



**Ministério da Saúde**  
**Instituto Nacional de Câncer**  
**Coordenação de Pós-graduação**

**INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER**

Pós-Graduação em Oncologia

**CINTIA ELISABETH GOMEZ**

**“Células tronco de pluripotência induzida (iPSCs)  
como modelo de estudo de mutações somáticas das  
neoplasias mieloides”**

**Orientador (es):** Dr. Martín Hernán Bonamino

Dra. Bárbara da Costa Reis Monte-Mór

**RIO DE JANEIRO**

**2018**



**Ministério da Saúde**  
**Instituto Nacional de Câncer**  
**Coordenação de Pós-graduação**

**INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER**

Pós-Graduação em Oncologia

**CINTIA ELISABETH GOMEZ**

**“Células tronco de pluripotência induzida (iPSCs)  
como modelo de estudo de mutações somáticas das  
neoplasias mieloides”**

Tese apresentada ao Instituto Nacional  
de Câncer como parte do requisito para  
obtenção do título de Doutor em  
Oncologia

**Orientador (es):** Dr. Martín Hernán Bonamino

Dra. Bárbara da Costa Reis Monte-Mór

**RIO DE JANEIRO**

**2018**

ii

## FICHA CATALOGRÁFICA

Bibliotecária Responsável: Nanci Simão da Rocha – CRB7/ 4235

L734c Limia, Cintia Elisabeth Gomez

Células tronco de pluripotência induzida (iPSCs)/ Cintia Elisabeth Gomez Limia. – Rio de Janeiro, 2018.  
xix, 166f.

Tese (Doutorado em Oncologia) – Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva, 2018.

Orientador: Martín Hermán Bonamino  
Co-orientadora: Bárbara da Costa Reis Monte-Mór

1. Mielofibrose primária. 2. Genes reguladores. 3. iPSCs. I. Bonamino, Martín Hermán (Orient.). II. Monte-Mór, Bárbara da Costa Reis (Co-orient.). I. Instituto Nacional do Câncer José de Alencar Gomes da Silva. II. Título.

CDD: 616.994



**Ministério da Saúde**  
**Instituto Nacional de Câncer**  
**Coordenação de Pós-graduação**

**INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER**

Pós-Graduação em Oncologia

**CINTIA ELISABETH GOMEZ**

**“Células tronco de pluripotência induzida (iPSCs)  
como modelo de estudo de mutações somáticas das  
neoplasias mieloides”**

**Orientadores:** Dr. Martín Hernán Bonamino

Dra. Bárbara da Costa Reis Monte-Mór

**EXAMINADORES:**

**Profa. Dra.** Raquel Ciuvalschi Maia

**Prof. Dr.** Marcelo Einicker Lamas

**Prof. Dr.** Rodrigo Panepucci

**Profa. Dra.** Renata Mierelles Pereira

**Dr.** Fabio Eudes Leal

**Prof. Dr.** Zilton Faria Meira de Vasconcelos

**Aprovada em:** 14 / 03 / 2018

**RIO DE JANEIRO**  
**2018**

## **Dedicatoria**

A toda mi familia,  
por acompañarme en mis logros y dificultades,  
por la comprensión de mi ausencia en momentos importantes para poder realizar mis estudios.

Especialmente a mi madre Dany,  
por su apoyo y amor incondicional en todos los momentos de mi vida, por enseñarme valores de  
vida que hoy guían mis días, por sus esfuerzos y dedicación para mi formación como  
profesional y ser humano, por ser la luz de mis ojos.

A mis hermanos Tito y Rodrigo,  
por el apoyo y por la confianza que siempre depositaron en mí.

A mis sobrinitos Emita, Ivancito e Manu

A mi abuelo Miguel Ángel “*in memorian*”,  
por su apoyo incondicional en mis estudios y trayecto como ajedrecista, por todas sus  
enseñanzas y valores que hoy acompañan mis días.

A mi gran e querido amigo Hugo “*in memorian*”,  
por su apoyo y cariño incondicional en momentos importantes de mi vida, por guiarme e  
iluminar mi camino, por enseñarme a no tener miedo de nada y que mi fuerza interior puede  
llegar lejos.

## **Agradecimentos**

Em primeiro lugar, gostaria de agradecer enormemente aos meus orientadores Dr. Martin Bonamino e Dra. Barbara Monte-Mor, por ter me dado a oportunidade de começar uma nova etapa da minha carreira científica, o doutorado. Agradeço pela aprendizagem nestes anos em cada um dos laboratórios e pela confiança para poder desenvolver meu doutorado. Quero agradecer pela experiência adquirida nestes anos, que contribuiu para minha formação profissional e pessoal.

Meu especial agradecimento ao Dr. Stevens Rehen, por ter me acolhido e dado a oportunidade de realizar parte do meu doutorado no laboratório Nacional de Células tronco embrionárias. Obrigada pela confiança e o apoio.

Gostaria de agradecer enormemente à Dra Ilana Zalberg pelo apoio em todos estes anos, pela confiança e por me dar foças nos momentos que foram necessários.

Um especial agradecimento à Dra. Isabelle Plo e meu amigo Dr. Antônio Di Stefano pelas discussões e por ter me ensinado as técnicas de diferenciação, agradeço pela oportunidade de realizar meu doutorado sandwiche na França.

Agradeço aos membros da Banca pelas discussões e contribuição para melhora a qualidade deste trabalho.

Gostria de reconhecer o esforço e ajuda do meu gran amigo Jarek Sochacki. Obrigada pelas discussões de resultados, pelo empenho em me guiar e ensinar bases que precisava para trabalhar com as iPSCs o que foi muito importante por contribuir no meu crescimento profissional.

Obrigada a Fernanda e Monique, além da amizade que construímos nestes anos agradeço, pelo suporte técnico e as sugestões em todos os momentos da execução do meu projeto. Agradeço pela ajuda incondicional de Luisa Aguirre na final do meu doutorado e de Eugênia. Um agradecimento especial a Rafa e a Eldinha e a Gabi.

Quero agradecer a todos o que fazem parte do Laboratório de Imunologia tumoral. Além de serem meus colegas também são os meus amigos. Agradeço especialmente a Mayra, Luisa pelo apoio incondicional todos estes anos, também agradeço pela amizade e ajuda da Luciana, Leo, Priscila e Paula. Agradeço aos meus colegas e amigos novos do grupo Priscila, Breno, Mari e Laura.

Um especial agradecimento aos meus colegas e amigos laboratório de Biomol do CEMO, agradeço pela alegria e pelo apoio. Especialmente a Mari, Telminha, Luciana, Diego, as Rafas, Nati, Leo, Fátima, Andrea, Simone, Suzana, Liana, Michelle e Dani.

Agradeço enormemente o apoio e amizade do meu grupo de amigos do Lance. Estes anos aprendi muito, agradeço pelas discussões e pelo apoio para desenvolver meu doutorado junto a vocês. Agradeço especialmente aos meus grandes amigos Erik e Marcelinho, agradeço também a Ismael, Daniel Cardilhe e Furtado, Pablo e Pablito, Sylvie, a Gabi, minha grande amiga Rafa, Vanja, Rodrigo, Marcelo, Karina. Um agradecimento especial à Yasmin, obrigada pela sua amizade nestes anos de doutorado.

Gostaria de agradecer enormemente aos meus colegas e amigos da França, do Hospital Gustave Roussy. Agradeço pelo apoio e amizade de Monica e Antonio, pela amizade de meus grandes amigos Karim, Florian, Ramiiz e Tracy, agradeço a Alexandre pelas discussões e me ajudar no meu trabalho no meu estágio na França. Um especial agradecimento a minha querida e gran amiga Huguet e a sua família.

Agradeço aos meus amigos de Campinas, a Josélia Jan e Manu, a Ana Carolina Santos de Souza Galvão. Um especial agradecimento ao professor Hiroshi por todo o seu apoio, ensinamentos, conversas e, acrescentar com seus conhecimentos e experiência na minha formação profissional. Pelas extensas discussões de trabalho e artigos, que foram muito importantes para o desenvolvimento da minha pesquisa. Agradeço aos meus amigos Denise, Eric, Danilo, Camila e Mário, Mique e Tere, Ine, Gabi, Anísio, Tiago, Yovani, Cheo, Javi, Tania, Meli, Isa, Yamit, Robert, Luiz, Tiago, Anselmo, Rocha.

Agradeço aos amigos que encontrei aqui no Rio de Janeiro e no Inca, a Carlina, Ricardo ao Fábio, a meu grande amigo Franco e meu amigo Alsimar. Agradeço a Jefferson pelo apoio na minha defesa de doutorado. Agradeço enormemente a Mamhedi pela amizade e suporte quando cheguei no Rio de Janeiro, agradeço a Gabi por ter mi apresentado essa maravilhosa pessoa. Muitos deles me ajudaram a crescer, me acompanharam e foram parte de momentos importantes na minha vida até o dia de hoje.

Quero agradecer também aos queridos amigos de xadrez, de Rio de Janeiro que me incentivaram jogar depois de tantos anos trazendo lindos momentos de alegria.

Agradeço aos meus amigos da Argentina que são parte de minha vida em todos os momentos, Andrea (Chichi), Sofi, Pauly, Noe, Sebastián, Moni e Gabi, José Luis, Lisi, Fernando, Dario, Hugo, Sabri, Caro. A minhas amigas uruguaias Vania, Paola e Vico.

Agradeço a toda minha família pelo apoio nas minhas decisões, por me acompanhar nas diferentes etapas, além de confiarem sempre em mim. Agradeço especialmente aos meus tios Ernesto e Vilma, Eli e Francisco, por todos os conselhos, ajuda e incentivo dado em diferentes momentos. A minhas avós Elita e Irma, por sempre estarem dispostas a me acompanhar em cada decisão da minha vida. A todos os meus primos pela alegria e amizade de sempre. Agradeço aos meus primos Ana Lisa, Gonzi, Rami, Sofi, Fer, Pablo, Bebo e Flor.



Ministério da Saúde

Instituto Nacional de Câncer

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER

**“Células tronco de pluripotência induzida (iPSCs) como modelo de estudo de mutações somáticas das neoplasias mieloides”**

RESUMO

**TESE DE DOUTORADO**

**Cintia Elisabeth Gomez**

A mielofibrose primária (MF) é caracterizada por uma mieloproliferação aumentada e fibrose da medula óssea. Na MF, as mutações somáticas *driver* ocorrem nos genes *JAK2*, *MPL* ou *CALR* e mutações em reguladores epigenéticos como *TET2* e *ASXL1*, que podem levar à perda de função. Neste contexto, as células tronco de pluripotência induzida (iPSCs) podem ser usadas para estudar a heterogeneidade clonal, recapitular *in vitro* o fenótipo da doença e em testes para a eficácia de fármacos. O objetivo principal deste trabalho foi avaliar o impacto das mutações somáticas na *CALR* e nos reguladores epigenéticos tanto na reprogramação celular como na diferenciação hematopoiética usando iPSCs. As mutações em *CALR* foram caracterizadas por PCR e eletroforese capilar, e as mutações somáticas nos outros genes foram caracterizadas pelo sequenciamento de próxima geração. Neste estudo, geramos células iPSC a partir de células primárias CD34<sup>+</sup> de pacientes (P) nomeados de P1 a P6 e dois controles de doadores saudáveis (C1/C2) usando o sistema baseado em vírus Sendai. O estado de pluripotência foi avaliado pela expressão de marcadores de células estaminais embrionárias (OCT-3/4, Sox-2, SSEA-4 e TRA-1-81) e a capacidade de se diferenciar em todas as três camadas germinativas nos ensaios de formação de corpos embrioides. Os marcadores de células-tronco e das camadas germinativas foram detectados por imunofluorescência. A diferenciação hematopoiética foi realizada em culturas *feeder-free*, suplementada com citocinas. Os progenitores CD43<sup>+</sup> CD34<sup>+</sup> foram classificados no dia 10 e 14 e plaqueados em metilcelulose ou em ensaios de coagulação plasmática para quantificar unidades de formação de colônias (CFU) ou CFU-megacariocítica (CFU-MK), respectivamente. Os granulócitos foram diferenciados dos progenitores CD34<sup>+</sup>/CD43<sup>+</sup> durante uma cultura de 25 dias. Após a reprogramação, realizamos uma caracterização molecular dos iPSCs derivados de P1-P6. A partir de P4, foram obtidos 32 clones de iPSCs e foram identificados dois genótipos diferentes, *CALR*<sup>ins5</sup>/*TET2*<sup>wt</sup> (n = 20) e *CALR*<sup>ins5</sup>/*TET2*<sup>G989X</sup> (n = 12). Os diferentes genótipos observados para P4-iPSC refletem a diversidade clonal presente na amostra primária de MF. Confirmamos que *TET2* WT, bem como o iPSCs carregando *TET2* mutado formam *bona fide* iPSCs, indicando que a mutação G898X não prejudicou a reprogramação celular. Procuramos, em seguida, estudar o papel dessas mutações na diferenciação hematopoiética. O potencial clonogênico dos progenitores foi confirmado pela formação de todos os tipos de CFU mielóide em ensaios de metilcelulose. Usando o teste do coágulo de plasma, observamos maiores números de colônias grandes CFU-MK (> 50 células) derivadas de clones P1-iPSC vs C1/C2-iPSC. Além disso, observamos um número crescente de colônias de monócitos derivadas de progenitores CD34<sup>+</sup>/CD43<sup>+</sup> de iPSCs mutantes *TET2* (*CALR*<sup>ins5</sup>/*TET2*<sup>G989X</sup>) quando comparados com iPSCs *CALR*<sup>ins5</sup>/*TET2*<sup>WT</sup> e iPSC do doador controle *CALR*<sup>WT</sup>/*TET2*<sup>WT</sup>. Além disso, os iPSCs portadores de *CALR* mutante foram associados a colônias de MK maiores consistentes com o fenótipo observado em pacientes com MF. Neste estudo, nossos resultados sugerem que mutações em reguladores epigenéticos como o *TET2*<sup>G898X</sup> não parecem prejudicar a reprogramação celular, já que os iPSCs que abrigavam essas mutações apresentavam todas as características dos *bona fide* iPSC e que as mutações em *CALR* e *TET2* parecem afetar a diferenciação hematopoiética de iPSCs.

