *et al.* How common are myeloproliferative neoplasms? A systematic review and meta-analysis. **American journal of hematology**, Nova York, v. 89, n. 6, 2014.

TOGNON, R.; NUNES, N.S.; CASTRO, F.A. Dysregulation of apoptosis in chronic myeloproliferative neoplasms. **Einstein**, São Paulo, v. 11, n. 4, p,540-4, 2013.

TOGNON R., *et al.* Deregulation of apoptosis-related genes is associated with PRV1 overexpression and JAK2 V617F allele burden in Essential Thrombocythemia and Myelofibrosis. **J Hematol Oncol**, Londres, v. 5; p. 2 -13, 2012.

TOGNON R., *et al.* Apoptosis- and cell cycle-related genes methylation profile in myeloproliferative neoplasms. **Leuk Lymphoma**, Filadélfia, v. 57, n.5, p.1201-4, 2016.

TOGNON R., *et al.* A proteomic study of myeloproliferative neoplasms using reverse-phase protein arrays. **Leuk Lymphoma**, Filadélfia, v.61, n.13, p.3052-3065, 2020.

TORNILLO G.; DEFILIPPI P., CABODI S. Cas proteins: dodgy scaffolding in breast cancer. **Breast Cancer Res**, Londres, v. 16, n. 5, p. 443-452, 2014.

TORRES, V.B.L.; SOARES, M. Patients with hematological malignancies admitted to intensive care units: new challenges for the intensivist. **Revista Brasileira de Terapia Intensiva**, Rio de Janeiro, v. 27, n. 3, p. 193-195, 2015.

TRELIŃSKI J., *et al.* Impaired apoptosis of megakaryocytes and bone marrow mononuclear cells in essential thrombocythemia: correlation with JAK2V617F mutational status and cytoreductive therapy. **Med Oncol**, Northwood, v. 29, n. 4, p. 2388-2395, 2012.

TUNDWAL K.; ALAM R. JAK and Src tyrosine kinase signaling in asthma. **Front Biosci**, Landmark Ed, v. 17, p. 2107-21, 2012.

UOZUMI, K., *et al.* Establishment and characterization of a new human megakaryoblastic cell line (SET-2) that spontaneously matures to megakaryocytes and produces platelet-like particles. **Leukemia**, Londres, v.14, n.1, p. 142-52, 2000.

UPRETY D.; ADJEI A.A. KRAS: From undruggable to a druggable Cancer Target. **Cancer Treat Rev**, Londres, v. 89, p. 102070, 2020.

VAIDYA R., *et al.* Plasma cytokines in polycythemia vera: phenotypic correlates, prognostic relevance, and comparison with myelofibrosis. **Am. J. Hematol**, Nova York, v.87, p.1003- 1005, 2012.

VAINCHENKER, W.; KRALOVICS, R. Genetic basis and molecular pathophysiology of classical myeloproliferative neoplasms. **Blood**, Nova York, v. 129, n. 16, p. 667-679, 2017.

VAN DEN HEUVEL S. Cell-cycle regulation. In: **WormBook: The Online Review of C. elegans Biology**, Pasadena: WormBook, 2005. Ebook.

VAN NIMWEGEN M.J.; VAN DE WATER B. Focal adhesion kinase: a potential target in cancer therapy. **Biochem Pharmacol**, Nova York, v.73, n.5, p.597-609, 2007.

VARRICCHIO L.; MIGLIACCIO A. Calreticulin in Myeloproliferative neoplasms: the other side of the Alice Mirror. **Eur Med J Haematol**, Nova York, v. 1, p. 114–22, 2014.

VENKATA B.S., *et al.* A Focal Adhesion Kinase-Derived Peptide Binds the Src SH3 Domain in Two Orientations, As Demonstrated Using Paramagnetic Nuclear Magnetic Resonance. **Biochemistry**, Washington, v. 55, n. 1, p. 29-37, 2016.

VIS, D.J., *et al.* Multilevel models improve precision and speed of IC50 estimates. **Pharmacogenomics**, Londres, v. 17, n. 7, p. 691–700, 2016.