**Palavras-chave:** 1. Mielofibrose primária 2. Genes reguladores epigenéticos 3. iPSCs



**Ministério da Saúde  
Instituto Nacional de Câncer**

**"Induced pluripotency stem cells (iPSCs) as a model for the study of  
somatic mutations of myeloid neoplasms"**

**Abstract**

**TESE DE DOUTORADO**

**Cintia Elisabeth Gomez**

Primary myelofibrosis (PMF) is characterized by an increased myeloproliferation and bone marrow fibrosis. In PMF, driver somatic mutations occur in *JAK2*, *MPL* or *CALR* genes and mutations in epigenetic regulators as *TET2* and *ASXL1* that could lead to loss-of-function. In this context, induced pluripotent stem cells (iPSC) could be used to study clonal heterogeneity, recapitulate *in vitro* the disease phenotype and test for drug efficacy. The main goal of this work was to assess the impact of somatic mutations in *CALR* and epigenetic regulators in both cellular reprogramming and hematopoietic differentiation using iPSCs. *CALR* mutations were characterized by PCR and capillary gel electrophoresis, and the somatic mutations in the others genes were characterized by Next Generation sequencing. In this study, we generated iPSC cells from CD34<sup>+</sup> primary cells from patients (P) called from P1 to P6 and two healthy donor control (C1/C2) using the Sendai virus based system. The pluripotency *status* was evaluated by the expression of embryonic stem cells markers (OCT-3/4, Sox-2, SSEA-4 e TRA-1-81) and the capacity to differentiate into all three germ layers in embryonic body formation assays. Stem cell and layer specific markers were detected by immunofluorescence. Hematopoietic differentiation was performed on feeder-free culture supplemented with cytokines. CD43<sup>+</sup>CD34<sup>+</sup> progenitors were sorted at day 10 and plated either in methylcellulose or in plasma clot assays to quantify myeloid Colony-Forming Units (CFU) or CFU-Megakaryocytes (CFU-MK), respectively. Granulocytes were differentiated from CD34<sup>+</sup>/CD43<sup>+</sup> progenitors during a 25 day-culture. After reprogramming, we performed a molecular characterization of the iPSCs derived from P1-P6. From P4, 32 P4-iPS clones were obtained and two different genotypes were identified, *CALR*<sup>ins5</sup>/*TET2*<sup>wt</sup> (n=20) and *CALR*<sup>ins5</sup>/*TET2*<sup>G989X</sup> (n=12). The different genotypes observed for iPSCs reflect the clonal diversity present in the PMF primary sample. We confirmed that *TET2*<sup>WT</sup> as well as *TET2* mutated iPSCs were *bona fide* iPSCs, indicating that G898X mutation did not impair cellular reprogramming. We next sought to study the role of these mutations in the hematopoietic differentiation. The clonogenic potential of progenitors was confirmed by formation of all type of myeloid in methylcellulose assays. Using plasma clot assay, we observed higher numbers of large CFU-MK colonies (>50 cells) derived from P4-iPSC clones vs C1/C2-iPSC. Moreover, we observed an increased number of monocyte colonies derived from CD34<sup>+</sup>/CD43<sup>+</sup> progenitors of *TET2* mutated (*CALR*<sup>ins5</sup>/*TET2*<sup>G989X</sup>) iPSCs when compared with iPSCs *CALR*<sup>ins5</sup>/*TET2*<sup>WT</sup> and iPSC from control *CALR*<sup>WT</sup>/*TET2*<sup>WT</sup> donor. In addition, iPSCs carrying mutated *CALR* were associated with larger MK colonies consistent with the phenotype observed in PMF patients. In this study, our results suggests that mutations in epigenetic regulators such as *TET2*<sup>G898X</sup> did not seem to impair cellular reprogramming, since iPSCs harboring these mutations displayed all the features of *bona fide* iPSC and that mutations in *CALR* and *TET2* seem to impact hematopoietic differentiation of iPSCs.

**key-word:** 1. Primary myelofibrosis 2. epigenetic regulators genes 3. iPSCs

## SUMÁRIO

<b>1.</b>	Introdução	1
<b>1.1.</b>	Câncer	1
<b>1.2.</b>	Neoplasias mieloproliferativas (NMP)	2
<b>1.3.</b>	Mielofibrose primária (MF)	4
<b>1.3.1.</b>	Aspectos clínicos	4
<b>1.3.2.</b>	Critérios diagnósticos	4
<b>1.3.3.</b>	Prognóstico	6
<b>1.3.4.</b>	Tratamentos	7
<b>1.3.5.</b>	Fisiopatologia	8
<b>1.4.</b>	Mutações <i>driver</i> implicadas nas NMPs	9
<b>1.5.</b>	Mutações em reguladores epigenéticos nas NMPs	11
<b>1.5.1</b>	Enzimas TETs como reguladores epigenéticos nas NMPs	12
<b>1.5.2</b>	<i>ASXL1</i> como regulador epigenético nas NMPs	15
<b>1.6</b>	Mutações implicadas na transformação leucêmica	16
<b>1.6.1</b>	Evolução clonal das mutações somáticas	16
<b>1.7.</b>	Células tronco ( <i>Stem Cells</i> )	17
<b>1.7.1.</b>	Células tronco embrionárias humanas (hESC)	17
<b>1.7.2.</b>	Células tronco de pluripotência induzidas (iPSCs)	18
<b>1.7.3.</b>	Reprogramação celular como modelo de estudo	19
<b>1.8</b>	Células tronco hematopoiéticas e diferenciação hematopoiética	21
<b>1.8.1</b>	Modelos de formação das células tronco hematopoiéticas	24
<b>1.9</b>	Potenciais implicações da aplicação de iPSCs no estudo das NMPs	26
<b>2.</b>	Objetivos	28

<b>2.1.</b>	Objetivos gerais	.....	28
<b>2.2.</b>	Objetivos específicos	.....	28
<b>3.</b>	Materiais e métodos	.....	29
<b>3.1</b>	Abordagem experimental	.....	29
<b>3.2</b>	Aspectos éticos	.....	31
<b>3.2.1</b>	Coleta das amostras biológicas de sangue periférico	.....	31
<b>3.3.</b>	Enriquecimento de células tronco/progenitoras hematopoiéticas	.....	31
<b>3.3.1.</b>	Isolamento e expansão	.....	31
<b>3.3.2.</b>	Diferenciação de eritroblastos a partir de células tronco/progenitoras hematopoiéticas CD34 <sup>+</sup>	.....	32
<b>3.3.3.</b>	Imunofenotipagem de eritroblastos	.....	33
<b>3.3.4.</b>	Isolamento dos granulócitos primários	.....	33
<b>3.3.5.</b>	Imunofenotipagem dos granulócitos primários	.....	34
<b>3.4.</b>	ETAPA A - Seleção dos pacientes com MF e caracterização molecular das amostras	.....	34
<b>3.4.1.</b>	Caracterização molecular de granulócitos	.....	34
<b>3.4.1.1</b>	Caracterização molecular de eritroblastos	.....	34
<b>3.4.2.</b>	Reação em cadeia da polimerase (PCR)	.....	35

<b>3.4.3.</b>	PCR qualitativo alelo específico do éxon 14 do gene <i>JAK2</i>	36
<b>3.4.4.</b>	PCR para amplificação do éxon 9 do gene <i>CALR</i> e análise de fragmento por eletroforese capilar	37
<b>3.4.5.</b>	PCR para identificação de mutações nos genes <i>TP53, IDH1 TET2 e ASXL1</i>	38
<b>3.4.6.</b>	Sequenciamento pelo método de Sanger	38
<b>3.4.7.</b>	Análise da frequência alélica das mutações em eritroblastos diferenciados <i>in vitro</i>	38
<b>3.5.</b>	ETAPA B- Reprogramação celular	39
<b>3.5.1.</b>	Expansão e manutenção das iPSCs	41
<b>3.6.</b>	Caracterização molecular das células reprogramadas e das iPSCs	42
<b>3.6.1.</b>	Extração de DNA	42
<b>3.6.2.</b>	Avaliação da expressão dos genes <i>TETs</i> nas iPSCs	43
<b>3.7.</b>	Análise da pluripotência	43
<b>3.7.1.</b>	Avaliação da expressão dos genes de pluripotência do vírus Sendai	44
<b>3.7.2.</b>	Formação de corpos embrioides	45
<b>3.7.3.</b>	Imunofluorescência	47
<b>3.7.4.</b>	Análise da ploidia	48
<b>3.7.5.</b>	Análise do cariótipo	48
<b>3.7.6.</b>	Hibridação fluorescente <i>in situ</i> (FISH)	49

<b>3.8.</b>	ETAPA C- Diferenciação hematopoiética <i>in vitro</i> a partir das iPSCs	49
<b>3.8.1</b>	Diferenciação em progenitores hematopoiéticos	50
<b>3.8.2.</b>	Ensaio clonogênicos	50
<b>3.8.3.</b>	Diferenciação das iPSCs para geração de granulócitos <i>in vitro</i>	53
<b>3.9.</b>	Análise estatística	53
<b>4.</b>	Resultados	54
<b>4.1.</b>	ETAPA A- Caracterização das amostras dos pacientes com mielofibrose primária	54
<b>4.1.1.</b>	Caracterização molecular dos granulócitos	54
<b>4.1.2.</b>	Caracterização morfológica e imunofenotípica de granulócitos primários	61
<b>4.2.</b>	ETAPA B- Reprogramação celular a partir de células CD34+ de pacientes e de doadores saudáveis	64
<b>4.2.1.</b>	Diferenciação <i>in vitro</i> de eritroblastos a partir de células tronco/progenitores hematopoiéticos	64
<b>4.2.2.</b>	Monitoramento por citometria de fluxo da diferenciação celular	66
<b>4.2.3.</b>	Geração e caracterização das células tronco de pluripotência induzida (iPSCs) a partir de pacientes com MF e doadores saudáveis	69
<b>4.2.3.1.</b>	Condições da reprogramação celular e colônias obtidas	70
<b>4.2.3.2.</b>	Caracterização molecular das colônias iPSCs	73
<b>4.2.4.</b>	Identificação da deleção no cromossomo 20 da iPS.MFP5.5.	81
<b>4.2.5.</b>	Análise do cariótipo dos clones iPSCs	82

<b>4.3.</b>	<b>Caracterização da pluripotência</b>	.....	<b>84</b>
<b>4.3.1.</b>	<b>Avaliação da expressão do Vírus Sendai (VS)</b>	.....	<b>84</b>
<b>4.3.2.</b>	<b>Avaliação dos marcadores de pluripotência por imunofluorescência</b>	.....	<b>85</b>
<b>4.3.3.</b>	<b>Ensaio de formação de corpos embrioides (EBs) <i>in vitro</i></b>	.....	<b>90</b>
<b>4.4.</b>	<b>Diferenciação Hematopoiética</b>	.....	<b>95</b>
<b>4.4.1.</b>	<b>Diferenciação de progenitores hematopoiéticos a partir de iPSCs</b>	.....	<b>95</b>
<b>4.4.2.</b>	<b>Avaliação do potencial clonogênico dos progenitores hematopoiéticos</b>	.....	<b>98</b>
<b>4.4.2.1.</b>	<b>Avaliação da formação de unidades formadoras de colônias (Colony-forming Unit, CFUs) mieloides</b>	.....	<b>98</b>
<b>4.4.2.2.</b>	<b>Avaliação da formação de CFU megacariocítica (CFU-MK)</b>	.....	<b>107</b>
<b>4.4.3.</b>	<b>Diferenciação granulocítica a partir da iPSCs</b>	.....	<b>109</b>
<b>5.</b>	<b>Discussão</b>	.....	<b>121</b>
<b>6.</b>	<b>Conclusão</b>	.....	<b>151</b>
<b>7.</b>	<b>Perspectivas futuras</b>	.....	<b>153</b>
<b>8.</b>	<b>Referências</b>	.....	<b>157</b>
<b>9.</b>	<b>Anexo 1</b>	.....	<b>160</b>

<b>9.2</b>	Anexo 2	.....	162
<b>9.3.</b>	Anexo 3	.....	164
<b>9.4</b>	Anexo 4	.....	163
<b>9.5.</b>	Anexo 5	.....	167
<b>9.6.</b>	Anexo 6	.....	168
<b>9.7.</b>	Anexo 7	.....	175
<b>9.8.</b>	Anexo 8	.....	178

## Tabelas

<b>Tabela 1.1</b>	Classificação das Neoplasias (NMPs) baseadas na quarta edição dos critérios da OMS e atualizada no ano 2016. ....	4
<b>Tabela 1.2</b>	Critérios da OMS para a fase <i>pre-PMF</i> . ....	6
<b>Tabela 1.3</b>	Critérios da OMS para a fase <i>overt-PMF</i> . ....	7
<b>Tabela 3.1</b>	Descrição dos anticorpos utilizados na imunofenotipagem dos eritrócitos. ....	36
<b>Tabela 3.2</b>	Anticorpos utilizados na imunofenotipagem dos granulócitos. ....	37
<b>Tabela 3.3</b>	Lista de primers utilizados em cada reação de PCR dos genes candidatos. ....	38
<b>Tabela 3.4</b>	Condições dos PCRs específicos para amplificação a partir do DNA genômico de fragmentos dos genes <i>JAK2</i> , <i>CALR</i> , <i>TP53</i> , <i>IDH1</i> , <i>TET2</i> e <i>ASXL1</i> . ....	38
<b>Tabela 3.5</b>	Sequência dos primers para detecção da expressão dos genes de pluripotência do VS. ....	48
<b>Tabela 3.6</b>	Sequência dos primers utilizados para a amplificação de genes expressos nos EBs. ....	49
<b>Tabela 3.7</b>	Condições de PCR para verificar a expressão dos genes alvos nos EBs ....	50
<b>Tabela 3.8</b>	Descrição dos anticorpos utilizados nos protocolos de imunofenotipagem. ....	51
<b>Tabela 3.9</b>	Anticorpos usados para o sorting dos progenitores hematopoiéticos diferenciados a partir das iPSCs. ....	54
<b>Tabela 3.10</b>	Anticorpos usados para imunofenotipagem dos granulócitos diferenciados a partir das iPSCs. ....	56
<b>Tabela 4.1</b>	Pacientes com MF selecionados para reprogramação celular. ....	60
<b>Tabela 4.2</b>	Análise por citometria de fluxo de cinco amostras de granulócitos separados por Ficoll. ....	68
<b>Tabela 4.3</b>	Lista dos valores da citometria de fluxo correspondente aos pacientes com MF. ....	72
<b>Tabela 4.4</b>	Condições da reprogramação das células dos pacientes com MF. ....	76
<b>Tabela 4.5</b>	Resultados da frequência alélica das células de P4. ....	81

<b>Tabela 4.6.</b>	Caracterização molecular dos clones iPSCs. ....	87
<b>Tabela 4.7.</b>	Quantificação da imunexpressão dos marcadores de pluripotência. ....	92
<b>Tabela 4.8.</b>	Lista das 12 iPSCs que foram selecionadas para caracterização completa da pluripotência. ....	92
<b>Tabela 4.9.</b>	Avaliação dos marcadores específicos das três camadas germinativas. ....	97
<b>Tabela 4.10.</b>	Imunofenotipagem da população de GR diferenciados <i>in vitro</i> a partir do P4. ....	124
<b>Tabela 9.1</b>	Valores dos testes de micoplasma das células utilizadas para reprogramar e das iPSCs geradas. ....	177
<b>Tabela 9.2</b>	Confirmação da presença dos marcadores de pluripotência de todas as iPSCs. ....	178
<b>Tabela 9.3</b>	Quantificação da imunexpressão dos marcadores de pluripotência. ....	185
<b>Tabela 9.4</b>	Lista de genes correspondentes à região deletada e Quantificação da imunexpressão dos marcadores de pluripotência. ....	189

## Figura

<b>Figura 1.1</b>	Modelo hipotético dos mecanismos responsáveis pela fisiopatogênese da MF	10
<b>Figura 1.2.</b>	Vias de sinalização associadas à enzima quinase JAK2	11
<b>Figura 1.3.</b>	Vias de sinalização associadas à CALR mutada	13
<b>Figura 1.4.</b>	Mapa genético das regiões que codifica a enzima TET2	16
<b>Figura 1.5.</b>	Mapa genético e descrição dos domínios do gene <i>ASXL1</i>	18
<b>Figura 1.6.</b>	Esquema da reprogramação de células somáticas para geração de células pluripotentes induzidas (iPSCs).	22
<b>Figura 1.7.</b>	Hierarquia da diferenciação a partir de CTH humanas	25
<b>Figura 1.8.</b>	Esquema da cinética de formação das células tronco hematopoiéticas em humanos	26
<b>Figura 1.9.</b>	Modelo hipotético da geração de células hematopoiéticas e endoteliais na embriogênese	28
<b>Figura 1.10.</b>	Modelo de diferenciação de progenitores hematopoiéticos primitivos ou definitivos.	29
<b>Figura 3.1.</b>	Esquema representativo da abordagem experimental.	32
<b>Figura 3.2.</b>	Painel de genes candidatos utilizados para o sequenciamento de próxima geração das amostras dos pacientes com MF	38
<b>Figura 3.3.</b>	Esquema do PCR alelo específico <i>JAK2</i> <sup>V617F</sup> .	40
<b>Figura 3.4.</b>	Esquema do protocolo reprogramação celular	44
<b>Figura 3.5.</b>	Esquema do protocolo de diferenciação hematopoiética <i>feeder-free</i>	54
<b>Figura 3.6.</b>	Esquema dos experimentos realizados a partir do sorting dos progenitores hematopoiéticos CD43+CD34+	55
<b>Figura 4.1.</b>	Caracterização molecular dos granulócitos do paciente P1 e P2	60
<b>Figura 4.2.</b>	Caracterização molecular dos granulócitos do paciente P3	61

<b>Figura 4.3.</b>	Caracterização molecular dos granulócitos do paciente P4	62
<b>Figura 4.4.</b>	Caracterização molecular dos granulócitos do paciente P5	63
<b>Figura 4.5.</b>	Análise de aneuploidia dos granulócitos do paciente P5	64
<b>Figura 4.6.</b>	Caracterização molecular dos granulócitos do paciente P6	65
<b>Figura 4.7.</b>	Morfologia dos granulócitos separados a partir de PBMC de pacientes com MF	66
<b>Figura 4.8.</b>	Imunofenotipagem dos granulócitos separados por Ficoll	67
<b>Figura 4.9.</b>	Curva de expansão e diferenciação dos eritroblastos a partir dos progenitores hematopoiéticos	70
<b>Figura 4.10.</b>	Imunofenotipagem da diferenciação e expansão dos eritroblastos a partir de CD34+ correspondentes ao controle 2	71
<b>Figura 4.11.</b>	Imunofenotipagem da diferenciação e expansão dos eritroblastos a partir de CD34+ correspondentes ao paciente P1	72
<b>Figura 4.12.</b>	Imunofenotipagem relativa às células CD34+ purificadas do paciente P6	73
<b>Figura 4.13.</b>	Morfologia das iPSCs	77
<b>Figura 4.14.</b>	Sequenciamento de <i>JAK2</i>	78
<b>Figura 4.15.</b>	Sequenciamento de éxon 4-5 no gene <i>TP53</i>	79
<b>Figura 4.16.</b>	Análise de ploidia das iPSCs derivadas do paciente P3	79
<b>Figura 4.17.</b>	Caracterização molecular correspondente à mutação no gene <i>TET2</i> dos eritroblastos e clones iPSC derivados do paciente P4	80
<b>Figura 4.18.</b>	Análise da expressão dos genes <i>TETs</i>	81
<b>Figura 4.19.</b>	Caracterização molecular correspondente ao gene <i>ASXL1</i> dos clones iPSCs derivados do paciente P4	82
<b>Figura 4.20.</b>	Sequenciamento para identificação do <i>status</i> mutacional do gene <i>ASXL1</i>	83

<b>Figura 4.21.</b>	Análise de ploidia das iPSCs derivadas do P5. ....	84
<b>Figura 4.22.</b>	Sequenciamento para identificação da mutação ..... no gene <i>ASXL1</i> e determinação da frequência alélica da mutação no gene <i>ASXL1</i> R693X no paciente P6	85
<b>Figura 4.23.</b>	Análise da deleção do cromossomo 20 do clone ..... 5 iPSC derivado do P5	86
<b>Figura 4.24.</b>	Cariograma dos clones iPSCs derivados do ..... paciente P1	86
<b>Figura 4.25.</b>	Expressão do Vírus Sendai (VS) ..... .....	89
<b>Figura 4.26.</b>	Caracterização da pluripotência dos clones ..... iPSC derivados a partir dos pacientes MF reprogramados com o sistema Vírus Sendai 1.0	90
<b>Figura 4.27.</b>	Caracterização da pluripotência dos clones ..... iPSC derivados a partir dos pacientes MF reprogramados com o sistema Vírus Sendai 2.0	91
<b>Figura 4.28.</b>	Morfologia das colônias iPSCs portadoras das ..... mutações nos genes <i>JAK2</i> <sup>V617F</sup>	93
<b>Figura 4.29.</b>	Caracterização de pluripotência de um clone ..... iPSC ( <i>JAK2</i> <sup>V617F</sup> / <i>ASXL1</i> <sup>Y951fs*1</sup> )	94
<b>Figura 4.30.</b>	Análise da diferenciação dos corpos embrioides ..... (EBs) formados a partir das iPSC.MFP3.17	95
<b>Figura 4.31</b>	Análise da diferenciação dos corpos embrioides ..... (EBs) formados a partir das iPSC.MFP6.1	96
<b>Figura 4.32.</b>	Expressão dos marcadores das três camadas ..... germinativas	97
<b>Figura 4.33.</b>	Representação das diferentes etapas da ..... diferenciação hematopoiética <i>in vitro feeder-</i> <i>free</i>	100
<b>Figura 4.34.</b>	Separação dos progenitores hematopoiéticos ..... precoce	101
<b>Figura 4.35.</b>	Ensaio de metilcelulose a partir dos ..... progenitores hematopoiéticos	103
<b>Figura 4.36.</b>	Perfil das colônias diferenciadas a partir dos ..... progenitores CD43+CD34+	104

<b>Figura 4.37.</b>	Número total de colônias formadas a partir dos progenitores hematopoiéticos dia 10 da diferenciação hematopoiética	105
<b>Figura 4.38.</b>	Potencial clonogênico dos progenitores CD43+CD34+ sorteados o dia 10	106
<b>Figura 4.39.</b>	Número total de colônias formadoras a partir dos progenitores hematopoiéticos sorteados o dia 14 da diferenciação hematopoiética	107
<b>Figura 4.40.</b>	Potencial clonogênico dos progenitores CD43+CD34+ sorteados o dia 10	108
<b>Figura 4.41.</b>	Quantificação do número de colônias CFU-M derivadas dos progenitores CD43+CD34+	110
<b>Figura 4.42.</b>	Ensaio de coágulo de plasma a partir dos progenitores hematopoiéticos	111
<b>Figura 4.43.</b>	Avaliação do potencial clonogênico dos progenitores CD43+CD34+	112
<b>Figura 4.44.</b>	Diferenciação <i>in vitro</i> de granulócitos	114
<b>Figura 4.45.</b>	Morfologia dos granulócitos <i>in vitro</i> nos diferentes estágios da granulopoiese	115
<b>Figura 4.46.</b>	Quantificação das células que pertencem à população de granulócitos diferenciados <i>in vitro</i> a partir dos progenitores derivados das diferentes iPSCs	116
<b>Figura 4.47.</b>	Comparação do tamanho dos granulócitos diferenciados <i>in vitro</i> correspondente a cada genótipo das iPSCs derivadas de P4	117
<b>Figura 4.48.</b>	Comparação do tamanho dos granulócitos diferenciados <i>in vitro</i> a partir dos clones iPSCs 5 e 32 derivados do paciente P4	117
<b>Figura 4.49.</b>	Comparação do tamanho dos granulócitos diferenciados <i>in vitro</i> a partir dos clones iPSCs 34 e 24 derivados do paciente P4	118
<b>Figura 4.50</b>	Imunofenotipagem dos granulócitos diferenciados <i>in vitro</i> controle negativo	120
<b>Figura 4.51.</b>	Imunofenotipagem dos granulócitos diferenciados <i>in vitro</i> controle clone 8	121
<b>Figura 4.52.</b>	Imunofenotipagem dos granulócitos diferenciados <i>in vitro</i> dos progenitores derivados do paciente P4 ( $CALR^{ins5}/TET2^{WT}$ )	122

<b>Figura 4.53.</b>	Imunofenotipagem dos granulócitos diferenciados <i>in vitro</i> dos progenitores derivados do paciente P4 ( $CALR^{ins5}/TET2^{G898X}$ ) .....	123
<b>Figura 5.1</b>	Esquema hipotético da arquitetura clona e ordem de aquisição das mutações dos pacientes com MF .....	136
<b>Figura 7.1</b>	Esquema experimental para análise das alterações epigenéticas nas células do paciente P4 .....	157
<b>Figure 9.1.</b>	Marcação por imunofluorescência da iPSC clone 3 derivado do paciente P2 .....	187
<b>Figure 9.2.</b>	Imunofenotipagem dos granulócitos (GR) diferenciados <i>in vitro</i> -dos progenitores derivados do paciente P4 clone 24 ( $CALR^{ins5}/TET2^{G898X}$ ) .....	191
<b>Figure 9.3.</b>	Imunofenotipagem dos granulócitos (GR) diferenciados <i>in vitro</i> -dos progenitores derivados do paciente P4 clone 34 ( $CALR^{ins5}/TET2^{WY}$ ) .....	192

## LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

**5caC:** 5-carboxilcitosina

**5fC:** 5-formilcitosina

**5hmC:** 5-hidroximetilcitosina

**5mC:** 5-metilcitosina

**6-FAM:** 6-carboxilfluoresceína

**9q:** braço curto do cromossomo 9

**AAS:** Ácido acetilsalicílico

**ANVISA:** Agência Nacional de Vigilância Sanitária

**ASXL1:** *Additional sex combs like 1*

**BCR-ABL<sup>-</sup>:** BCR-ABL negativo

**BER:** *Base excision repair*

**BMT:** *Bone marrow transplant*

**BSA:** Soro Fetal Bovino

**CALR:** Calreticulina

**cDNA:** DNA complementar

**CEMO:** Centro de Transplante de Medula Óssea

**CF:** fusão celular

**CGHa:** hibridização genômica comparativa

**CMML:** Leucemia mielomonocítica crônica

**CSC:** *Cancer Stem Cells*

**CRISPR-Cas9:** *Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats- Protein Cas9*

**CTE:** Células tronco embrionárias

**CTH:** Células tronco hematopoiética

**CTH-LT:** Células tronco hematopoiética – *Long Term*

**DAPI:** *4',6-diamidino-2-phenylindole*

**DIPSS:** *Dynamic International Prognostic Scoring System*

**DMEM:** *Dulbecco's Modified Eagles Medium*

**DMSO:** dimetilsulfóxido

**DNA:** ácido desoxirribonucleico

**DNMT1:** DNA metiltransferase 1

**DNMT3b:** DNA metiltransferase 3b

**E8:** *Essential 8 medium*

**EBs:** corpos embrioides

**EDTA:** Ácido etilenodiamino tetra-acético

**EGC:** células embrionárias germinais

**EPO:** eritropoietina

**ESA:** *Erythropoiesis-stimulating agents*

**ESC:** *Embryonic Stem Cells*

**EZH2:** *Enhancer of zeste homolog 2*

**F:** *Forward*

**FDA:** *Food and Drug Administration*

**FGFb:** *Fibroblast growth factor basic*

**FGFR1:** Receptor do fator de crescimento de fibroblasto

**FT:** Fatores de transcrição

**GAPDH:** *glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase*

**GTC:** Padrão de banda G- Tripsina- Giemsa

**HELP:** *HpaII tiny fragment enriched by LM-PCR*

**HOX:** genes *homeobox*

**HSC:** *Hematopoietic Stem Cells*

**HU:** Hidroxiuréia

**HUAP:** Hospital Universitário Antônio Pedro

**HUPE:** Hospital Universitário Pedro-Ernesto

**IARC:** *International Agency for Research on Cancer*

**IC:** controle interno

**ICM:** *Inner cell mass*

**IDH1/IDH2:** Isocitrato desidrogenase 1/ Isocitrato desidrogenase 2

**IL-3:** interleucina recombinante IL-3

**INCA:** Instituto Nacional de Câncer

**INF-alfa:** Interferon alfa

**iPSCs:** Células tronco de pluripotência induzida

**IPSS:** *International Prognostic Scoring System*

**iROCK:** inibidor ROCK

**JAK/STATs:** *Janus Kinase/* Transdutores de Sinal e Ativadores de Transcrição

**JAK2:** *Janus Kinase*

**JH2:** Região regulatória pseudo-quinase

**KISMET:** *Kinase Inhibitor Screen for Mapping Essential Targets*

**KLC:** Solução hipotônica

**KOSR:** Soro *KnockOut*

**LANCE:** Laboratório Nacional de Células Tronco Embrionárias

**LHO:** perda de heterozigosidade

**LLA:** Leucemia linfóide aguda

**LMA:** Leucemia mieloide Aguda

**LMC:** Leucemia mieloide crônica

**LSC:** Células tronco hematopoiéticas leucêmicas

**MACS:** *Magnetic Separation*

**MCD:** Doenças de mastócitos/ *Mast cell Disease*

**MEFs:** Células de fibroblastos embrionárias murinas

**MF:** Mielofibrose primária

**MFS:** Mielofibrose secundária

**MLL:** *myeloid/lymphoid or mixed-lineage leukemia*

**MOI:** multiplicidade de infecção

**MPL:** *Myeloproliferative leukemia virus oncogene*

**MSC:** Células estromais multipotentes

**NaOAc:** Acetato de sódio (C<sub>2</sub>H<sub>3</sub>NaO<sub>2</sub>)

**NGS:** sequenciamento de próxima geração

**NMPs:** Neoplasias Mieloproliferativas

**OBC:** osteoblastos

**OMS:** Organização Mundial da Saúde

**OSKM:** OCT3/4, SOX-2, KLF-4, c-MYC

**overtMF:** fase fibrótica da MF

**Parp1:** *poly(ADP-ribose) polimerase-1*

**PBMC:** células mononucleares de sangue periférico

**PBS:** *Phosphate buffer Solution*

**PCR:** Reação em cadeia da polimerase

**PDGFR alfa:** receptor tipo alfa do fator de crescimento derivado de plaquetas

**PRC2:** Complexo de repressão *Polycomb 2*

**PreMF:** fase prefibrótica da MF

**PV:** Policitemia Vera

**R:** Reverso

**REPO:** receptor de eritropoietina

**RNA:** ácido ribonucleico

**RQ-PCR:** *Real time PCR*

**RT:** Transcriptase reversa

**RTPO:** receptor de trombopoietina

**TALEN:** *Activation-Like Effector Nucleases*

**SCF:** *Stem Cell factor*

**SCNT:** *Somatic Cell Nuclear Transfer*

**SMD:** Síndromes mielodisplásicas

**SNP:** *Single nucleotide polymorphism*

**TA:** temperatura ambiente

**TAE:** Tris-acetato-EDTA

**TE:** Trombocitemia Essencial

**TET2:** *Ten-Eleven translocation 2*

**TKIs:** inibidores de tirosina quinase

**TPO:** trombopoietina

**TxG:** Complexo de ativação Trithorax

**UERJ:** Universidade Estadual de Rio de Janeiro

**UFF:** Universidade Federal Fluminense

**v/v:** volume/volume

**VS:** Vírus Sendai

**WHO:** *World Health Organization*

**wt:** *wild type*

# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1. Câncer

O câncer é a segunda maior causa de mortes do mundo. Segundo os dados da Organização mundial da saúde (OMS), 8,8 milhões de pessoas morreram em 2015 por causa da doença, e estimam-se 14 milhões de mortes no ano 2030, a maioria em países de baixa e média renda. Nesse mesmo ano, espera-se que 21,7 milhões de casos novos sejam diagnosticados com câncer. Além disso, no ano 2010, estimou-se que o custo econômico total anual causado pelo câncer é de US\$1,16 trilhões (OMS, 2018). Essas estimativas mostram a necessidade de compreender a biologia do câncer e transformar os conhecimentos em novas e eficientes terapias.

O câncer representa um grupo de doenças clonais, caracterizado pelo aumento descontrolado da proliferação, independente de fatores de crescimento e/ou citocinas, de células anormais localizadas em uma parte do organismo, denominado também como tumor maligno (OMS, 2018). Hanahan e Weinberg estabeleceram os “*Hallmarks do câncer*” com objetivo de identificar os principais fatores intrínsecos e extrínsecos que todos os tipos de câncer poderiam compartilhar (HANAHAN e WEINBERG, 2000).

Atualmente foram propostos 10 *hallmarks* do câncer encontrando-se, entre elas, como fatores intrínsecos: a proliferação autônoma e autorrenovação indeterminada, resistência aos fatores anti-proliferativos, evasão de morte e evasão do sistema imune, alteração do metabolismo e instabilidade gênica. Como fatores extrínsecos, as células do câncer têm o potencial de modificar o microambiente tecidual. Algumas células são capazes de ativar o processo de angiogênese, migrar para outra área do corpo, invadir os tecidos e desenvolver um tumor secundário, processo em múltiplas etapas chamado de metástase. Nesse contexto, o conjunto de alterações genéticas e epigenéticas nas células podem levar, por exemplo, à alteração do ciclo celular, bloqueio da diferenciação, resistência a apoptose e/ou alteração dos mecanismos de reparo do DNA (Ácido Desoxirribonucleico), entre outros ( HANAHAN E WEINBERG, 2011).

Do ponto de vista molecular, são conhecidas mutações em genes envolvidos na proliferação anormal das células do câncer e resistência a apoptose (morte celular programada) para aumentar a sobrevivência dessas células, aqueles genes são nomeados como “oncogenes”, e sabe-se que estas mutações resultam em um ganho de função, sendo capazes de ativar constitutivamente diversas vias de sinalização. Entre eles foram identificados os genes *RAS*, *ERK*, *SCR* entre outros, envolvidos com a ativação das vias de sinalização

RAS/ERK, MAPKs, AKT/mTOR, JAK/STAT, entre outras (CARNERO *et al.*, 2008, NAN *et al.*, 2015, GRONER *et al.*, 2017). Por outro lado, também foram identificadas mutações que levam à perda da função em genes supressores de tumor, apontados como os “guardiões das células”. Entre eles encontram-se os genes *TP53*, *p15INK4B* (inibidor da ciclina B-dependente da quinase 4), *p16INK4A* (inibidor da ciclina A-dependente da quinase 4) e *RBI* (retinoblastoma) (LI *et al.*, 2011, DUFFY *et al.*, 2017).

Recentemente, a análise global do genoma permitiu a identificação da “paisagem genética” de diferentes tipos de câncer, incluindo a detecção de subclonalidade e a descoberta de uma gama de novas mutações, como em genes reguladores epigenéticos. Numerosos trabalhos têm correlacionado alterações genéticas e epigenéticas dos tumores com as características clínico-patológicas observadas nos pacientes (ECKSTEIN *et al.*, 2016, COYLE *et al.*, 2017).

Um dos modelos atuais tem sugerido que o câncer poderia ter origem a partir de uma célula tronco tumoral (também nomeada *Cancer Stem Cell* - CSC). As CSCs são uma subpopulação de células apontadas como as células iniciadoras do tumor, sendo capazes de se autorrenovar e se diferenciar em distintos tipos de células como progenitores ou células mais comprometidas com a linhagem. Desse modo, as CSC podem se diferenciar de uma maneira hierárquica, como observada também nas células normais (CLEVERS, 2011). A diferença das células normais, as mutações ou alterações genéticas nas células do câncer podem levar ao bloqueio da diferenciação e proliferação anormal de um tipo determinado de células. Entre os modelos de evolução clonal mais bem compreendidos encontram-se as leucemias (HUNTLY *et al.*, 2005), como exemplo 90% dos pacientes com leucemia promielocítica aguda apresentam uma translocação cromossômica que resulta na fusão dos genes *PML* e *RAR $\alpha$*  bloqueando o processo de diferenciação na fase promielocítica (NAKAHARA *et al.*, 2014). Desse modo, mutações nas CSC poderiam resultar em clones que carregam mutações *driver*, ou seja, mutações associadas à proliferação celular, capazes de dar uma vantagem proliferativa, tornando-as clones “dominantes” (MAGEE *et al.*, 2012). Os subclones identificados em tumores sólidos e doenças hematológicas malignas podem estar funcionalmente associados à progressão da doença e/ou resistência às terapias (VAN NIEKERK *et al.*, 2016).

Os pacientes com neoplasias mieloides crônicas têm alto risco de sofrer transformação leucêmica para Leucemia Mieloide Aguda (LMA), sendo estimado que durante um período de 10 anos, entre 1-20% dos pacientes com Neoplasias Mieloproliferativas (NMPs) crônicas

sofrem transformação (CERVANTES *et al.*, 2001, 1991), fato que torna estas patologias um interessante modelo da fase inicial da leucemogênese.

## 1.2. Neoplasias mieloproliferativas (NMPs)

No ano 2016, a OMS atualizou a classificação das Neoplasias Mieloides (NM) na sua quarta edição, publicada no ano 2008 (OMS, 2018). A atualização foi baseada principalmente nos avanços da identificação de novos biomarcadores, nas alterações morfológicas, imunofenotípicas e citogenéticas observada nos pacientes, em combinação com os dados clínicos, visando melhorar os critérios diagnósticos da quarta edição.

A OMS divide as NMs e leucemias em seis grandes grupos, as Neoplasias mieloproliferativas (NMPs), neoplasias mieloides e linfoides associadas com eosinofílias e anormalidades dos genes do receptor tipo alfa do fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGFR alfa), *PDGFR* beta ou do receptor do fator de crescimento de fibroblasto 1 (FGFR1), as neoplasias mielodisplásicas/mieloproliferativas (NMD/NMP), as síndromes mielodisplásicas (SMD), leucemia mieloide aguda (LMA) e, finalmente, as leucemias linfoblásticas/linfoma (VARDIMAN *et al.*, 2009, ZERBINI *et al.*, 2011, ARBER *et al.*, 2016).

As NMPs incluem a leucemia mieloide crônica (LMC) BCR-ABL positivas (BCR-ABL<sup>+</sup>), leucemia neutrofílica crônica (LNC), leucemia eosinofílica crônica (LEC) sem outra especificação (SOE), as doenças mastocitárias (do inglês *Mast cell Disease*- MCD) e neoplasias mieloproliferativas não classificáveis. Mastocitose foi classificada como uma categoria diferente, fato que se deve às características clínicas e patológicas específicas da doença.

Além disso, formam parte do mesmo grupo a Policitemia vera (PV), Trombocitemia essencial (TE) e Mielofibrose primária (MF) (primeiramente nomeada metaplasia mieloide agnogênica (MMA) ou idiopática do baço), NMP clássicas BCR-ABL negativas (BCR-ABL<sup>-</sup>). Essas três últimas doenças originariamente foram nomeadas por William Dameshek no ano 1951 como “Desordens mieloproliferativas clássicas” (DAMESHEK, 1951). Na última atualização, a MF é classificada segundo as fases precoce/pré-fibrótica (preMF) ou fibrótica (overtMF) da doença (Tabela 1.1) (ARBER *et al.*, 2016).

**Tabela 1.1. Classificação das NMPs baseada na quarta edição dos critérios da OMS e atualizada em 2016.** (*Classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. World Health Organization (WHO)*, modificado de *ARBER et al., 2016*).