VOLPE, D.A.; HAMED, S.S.; ZHANG, L.K. Use of Different Parameters and Equations for Calculation of IC50 Values in Efflux Assays: Potential Sources of Variability in IC50 Determination. **The AAPS Journal**, Arlington, v. 16, n.1, p. 172–180, 2014.

WANG D., *et al.* Cyclin G2 Inhibits Oral Squamous Cell Carcinoma Growth and Metastasis by Binding to IGFBP3 and Regulating the FAK-SRC-STAT Signaling Pathway. **Front Oncol**, Lausanne, v.10, p. 560572, 2020.

WANG S.Y., *et al.* Expression levels of phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome 10 (PTEN) and focal adhesion kinase in patients with multiple myeloma and their relationship to clinical stage and extramedullary infiltration. **Leuk Lymphoma**, Filadélfia, v. 53, n. 6, p. 1162-8, 2012.

WANG P., *et al.* miR-206 inhibits thyroid cancer proliferation and invasion by targeting RAP1B. **J Cell Biochem**, Nova York, v, 120, n. 11, p. 18927-18936, 2019.

- WANG X., *et al.* Combinatorial Inhibition of Focal Adhesion Kinase and BCL-2 Enhances Antileukemia Activity of Venetoclax in Acute Myeloid Leukemia. **Mol Cancer Ther**, Filadélfia, v. 19, n. 8, p. 1636-1648, 2020.
- WANG W., *et al.* Targeting MDM2 for novel molecular therapy: Beyond oncology. **Med Res Rev**, Nova York, v.40, n.3, p.856-880, 2020.
- WANG Y.N., *et al.* CPT1A-mediated fatty acid oxidation promotes colorectal cancer cell metastasis by inhibiting anoikis. **Oncogene**, Basingstoke, v.37, n.46, p.6025-6040, 2018.
- WANG Y.; ZUO X. Cytokines frequently implicated in myeloproliferative neoplasms. **Cytokine X**, Amsterdã, v.1, n.1, p.100005, 2019.
- WARD, K. K., *et al.* Inhibition of focal adhesion kinase (FAK) activity prevents anchorage-independent ovarian carcinoma cell growth and tumor progression. **Clin. Exp. Metastasis**, Londres, v. 30, n.5, p. 579–594, 2013.
- WARREN C.F.A.; WONG-BROWN M.W.; BOWDEN N.A. BCL-2 family isoforms in apoptosis and cancer. **Cell Death Dis**, Londres, v. 10, n. 3, p. 177 -189, 2019.
- WEI A.H., *et al.* Targeting MCL-1 in hematologic malignancies: Rationale and progress. **Blood Rev**, Nova York, v. 44, p.100672, 2020.
- WEIN L.; LOI S. Mechanisms of resistance of chemotherapy in early-stage triple negative breast cancer (TNBC). **Breast**, Nova York, 34 Suppl 1, p.S27-S30, 2017.
- WINSTON L.A.; HUNTER T. JAK2, Ras, and Raf are required for activation of extracellular signal-regulated kinase/mitogen-activated protein kinase by growth hormone. **J Biol Chem**, Baltimore, v.270, n.52, p.30837-40, 1995.
- WU H.J., *et al.* FAK signaling in cancer-associated fibroblasts promotes breast cancer cell migration and metastasis by exosomal miRNAs-mediated intercellular communication. **Oncogene**, Basingstoke, v. 39, n. 12, p. 2539-2549, 2020.
- WU R.F., *et al.* p66Shc Couples Mechanical Signals to RhoA through Focal Adhesion Kinase-Dependent Recruitment of p115-RhoGEF and GEF-H1. **Mol Cell Biol**, Washington, v.36, n.22, p.2824-2837, 2016.
- XIA P., XU X.Y. PI3K/Akt/mTOR signaling pathway in cancer stem cells: from basic research to clinical application. **Am J Cancer Res**, Madison, v. 5, n. 5, p. 1602-9, 2015.
- XIANG X., *et al.* Vasodilator-stimulated phosphoprotein promotes liver metastasis of gastrointestinal cancer by activating a  $\beta$ 1-integrin-FAK-YAP1/TAZ signaling pathway. **NPJ Precis Oncol**, Londres, v.2, n.1, p.2, 2018.
- XIE X., *et al.* miR-221 regulates proliferation and apoptosis of ovarian cancer cells by targeting BMF. **Oncol Lett**, Atenas, v. 16, n. 5, p. 6697-6704, 2018.