WHO myeloid neoplasm and acute leukemia classification
<b>Myeloproliferative neoplasms (MPN)</b>
Chronic myeloid leukemia (CML), <i>BCR-ABL1</i> <sup>+</sup>
Chronic neutrophilic leukemia (CNL)
Polycythemia vera (PV)
Primary myelofibrosis (PMF)
PMF, prefibrotic/early stage
PMF, overt fibrotic stage
Essential thrombocythemia (ET)
Chronic eosinophilic leukemia, not otherwise specified (NOS)
MPN, unclassifiable
Mastocytosis

As NMPs são consideradas um tipo de câncer raro devido ao fato que os valores de incidência são estimados em menos de 6 casos a cada 100.000 pessoas. A incidência das NMPs clássicas *BCR-ABL*<sup>-</sup> nos Estados Unidos é aproximadamente de 2,1 cada 100.000 pessoas (ROLLISON *et al.*, 2008). Baseados em 34 estudos, a incidência anual foi estimada entre 0,4 a 2,8 dos casos nos pacientes com PV, 0,38 a 1,7 nos pacientes com ET e 0,1 a 1 em pacientes com MF (dados para cada 100.000 indivíduos) (MOULARD *et al.*, 2014). As NMPs clássicas se originam a partir da proliferação clonal de células tronco hematopoiéticas (CTH) mutadas, o que leva a independência/hipersensibilidade a citocinas, aumento exacerbado da linhagem mielóide, principalmente das séries eritróide na PV, megacariocítica na TE e megacariocítica/granulocítica na MF (PRICK *et al.*, 2014).

Atualmente, os estudos têm identificado que alterações genéticas e epigenéticas nesse grupo de doenças são compartilhadas com outros tipos de câncer. A procura de marcas epigenéticas e assinaturas de expressão gênica são atualmente um desafio para melhorar o entendimento da biologia tanto de tumores sólidos quanto das neoplasias mielóides.

### 1.3. Mielofibrose primária

#### 1.3.1. Aspectos clínicos

A MF frequentemente se desenvolve durante anos de forma assintomática em cerca de 30% dos pacientes (CERVANTES *et al.*, 2009). Os sintomas observados incluem severas anemias, fadiga, perda de peso maior do que 10% e suores noturnos. Outros sintomas identificados nestes pacientes são febre baixa, aumento de infecções, eventos trombóticos, dispneia, esplenomegalia e hepatomegalia (CERVANTES *et al.*, 2014). Os pacientes podem apresentar sangramento associado à plaquetose extrema devido à Doença de Von

Willebrand adquirida. As principais causas de morbidade e mortalidade incluem a progressão da doença por falência na medula óssea, complicações associadas à trombose, hipertensão portal, insuficiência cardíaca e respiratória, hemorragia ou infecções e, em estágios mais avançados, transformação leucêmica (TEFFERI *et al.*, 2005). Alguns estudos têm mostrado que entre 12 e 30% dos casos com MF progridem para LMA (BAROSI *et al.*, 2008, TEFERRI *et al.*, 2009b).

### 1.3.2. Critérios diagnósticos

Na última década, a descoberta de mutações somáticas nos genes *JAK2* (*Janus Kinase 2*), *MPL* (*myeloproliferative leukemia virus oncogene*) que codifica o receptor de trombopoetina (RTPO) e, mais recentemente, o gene *CALR*, que expressa uma proteína chaperona nomeada Calreticulina, contribuiu para caracterização de clonalidade nestes pacientes. Consequentemente, esses avanços tiveram impacto nos critérios diagnósticos propostos pela OMS. Na classificação atual, os critérios diagnósticos para os pacientes com MF foram separados segundo as fases *prePMF* ou *overtPMF* e estão descritos nas tabelas 1.2 e 1.3, respectivamente (ARBER *et al.*, 2016). Existe ainda uma enorme dificuldade na distinção entre a fase *prePMF* e os estágios avançados da TE (BARBUI *et al.*, 2013). Com relação ao diagnóstico molecular, na ausência de mutações em *JAK2*, *CALR* ou *MPL*, a identificação de outras mutações, em genes como *ASXL1*, *EZH2*, *TET2*, *IDH1/IDH2*, *SRSF2* e *SF3B1*, poderia identificar a natureza clonal da MF.

**Tabela 1.2. Critérios da OMS para a fase prePMF.** Tabela retirada da última atualização da OMS, (ARBER *et al.*, 2016).

<b>WHO prePMF criteria</b>
<b>Major criteria</b>
1. Megakaryocytic proliferation and atypia, without reticulin fibrosis >grade 1*, accompanied by increased age-adjusted BM cellularity, granulocytic proliferation, and often decreased erythropoiesis
2. Not meeting the WHO criteria for BCR-ABL <sup>+</sup> CML, PV, ET, myelodysplastic syndromes, or other myeloid neoplasms
3. Presence of JAK2, CALR, or MPL mutation or in the absence of these mutations, presence of another clonal marker,† or absence of minor reactive BM reticulin fibrosis‡
<b>Minor criteria</b>
Presence of at least 1 of the following, confirmed in 2 consecutive determinations:
a. Anemia not attributed to a comorbid condition
b. Leukocytosis $\geq 11 \times 10^9/L$
c. Palpable splenomegaly
d. LDH increased to above upper normal limit of institutional reference range
Diagnosis of prePMF requires meeting all 3 major criteria, and at least 1 minor criterion

\*See Table 8.

†In the absence of any of the 3 major clonal mutations, the search for the most frequent accompanying mutations (eg, ASXL1, EZH2, TET2, IDH1/IDH2, SRSF2, SF3B1) are of help in determining the clonal nature of the disease.

‡Minor (grade 1) reticulin fibrosis secondary to infection, autoimmune disorder or other chronic inflammatory conditions, hairy cell leukemia or other lymphoid neoplasm, metastatic malignancy, or toxic (chronic) myelopathies.

**Tabela 1.3. Critérios da OMS para a fase overtPMF.** Tabela retirada da última atualização da OMS, (ARBER *et al.*, 2016).

<b>WHO overt PMF criteria</b>
<b>Major criteria</b>
1. Presence of megakaryocytic proliferation and atypia, accompanied by either reticulin and/or collagen fibrosis grades 2 or 3*
2. Not meeting WHO criteria for ET, PV, BCR-ABL1 <sup>+</sup> CML, myelodysplastic syndromes, or other myeloid neoplasms
3. Presence of JAK2, CALR, or MPL mutation or in the absence of these mutations, presence of another clonal marker, † or absence of reactive myelofibrosist
<b>Minor criteria</b>
Presence of at least 1 of the following, confirmed in 2 consecutive determinations:
a. Anemia not attributed to a comorbid condition
b. Leukocytosis $\geq 11 \times 10^9/L$
c. Palpable splenomegaly
d. LDH increased to above upper normal limit of institutional reference range
e. Leukoerythroblastosis
Diagnosis of overt PMF requires meeting all 3 major criteria, and at least 1 minor criterion

\*See Table 8.

†In the absence of any of the 3 major clonal mutations, the search for the most frequent accompanying mutations (eg, ASXL1, EZH2, TET2, IDH1/IDH2, SRSF2, SF3B1) are of help in determining the clonal nature of the disease.

‡BM fibrosis secondary to infection, autoimmune disorder, or other chronic inflammatory conditions, hairy cell leukemia or other lymphoid neoplasm, metastatic malignancy, or toxic (chronic) myelopathies.

### 1.3.3. Prognóstico

Dois sistemas foram estabelecidos a fim de estimar o prognóstico dos pacientes, sendo o primeiro nomeado IPSS (*International Prognostic Scoring System*), apontado como um sistema estático, e DIPSS (*Dynamic International Prognostic Scoring System*), sistema dinâmico, estabelecido com o intuito de prever o prognóstico dos pacientes nos diferentes estágios da doença. O sistema IPSS estratifica os pacientes com MF em quatro categorias de risco e prediz a sobrevida dos mesmos baseados nos principais fatores prognósticos adversos, que incluem idade ao diagnóstico maior do que 65 anos, hemoglobina menor do que 10g/dL, leucocitose acima de  $25 \times 10^9/L$ , 1% ou mais de blastos em circulação no sangue periférico e a presença dos sintomas constitucionais, como fadiga e sudorese, entre outros (CERVANTES *et al.*, 2009). Já o sistema DIPSS leva em consideração também as anormalidades cromossômicas, sendo a trissomia do cromossomo 8 e anomalias no -7/7q-, i(17q), inv(3), -5/5q-, 12p- ou o rearranjo no cromossomo 11q23 associado com um prognóstico desfavorável e transformação leucêmica (TEFFERI *et al.*, 2009a, 2009b, 2011).

Apesar de esses sistemas considerarem apenas fatores clínicos e hematológicos para estratificação de risco, trabalhos recentes têm evidenciado a importância de características moleculares para o prognóstico dos pacientes. Pacientes com MF sem mutações nos genes *CALR*, *JAK2* ou *MPL* (chamados, portanto de triplo negativo) apresentam prognóstico desfavorável (RUMI *et al.*, 2014). Além disso, se observou que a presença de duas ou mais mutações somáticas está associada a uma menor sobrevida livre de transformação leucêmica (LUNDBERG *et al.*, 2015) e mutações em *ASXL1*, *EZH2*, *SRSF2*, ou *IDH1/2* determinam um prognóstico adverso (VANNUCCHI *et al.*, 2013). Notadamente, pacientes sem mutações em *CALR* e com mutações em *ASXL1* (*CALR-ASXL1*<sup>+</sup>) têm menor sobrevida (TEFFERI *et al.*, 2014a) e alguns desses marcadores moleculares podem fazer parte de modelos atualizados de estratificação de risco (TEFFERI *et al.*, 2014b, 2015).

### 1.3.4. Tratamento

Diversas alternativas terapêuticas têm sido estabelecidas nos protocolos clínicos no tratamento dos pacientes com MF baseadas nos principais sintomas identificados nesses pacientes. A anemia é um dos sintomas frequentes observados nos pacientes com MF e diferentes opções terapêuticas incluem agentes estimulantes de eritropoiese (ESA-*Erythropoiesis-stimulating agents*) (Epo recombinante ou alfaepoetina) e andrógenos, como o Danazol (Nandrolona, fluoxymesterona, entre outros) (CERVANTES *et al.*, 2014). Em estágios mais avançados da MF, o tratamento para quadros de esplenomegalia pode incluir

fármacos citorreduzores como a Hidroxiuréia (HU) e, em alguns casos, a esplenectomia (CERVANTES *et al.*, 2014, CAMPOS *et al.*, 2016). Em combinação ou não com esses tratamentos, os eventos trombóticos dos pacientes podem ser tratados com Ácido acetilsalicílico (AAS). O Interferon-alfa (INF- $\alpha$ ) atualmente não é mais utilizado com frequência. No entanto, foi observado que o INF- $\alpha$  poderia suprimir a expansão do clone *JAK2* mutado, porém a toxicidade pode levar à descontinuidade do tratamento (CAMPOS *et al.*, 2016). Esses tratamentos são paliativos e uma grande parte dos pacientes não responde aos mesmos (MARTINEZ-TRILLOS *et al.*, 2010).

Com o descobrimento da mutação em *JAK2* surgiu o uso de inibidores de tirosina quinase (TKIs) da família das enzimas JAK (JAK1, JAK2, JAK3 e Tyk2) como terapia alvo. Alguns destes inibidores são o TG101348 (SAR302503, Fedratinib, Sanofi), Lestaurtinib (CEP-701, Cehalom) e XL019 (Exelixis), PU-71, MK-2206, entre outros, assim como o Ruxolitinib® Phosphate (INCB018424, Jakafi™, Incyte e Novartis) (CERVANTES *et al.*, 2014). Todos esses agentes inibem a via de sinalização JAK-STAT (Transdutores de Sinal e Ativadores de Transcrição) nos pacientes com os genes *JAK2* ou *CALR* mutados, porém não são seletivos para a enzima *JAK2* mutada.

O Ruxolitinib® Phosphate, está aprovado pela FDA (*Food and Drug Administration*) e pela ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária) para tratamento de pacientes com MF de risco alto e intermediário 2 (CAMPOS *et al.*, 2016). Entre as vantagens do uso deste fármaco foi observada uma baixa toxicidade, marcada redução do baço e fígado nos pacientes com hiato-esplenomegalia e, por fim, em 36% desses pacientes tratados durante 5 anos em fase clínica 1 e 2, foi observada uma completa redução de fibrose medular (VERSTOVSEK *et al.*, 2017).

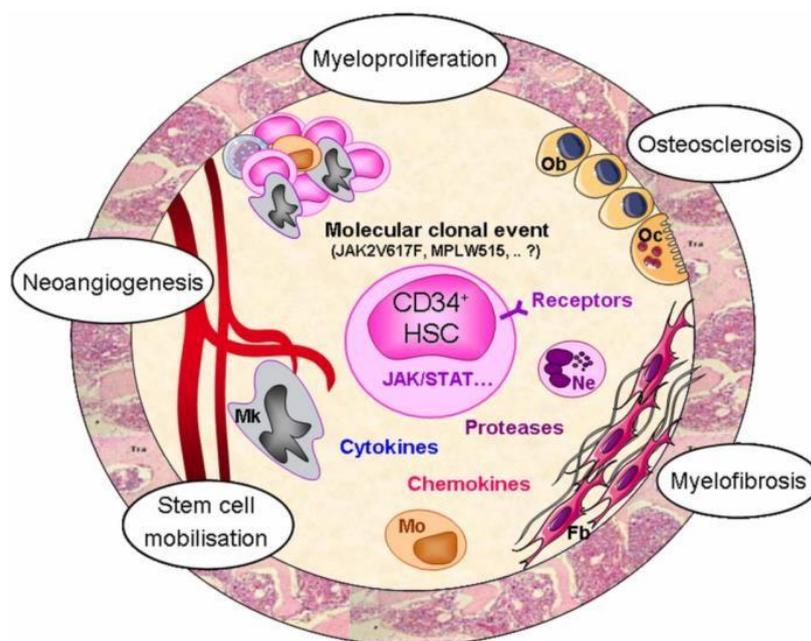
Estes tratamentos, no entanto, não têm mostrado resultados satisfatórios em prolongar a sobrevida dos pacientes com MF, sendo o Transplante alogênico de células tronco hematopoiética a única opção com potencial curativo, mesmo sendo associada com substancial morbidade e mortalidade (GANGAT *et al.*, 2011).