XIN P., *et al.* The role of JAK/STAT signaling pathway and its inhibitors in diseases. **Int Immunopharmacol**, Amsterdã, v. 80, p. 106210, 2020.

XU X.; LAI Y.; HUA Z.C. Apoptosis and apoptotic body: disease message and therapeutic target potentials. **Biosci Rep**, Londres, v. 39, n. 1, 2019.

XU J.; ZHANG W. EZR promotes pancreatic cancer proliferation and metastasis by activating FAK/AKT signaling pathway. **Cancer Cell Int**, Londres, v.21, n.1, p.521, 2021.

XUE, L. *et al.* Computational analysis and verification of molecular genetic targets for glioblastoma. **Bioscience Reports**, Londres, v. 40, n. 6, p. 1-17, 2020.

YAN, H., *et al.* Promotive effect of Talin-1 protein on gastric cancer progression through PTK2-PXN-VCL-E-Cadherin-CAPN2-MAPK1 signaling axis. **Journal of Clinical Laboratory Analysis**, Nova York, v.34, n.12, p. 1-7, 2020.

YI L., *et al.* Circ-PTK2 promotes the proliferation and suppressed the apoptosis of acute myeloid leukemia cells through targeting miR-330-5p/FOXM1 axis. **Blood Cells Mol Dis**, Califórnia, v. 86, p. 102506, 2021.

YOGARAJAH, M.; TEFFER, A. Leukemic Transformation in Myeloproliferative Neoplasms: A Literature Review on Risk, Characteristics, and Outcome. **Mayo Clin Proc**, Rochester, v. 92, n. 7, p.1118-1128, 2017.

YOU S., *et al.* Tanshinone IIA Suppresses Glioma Cell Proliferation, Migration and Invasion Both in vitro and in vivo Partially Through miR-16-5p/Talin-1 (TLN1) Axis. **Cancer Manag Res**, Auckland, v.12, p. 11309-11320, 2020.

ZHANG C., *et al.* Signalling involving MET and FAK supports cell division independent of the activity of the cell cycle-regulating CDK4/6 kinases. **Oncogene**, Basingstoke, v.38, n.30, p.5905-5920, 2019.

ZHANG Y.; CHEN W. Regulatory effect of Vav1 on T cells and its relation to clinical diseases. **Zhejiang Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban**, Hangzhou, v.47, n.1, p.75-81, 2018.

Zhang L., *et al.* miR-497 defect contributes to gastric cancer tumorigenesis and progression via regulating CDC42/ITGB1/FAK/PXN/AKT signaling. **Mol Ther Nucleic Acids**, Nova York, v.8, n.25, p.567-577. 2021.

ZHANG L., *et al.* LncRNA CASC11 promoted gastric cancer cell proliferation, migration and invasion in vitro by regulating cell cycle pathway. **Cell Cycle**, Georgetown, v.17, n.15, p.1886-1900, 2018.

ZHANG J., *et al.* Predicting STAT1 as a prognostic marker in patients with solid cancer. **Ther Adv Med Oncol**, Londres, v.12, p.1-16, 2020.

ZHAO X.; GUAN J.L. Focal adhesion kinase and its signaling pathways in cell migration and angiogenesis. **Adv Drug Deliv Rev**, Amsterdã, v. 63, n. 8, p. 610-5, 2011.

ZHOU Y.; SHU C.; HUANG Y. Fibronectin promotes cervical cancer tumorigenesis through activating FAK signaling pathway. **J Cell Biochem**, Nova York, 2019.

ZHU Y.G., *et al.* Harmine inhibits the proliferation and migration of glioblastoma cells via the FAK/AKT pathway. **Life Sci**, Amsterdã, v. 270, p.119112, 2021.