### **1.3.5. Fisiopatologia**

A MF é caracterizada por uma predominante proliferação de megacariócitos atípicos e granulócitos associada a mudanças no microambiente da medula óssea que levam ao aumento da produção de citocinas, fatores de crescimento e fibrose medular. Os pacientes podem apresentar osteosclerose e angiogênese (TEFFERI *et al.*, 2005, VARRICCHIO *et al.*, 2009). Esta doença tem sido classificada em duas fases, a fase celular *prePMF* como um

estado inicial que começa com hiperplasticidade da medula óssea e fibrose reticulínica mínima e progride substituindo as células hematopoiéticas normais com aumento de reticulina e colágeno secretados por fibroblastos, osteoblastos e células mesenquimais da medula óssea. A última fase é a *overt*PMF (Figura 1.1) (LATAILLADE *et al.*, 2008, BARBUI *et al.*, 2014).

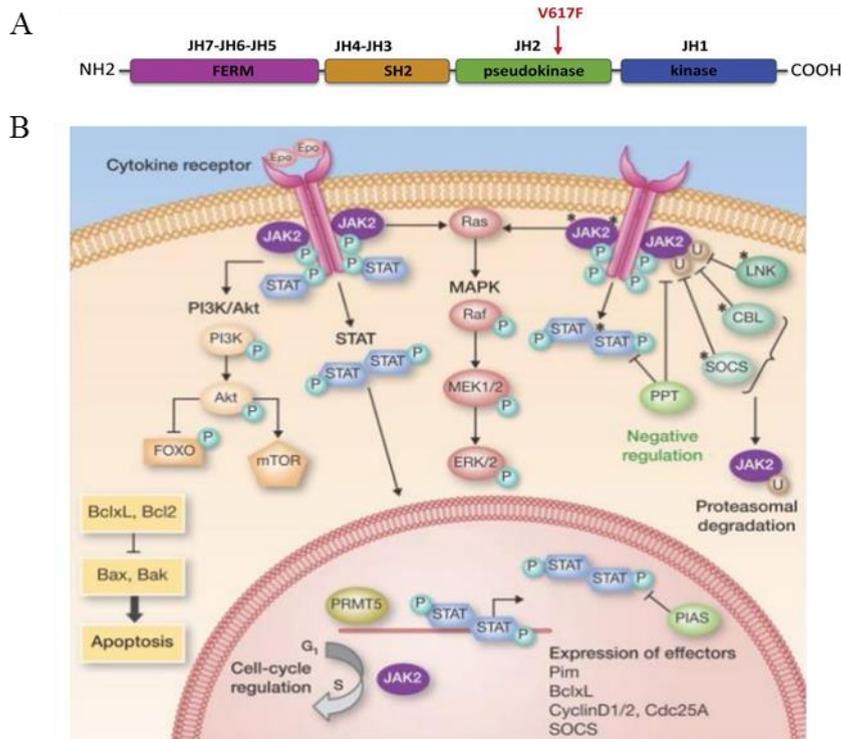
A evolução da MF é acompanhada nos pacientes pela presença de células hematopoiéticas imaturas em excesso, assim como reação leucoeritroblástica com anemias associadas a hemácias em formato de “lágrimas”, também chamadas de dacriócitos, além de altos níveis de citocinas pró-inflamatórias em circulação no sangue periférico. Estas citocinas levam à hematopoiese extramedular, principalmente associadas à esplenomegalia e hepatomegalia (PRICK *et al.*, 2014). Em um estágio avançado da doença, os pacientes podem progredir para LMA, porém os mecanismos envolvidos e o impacto do microambiente da medula óssea neste processo ainda precisam ser esclarecidos.



**Figura 1.1. Modelo hipotético dos mecanismos responsáveis pela fisiopatogênese da MF.** MK:megacariócitos, Fb: fibrose, Mo: monócitos, Ne: neutrófilos, Ob: osteoblastos (LATAILLADE *et al.*, 2008). Os processos observados no microambiente tumoral são: Mobilização de células tronco, angiogênese, mieloproliferação , osteosclerose, mielofibrose.

## 1.4. Mutações *driver* implicadas nas NMPs

Diferentes alterações genéticas têm sido identificadas nas células da medula óssea e no sangue periférico dos pacientes com NMPs. No ano de 2005, dois grupos de pesquisa identificaram uma mutação pontual com ganho de função no gene da *JAK2* (localizado no braço curto do cromossomo 9 (9q)), que resulta na troca de uma guanina por uma timina no éxon 14, levando à substituição de uma valina por uma fenilalanina na posição 617 na região regulatória pseudo-cinase (JH2) da enzima ( $JAK2^{V617F}$ ) e, conseqüentemente, à ativação constitutiva desta cinase (BAXTER *et al.*, 2005, LEVINE *et al.*, 2005) (Figura 1.2. A). A perda de heteroziguidade (LOH) do 9q é comum, resultando em homozigose para  $JAK2^{V617F/V617F}$  (TEFFERI *et al.*, 2015). Este gene mutado foi detectado em 95% de pacientes com PV e em cerca de 50% de pacientes com ET e MF (CHEN *et al.*, 2010). Mutações de ganho de função também foram identificadas no gene *MPL*, que codifica o receptor de trombopoietina, em uma frequência menor, entre 5 a 10% de pacientes com ET e MF, respectivamente (BEER *et al.*, 2008).



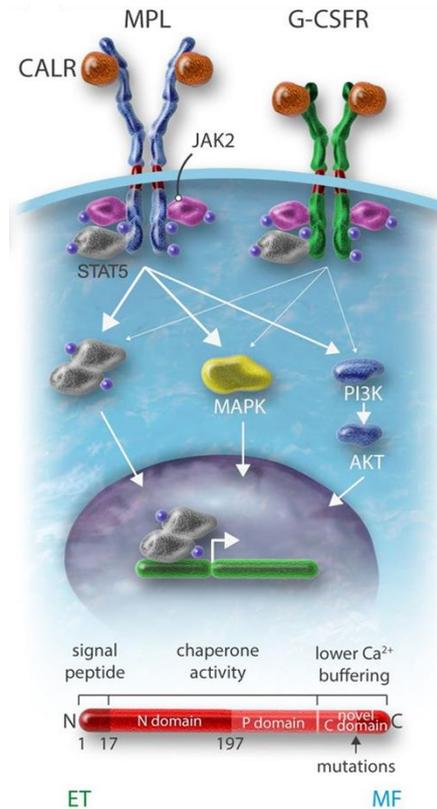
**Figura 1.2. Vias de sinalização associadas à enzima quinase JAK2. A.** Gene da *JAK2* e localização da mutação pontoal V617F na região do domínio pseudoquinase. **B.** A mutação pontual no gene  $JAK2^{V617F}$  resulta na ativação constitutiva da enzima quinase  $JAK2^{V617F}$  e consecutiva ativação das vias de sinalização associadas à proliferação. (Modificado de : MOSCA *et al.*, 2016, Meyer *et al.*, 2014)

Recentemente, mutações somáticas (deleções ou inserções, entre outras) foram descobertas no éxon 9 do gene da Calreticulina (*CALR*), localizado no cromossomo 19 (19q13.2), em cerca de 30% dos pacientes com TE e MF (NANGALIA, *et al.*, 2013, KLAMPFL *et al.*, 2013). De acordo com os dados de KLAMPFL e colegas, as mutações mais frequentes em *CALR* (em cerca de 80% dos casos) são deleção de 52pb (p.L367fs\*46) classificadas como tipo 1 e inserção de 5pb (duplicação invertida de uma sequência que precede a inserção TTGTC, p.K385fs\*47), classificada como tipo 2 (em cerca de 50% e 30% dos casos respectivamente). Na maioria das vezes essas mutações são encontradas em heterozigose (KLAMPFL *et al.*, 2013).

As mutações em *JAK2*, *CALR* e *MPL* são geralmente mutuamente exclusivas e levam à ativação constitutiva das vias de sinalização JAK-STAT, PI3K/AKT/mTOR, entre outras, ocasionando hipersensibilidade ou independência de citocinas e proliferação mieloide exacerbada (Figura 1.2.B.). Diversos estudos *in vitro* e *in vivo* demonstraram consistentemente que a ativação da via de sinalização JAK/STAT é central na fisiopatologia das NMPs e que estas mutações induzem o fenótipo mieloproliferativo (LU *et al.*, 2005, KLAMPFL *et al.*, 2013, VAINCHENKER *et al.*, 2013), portanto são consideradas mutações *drivers* ou diretoras das NMPs.

Em condições fisiológicas a diferenciação mieloide é regulada por citocinas hematopoiéticas que se ligam aos receptores na superfície celular e ativam vias de sinalização. Receptores homodiméricos como o receptor de eritropoietina (EPOR), receptor de trombopoietina (TPOR/MPL) e o receptor do fator de crescimento de colônias de granulócitos (G-CSFR) sinalizam via JAK2/STAT. Esta mesma via pode ser ativada pela presença de mutações somáticas, principalmente *JAK2*, *CALR* e *MPL*.

*CALR* é uma chaperona localizada no retículo endoplasmático (RE). Recentemente foram descobertas mutações *frameshift* que levam à modificação do domínio C-terminal da proteína. Estudos *in vitro* e *in vivo* sugerem que a proteína ative constitutivamente a via JAK/STAT quando mutada, devido ao reconhecimento por alta afinidade do domínio extracelular do receptor MPL no RE. Posteriormente o receptor, em conjunto com *CALR*, é transportado à membrana celular ativando as vias JAK/STAT, MAPKs, e PI3K/AKT (VAINCHENKER AND KRALOVICS *et al.*, 2017) via do TPOR e, em menor grau, a via de G-CSFR. No contexto da linhagem megacariocítica, ainda não está esclarecido como as vias de sinalização intracelular são diferentemente ativadas por *CALR* e *JAK2* mutados (Figura 1.3).



**Figura 1.3. Vias de sinalização associadas à *CALR* mutada.** *CALR* mutado associa-se com alta afinidade ao receptor MPL, ainda imaturo, no retículo endoplasmático, juntos são transportado à membrana celular resultando na ativação constitutiva das vias de sinalização JAK/STAT, MAPKs, e PI3K/AKT (figura acima). Imagem ilustrativa do gene *CALR* (figura embaixo) (VAINCHENKER and KRALOVICS *et al.*, 2017).

Diversos trabalhos têm comparado as assinaturas de expressão gênica associadas à via JAK-STAT em células que carregam mutações *driver* do tipo  $JAK2^{V617F}$  ou *CALR* mutado. Em pacientes com TE positivos para  $JAK2^{V617F}$  foi observado o aumento da expressão de genes alvos regulados por *STAT3* e *STAT5*, enquanto para pacientes com *CALR* mutado não foi observada a mesma assinatura gênica (LAU *et al.*, 2015).

Posteriormente foi publicado por Kollman e colegas um estudo que visa identificar as cinases envolvidas em vias de sinalização em modelos celulares *CALR* mutado. Os resultados sugerem que *CALR* mutado poderia estar envolvido com a via de sinalização JAK/STAT *downstream*, assim como na regulação da diferenciação megacariocítica mediante as vias MAPKs (KOLLMAN *et al.*, 2017). Diferenças entre a sinalização induzida por  $CALR^{ins5}$  e  $CALR^{del52}$  ainda estão sendo investigadas.

## 1.5. Mutações em reguladores epigenéticos nas NMPs

Além das mutações relacionadas à sinalização intracelular, o uso das novas tecnologias em larga escala, como o sequenciamento de próxima geração (NGS) e hibridização genômica comparativa (CGHA) permitiram a descoberta de novas alterações/mutações nestas neoplasias, agora em genes reguladores epigenéticos. Estas mutações são comuns a outras neoplasias mieloides e podem co-ocorrer com os genes mutados *JAK2* ou *CALR* e, apesar de não serem diretamente responsáveis pelo fenótipo mieloproliferativo, poderiam modular o epigenoma, influenciando o fenótipo e/ou progressão das NMPs (MARTINEZ-AVILEZ *et al.*, 2012).

Em geral, o perfil epigenético global de células tumorais é caracterizado por uma hipometilação global, com sítios específicos hipermetilados identificados principalmente em regiões promotoras ou de *splicing*, por exemplo, em genes supressores de tumor (SHEN *et al.*, 2013). Mutações em genes reguladores epigenéticos ou alterações em regiões promotoras hipermetiladas, que levam ao silenciamento da expressão gênica, também foram amplamente caracterizados em diversos tumores (SHARMA *et al.*, 2010). Entre os genes alterados se encontram os genes relacionados à regulação dos *check-points* do ciclo celular ou de reparo do DNA, como é o caso do gene *BRCA1* (breast cancer 1) (MOCHETTA *et al.*, 2016, ZHAO *et al.*, 2016). Desse modo, os estudos têm evidenciado a relação que existe entre as anormalidades genéticas e as mudanças epigenéticas que afetam as células de câncer (FEINBERG *et al.*, 2004).

Recentemente perfis epigenéticos globais aberrantes têm sido estudados em pacientes com neoplasias mieloides e associados com a progressão da doença (ALVAREZ *et al.*, 2010). Nischal e colegas avaliaram o perfil de metilação global dos neutrófilos de 29 pacientes com PV, TE e MF utilizando a técnica HELP (HpaII tiny fragment enriched by LM- PCR) assay, sendo deste modo avaliadas 50.000 CpGs correspondentes a 14.000 regiões promotoras reguladoras de expressão gênica e comparadas com os controles (NISCHAL *et al.*, 2012). Os resultados mostraram que a MF representa um grupo com perfil de metilação característico. Neste mesmo estudo, pacientes com MF com alterações em *ASXL1* foram agrupados por semelhança em análises de similaridade das assinaturas gênicas, sugerindo que a disrupção deste gene estaria relacionada a um padrão comum de metilação do DNA. (NISCHAL *et al.*, 2013).

Alterações epigenéticas em regiões ricas em CpG, avaliadas por genome-wide DNA methylation arrays, foram associadas principalmente à hipermetilação global identificada em pacientes com NMP triplo negativos (*JAK2*<sup>-</sup>, *MPL*<sup>-</sup> e *CALR*<sup>-</sup>) que sofreram transformação

leucêmica. Os pacientes foram divididos entre dois grupos: crônica e transformado. Um total de 179 genes foi identificado como genes diferencialmente metilados. A maioria destes genes foi associada ao desenvolvimento hematopoiético e resposta inflamatória, como as interleucinas IL-23 e IL-25 (regiões promotoras hipermetiladas), apontadas como potentes moléculas inibitórias do crescimento tumoral e anti-metastáticas. Deste modo, foi sugerido que as alterações epigenéticas teriam um papel importante na patogênese destes pacientes, assim como no processo de transformação leucêmica (PEREZ *et al.*, 2013).

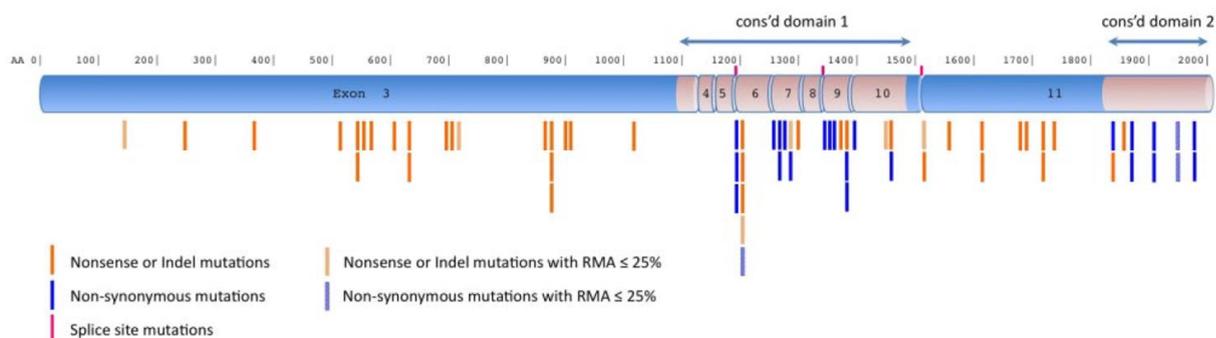
### 1.5.1. Enzimas TETs como reguladores epigenéticos nas NMPs

A família de enzimas TETs é composta por três membros, TET1, 2 e 3 (LOENARZ AND SCHOFIELD, 2009). Estas enzimas são dioxigenases dependentes de  $\alpha$ -cetoglutarato e Fe (II), capazes de oxidar a citosina metilada (5mC) e catalisar a conversão em 5-hidroximetilcitosina (5hmC), formando também os produtos oxidativos 5-formilcitosina (5fC) e 5-carboxilcitosina (5caC), que são posteriormente reconhecidos e eliminados pelas enzimas que compõem a maquinaria de reparo por excisão de bases (Base excision repair-BER) (ITO *et al.*, 2011, DAO *et al.*, 2014). Embora este processo oxidativo seja um dos mecanismos envolvidos nas etapas da desmetilação ativa, os níveis de 5hmC também foram associados com o processo de desmetilação passiva, visto que as DNMT1 tem baixa afinidade pelas bases modificadas 5hmC (PFEIFER *et al.*, 2013).

*TET1* e *TET2* têm sido implicadas em câncer. *TET1* foi identificada em uma alteração citogenética que resulta em uma fusão com o gene MLL (*mixed-lineage leukemia*) em casos raros de LMA e Leucemia linfóide aguda (LLA) com t(10:11) (q22;q23). *TET2* está localizado na região cromossômica 4q24, comumente deletada ou envolvida em rearranjos cromossômicos em neoplasias mielóides (SOLARY *et al.*, 2014). Mutações e/ou deleções são frequentes no gene *TET2* e foram identificadas ao longo de todas as regiões do gene em pacientes com NMPs (Figura 1.4), detectadas em cerca de 20% nos pacientes com MF, 5-9% e 16-22% nos pacientes com TE e PV respectivamente (HA *et al.*, 2014, MILLS *et al.*, 2014).

A maioria das mutações em *TET2* são heterozigotas e a expressão do alelo selvagem é mantida. Em um estudo realizado em modelo animal foi mostrado que a haploinsuficiência de *TET2* seria suficiente para contribuir com a transformação hematopoiética (MORAN-CRUSIO *et al.*, 2011). *TET2* pode sofrer perda de heterozigosidade (LHO) da região cromossômica 4q22 (DELHOMMEAU *et al.*, 2009). Diversos trabalhos mostraram que os

pacientes com NMPs apresentam perda de uma cópia (deleções ou microdeleções) ou de ambas as cópias do gene *TET2*, e 10% dos pacientes com LMA apresentaram inativação bialélica de *TET2*, sendo sugerido que *TET2* tenha um papel de gene supressor de tumor (DELHOMMEAU *et al.*, 2008, 2009, LANGEMEIJER *et al.*, 2009).



**Figura 1.4. Mapa genético das regiões que codifica a enzima TET2.** O gene *TET2* está constituído por 11 éxons. Forma parte da estrutura do gene os domínios 1 e 2. No primeiro domínio encontra-se a região rica em cisteína e um domínio nomeado DSBH (dobre cadeia de hélice  $\beta$ , do inglês double stranded  $\beta$ -helix) localizado entre o éxon 7 e 11, cuja função é reconhecer os cofatores Fe (II) e 2 oxoglutarato (2OG). A interação de ambos os domínios formar a região catalítica da enzima (SMITH *et al.*, 2010).

Diversos estudos relacionaram mutações ou deleções de *TET2* à diminuição ou perda da função catalítica junto com a diminuição dos níveis de 5hmC quando comparado com pacientes com *TET2* não mutado (LANGEMEIJER *et al.*, 2009, KO *et al.*, 2010, PRONIER *et al.*, 2010). O efeito das mutações em *TET2* no perfil de metilação do DNA foi investigado em pacientes com NMPs e LMA. Essas mutações foram associadas com hipermetilação global nos pacientes com LMA, e mutações em *TET2* foram correlacionadas com assinaturas específicas de hipermetilação similares às assinaturas observadas em pacientes com LMA com *IDH1/2* mutado (FIGUEROA *et al.*, 2010). Por outro lado, em um estudo com amostras de pacientes com SMD e outras neoplasias mieloides que carregam mutações em *TET2* e baixos níveis de 5hmC, evidenciou-se diversas regiões hipometiladas (KO *et al.*, 2010). Deste modo, os resultados observados até o momento são divergentes em relação ao impacto das mutações na metilação do DNA destes pacientes.

Com relação ao papel biológico de *TET2* em células hematopoiéticas, estudos realizados em modelo animal *TET2*<sup>-/-</sup>, *TET2*<sup>+/-</sup> e trabalhos *in vitro* que silenciaram a expressão de *TET2* tanto em células humanas quanto de camundongo, levaram a resultados similares: aumento da autorrenovação das CTH-LT (células tronco hematopoiética – Long Term), aumento da mieloproliferação, granulomonocitose, hematopoiese extramedular e

esplenomegalia. Os progenitores hematopoiéticos deficientes em *TET2* derivados de pacientes com NMP mostraram um aumento da autorrenovação e, quando induzida a diferenciação, foi observado um aumento da linhagem mielomonocítica (MORAN-CRUSIO *et al.*, 2011, PRONIER *et al.*, 2011).

Além desse papel na hematopoiese, relatos na literatura mostraram que as enzimas TETs têm papel na manutenção do estado de pluripotência. Mutações ou deleções em *TET* poderiam resultar em alteração da expressão de fatores de transcrição chave como NANOG, associados com o desenvolvimento embrionário, autorrenovação e pluripotência das células tronco embrionárias (CTE) (ITO *et al.*, 2010, KOH *et al.*, 2011). Em CTE de camundongo foi demonstrado que *Tet1* e *Tet2* regulam os níveis de 5hmC e que estas enzimas poderiam estar associadas com o estado de pluripotência das CTEs.

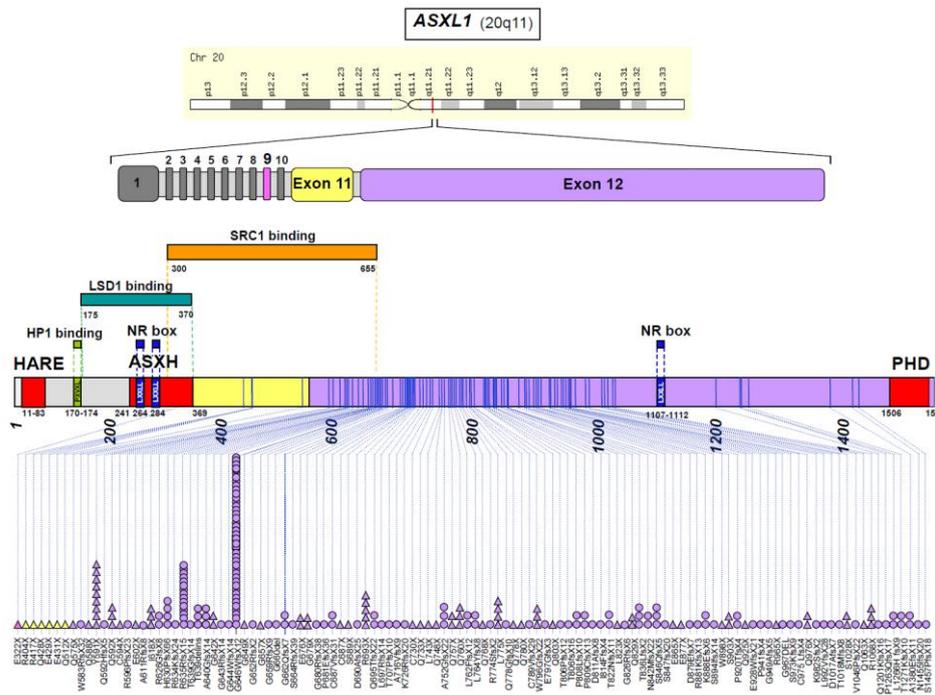
Além disso, os autores sugerem que a expressão de *Tet1* e *Tet2* poderia ser regulada diretamente por Oct-4 e Sox-2, mas não por Nanog, genes chaves para manutenção da pluripotência e autorrenovação das CTEs (KHO *et al.*, 2011). Em um estudo com CTEs humanas deficientes de *TET2* foi analisada a expressão gênica de marcadores específicos das três camadas germinativas. Após diferenciação espontânea a partir do ensaio de formação de corpos embrioides foi observado um aumento da diferenciação na camada neuroectodérmica e diminuição da diferenciação das camadas germinativas: endoderma e mesoderma. Desse modo, os autores sugerem que *TET2* poderia estar envolvido na regulação da diferenciação dessas duas últimas camadas (LANGLOIS *et al.*, 2011).

Trabalhos recentes apontam que as enzimas TETs poderiam ter um papel importante no processo de reprogramação celular para geração de células de pluripotência induzida (iPSCs). Doege e colegas mostraram que Tet2 e Parp1 (*poly(ADP-ribose) polimerase-1*) recrutam diretamente Nanog e Esrrb e, quando deletadas, levam à falha na manutenção do estado de pluripotência e inibição da expressão desses genes (DOEGE *et al.*, 2013).

### **1.5.2. ASXLI como regulador epigenético nas NMPs**

A família da proteína ASXL homólogo da *Drosophila melanogaster* (*Asxl*) está composta por três isoformas: ASXL1, 2 e 3. O gene *ASXLI* está localizado na região cromossômica 20q11 e a proteína ASXL1 interage com o complexo de repressão *Policomb 2* (PRC2) e com o complexo *Trithorax* (FISHER *et al.*, 2003, GELSI-BOYER *et al.*, 2012), tendo um papel dual no silenciamento e ativação gênica. *ASXLI* é capaz de formar um complexo com a proteína BAP1.

Essas proteínas, em combinação, têm atividade deubiquitinase para a histona H2A ubiquitinada na lisina 119 (H2AK119) (SCHEUERMAN *et al.*, 2010) (Figura 1.5). *ASXL1* pode desempenhar um papel na diferenciação e autorrenovação celular através do recrutamento de proteínas envolvidas no reconhecimento por alta afinidade de marca de histonas associadas à repressão gênica, como H3K27me3 (histona 3, lisina 27, trimetilada) (ABDEL-WAHAB *et al.*, 2012).



**Figura 1.5. Mapa genético e descrição dos domínios do gene *ASXL1*.** O gene *ASXL1* codifica uma proteína nuclear que consta das seguintes regiões: domínio C-terminal HARE-HTH (*helix-turn-helix domain*) e o domínio N-terminal nomeado PHD (*plant homeodomain*). Na parte central formam parte o domínio globular ASXH cujo complexo policombo de repressão se associa a *ASXL1* adquirindo uma função deubiquitinase (PR-DUB, polycomb repressive deubiquitinase) (GELSI-BOYER *et al.*, 2012).

A inibição de *ASXL1* levou à perda das marcas epigenéticas da histona H3K27me3 e resultou em uma diferenciação hematopoiética anormal (FISCHER *et al.*, 2011, ABDEL-WAHAB *et al.*, 2012). Do ponto de vista molecular, estudos sugerem que *ASXL1* poderia regular a expressão de genes da família *homeobox* (HOX) como HOXB3, HOXA5-A, além dos genes *SMAD3* e *RUNX1*, genes associados à diferenciação (NISCHAL *et al.*, 2012, ABDEL-WAHAB *et al.*, 2012). Além da associação com a modulação da diferenciação hematopoiética, estudos sugerem que a expressão de *ASXL1* poderia ser regulada diretamente por genes de pluripotência como SOX2, sugerindo um papel na autorrenovação e pluripotência das células tronco (KANG *et al.*, 2012).

Em NMPs, a maior frequência de mutações no gene *ASXL1* foi identificada no éxon 13 e detectada entre 20 e 40% dos pacientes com MF e raramente em PV e TE (GELSI-BOYER *et al.*, 2012, STEIN *et al.*, 2011). Foi evidenciado que determinadas mutações em *ASXL1* poderiam levar à perda da função, sendo essas mutações na sua maioria identificadas em regiões adjacentes ao domínio conservado (ABDEL-WAHAB *et al.*, 2012). Relatos na literatura têm sugerido que a haploinsuficiência em *ASXL1* poderia contribuir na aquisição de um fenótipo mieloproliferativo na MF e pós-PV/ET (CARBUCCIA *et al.*, 2009, STEIN *et al.*, 2011). Além disso, estudos *in vivo* mostraram que a perda da função de *ASXL1* em cooperação com N-RAS mutado poderia ser um evento chave para iniciar a MSD/MPN (TEFFERI *et al.*, 2008). Por outro lado, estudos recentes sugerem que a proteína mutante adquire novas funções, como a interação com proteínas contendo bromodomínio (YANG *et al.*, 2018).

Apesar de as mutações em *TET2* e *ASXL1* terem implicações clínicas (TEFFERI *et al.*, 2009c), o papel funcional das mutações nestes genes no epigenoma destas doenças ainda não foi totalmente esclarecido. Do mesmo modo, ainda precisa ser elucidado se as alterações moleculares ocorrendo em regiões diferentes do gene (domínio catalítico ou não) têm significados biológicos distintos e como estas alterações colaboram com mutações em reguladores de sinalização intracelular.

## **1.6. Mutações implicadas na transformação leucêmica**

Além das mutações associadas com proliferação celular e sobrevida, outras mutações adicionais foram identificadas nos genes *TP53*, *TET2*, *SH2B3*, *ASXL1* e *IDH1* e já associadas com a transformação leucêmica. Evidências em estudos clínicos têm mostrado que os pacientes com NMP em estágios avançados que carregam mutações somáticas e posterior perda de heterozigosidade do gene *TP53* apresentam maior risco de desenvolver LMA (LUNDBERG *et al.*, 2014, RAMPAL *et al.*, 2014). Contudo, os mecanismos que contribuem para a transformação das NMPs ainda não foram esclarecidos.

### **1.6.1. Evolução clonal das mutações somáticas**

Muitos estudos têm se focado em entender a organização e aquisição dos eventos mutacionais dos pacientes com NMPs, determinando a arquitetura clonal nessas doenças. As análises de clonalidade em pacientes com NMP *JAK2*<sup>V617F</sup> mostraram que tanto *TET2* quanto *DNMT3b* mutados poderiam estar envolvidos em eventos de dominância clonal e

que aquelas mutações poderiam ter sido adquiridas previamente à  $JAK2^{V617F}$  ou coexistir como um clone independente, também referido como “doença biclonal”. Mutações em *ASXL1* e *EZH2* poderiam ser selecionadas tanto como eventos pre- $JAK2^{V617F}$  quanto pós  $JAK2^{V617F}$  ou como eventos separados (LUNDBERG et al., 2014, SCHAUB et al., 2010).

Estas análises de heterogeneidade clonal sugerem que os diferentes eventos mutacionais em genes reguladores epigenéticos poderiam preceder ou surgir após as mutações em reguladores de sinalização, ou podem coexistir em clones distintos. Um melhor esclarecimento da diversidade clonal destes pacientes permitirá entender os diferentes fenótipos observados nas NMPs clássicas.

O impacto das diferentes categorias de mutações na arquitetura clonal das NMPs sugere que alguns destes eventos, como as mutações em *TET2*, são importantes para a expansão do compartimento mais primitivo (precursores hematopoiéticos) enquanto outras mutações, como as observadas em *JAK2*, levam a uma proliferação exacerbada de compartimentos mielóides mais maduros.

Como já descrito, alguns dos genes reguladores epigenéticos mutados, como *TET2* e *ASXL1*, tem relações de regulação gênica com genes protagonistas nos processos de manutenção de pluripotência e/ou determinação de diferenciações celulares através de programas gênicos específicos, como *SOX2* e *NANOG*, entre outros.

Estes aspectos, associados às marcas epigenéticas específicas já descritas para células carregando mutações em *TET2* e/ou *ASXL1* sugerem que estes genes podem ter um papel preponderante na manutenção e expansão de células mais indiferenciadas na hierarquia de diferenciação das NMPs. Estudos do impacto destes genes na manutenção destas células mais indiferenciadas são fundamentais. Neste sentido, nenhum modelo é mais emblemático neste contexto do que a utilização de células tronco embrionária ou de pluripotência induzida.

## **1.7. Células tronco (Stem Cells)**

### **1.7.1. Células tronco embrionárias humanas (hESC)**

Nos últimos anos, o estudo sobre o desenvolvimento embrionário humano tem mostrado grandes avanços no entendimento potencial das células e diferenciação celular. As células em estágio de desenvolvimento mais precoces, como são o zigoto ou as células tronco da mórula, são capazes de gerar um organismo completo dando origem tanto ao tecido embrionário quanto extraembrionário (trocetoderma ou epiderme definitivo) mantendo, desta maneira, o estado de totipotência.

Durante esse estágio inicial do desenvolvimento, as células da mórula se compactam e, por um processo de cavitação, formam uma estrutura cística chamada blastocisto. As células tronco-embrionárias humanas (hESC- *human Embryonic Stem Cells*) têm sido derivadas a partir da massa celular interna (ICM- *Inner cell mass*) dos blastocistos (epiblasto) e exibem a capacidade ilimitada de autorrenovação, ou seja, são capazes de proliferar gerando células com características idênticas à original e, quando diferenciadas, têm o potencial de gerar todas as células somáticas derivadas das três camadas germinativas: Mesoderma, Endoderma e Ectoderma, porém perderam a capacidade de se diferenciar nos tecidos extraembrionários, sendo, por definição, este último o estado de pluripotência.

No ano 1998, pela primeira vez foram derivadas as primeiras linhagens de ESC a partir de blastocistos humanos por J. Thomson e colaboradores (THOMSON *et al.*, 1998) e, posteriormente, outros grupos também derivaram ESC humanas. Estas linhagens são amplamente utilizadas para estudos de desenvolvimento embrionário, diferenciação celular *in vitro*, testes de novos fármacos terapêuticos, entre outros. Contudo, sérias considerações éticas tanto na derivação, quanto no uso das células tronco humanas a partir de embriões restringem a aplicação das mesmas. Deste modo, novas fontes alternativas de células tronco pluripotentes foram necessárias.

Três métodos foram estabelecidos para produzir células *ESC-like* a partir de células somáticas: transferência nuclear de célula somática (SCNT- *somatic cell nuclear transfer*), fusão celular e superexpressão de quatro fatores de transcrição (FT), Oct-3/4, Sox-2, Klf-4 e c-Myc (OSKM), gerando, deste modo, as células tronco de pluripotência induzidas (iPSCs).

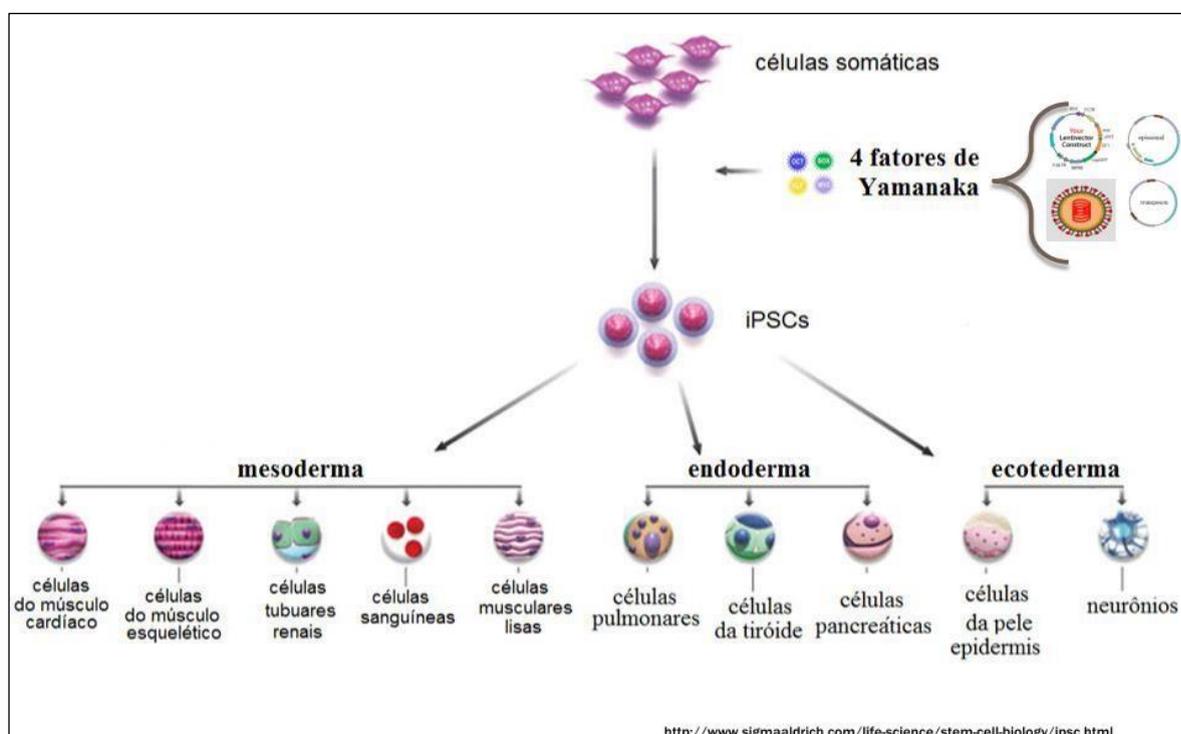
### **1.7.2. Células tronco de pluripotência induzida (iPSCs)**

O sucesso da reprogramação de células somáticas para geração de iPSCs foi primeiro mostrado em fibroblastos embrionários derivados de camundongos (MEF) em 2006 e em fibroblastos adultos humanos em 2007 (TAKAHASHI *ET al.*, 2006 e 2007). No primeiro experimento, foram selecionados 24 FTs associados ao estado de pluripotência e autorrenovação das ESCs, e utilizando vetores virais para superexpressão de cada um desses FTs, as células MEFs foram transduzidas, a fim de tornar as células somáticas células pluripotentes. Posteriormente, quando observaram o surgimento de células com morfologias similares às ESCs, aqueles fatores foram reduzidos e recombinados visando identificar o mínimo de fatores necessários para induzir a pluripotência.

Deste modo, foi estabelecido o primeiro protocolo de reprogramação celular onde uma célula IPSC foi gerada a partir de células somáticas pela introdução e expressão forçada

de quatro fatores de transcrição OSKM (Figura 1.6). Em experimentos posteriores, outros trabalhos mostraram que os fatores cruciais da reprogramação são OCT-3/4 e SOX2 e os outros dois fatores restantes poderiam ser substituídos por NANOG e LIN28 (NAKAGAWA *ET al.*, 2008, YU *et al.*, 2007).

Contudo, nestes últimos protocolos a eficiência da reprogramação se mostrou menor, com relação ao número e tempo de surgimento de colônias iPSCs. No ano 2012, Yamanaka, o pesquisador que coordenou esta inovação biotecnológica, foi laureado com o prêmio Nobel em Medicina. A reprogramação das células humanas para gerar iPSCs traz uma alternativa promissora para substituir as ESCs, revolucionando o campo da pesquisa e da medicina regenerativa atual, assim como nas aplicações terapêuticas vigentes e nos estudos dos mecanismos de manutenção da pluripotência e nos processos de diferenciação celular.



**Figura 1.6. Esquema da reprogramação de células somáticas para geração de células pluripotentes induzidas (iPSCs).** As células somáticas são reprogramadas induzindo a expressão forçada de 4 genes de pluripotência, também chamados fatores de Yamanaka (*OCT-4/3*, *SOX-2*, *KLF-4* e *c-MYC*). As iPSCs podem ser rediferenciadas em qualquer tipo de célula derivadas dos três folhetos embrionários.

### 1.7.3. Reprogramação celular como modelo de estudo

As células da medula óssea, cordão umbilical e do sangue periférico, assim como outras células somáticas, têm sido reprogramadas com sucesso utilizando diversos protocolos de reprogramação celular. Neste contexto, iPSCs têm sido utilizadas amplamente como modelagem *in vitro* em diversas patologias, incluindo as doenças hematológicas,

sendo capazes de recapitular a doença *in vitro* (SALIBA *et al.*, 2013, ANTONY-DEBRÉ *et al.*, 2015).

A tecnologia das iPSCs oferece uma melhor plataforma para estudar modelagem de doenças quando comparada com outras metodologias que utilizam modelos de animais geneticamente modificados ou linhagens celulares transformadas, sendo uma das poucas ferramentas que permitem estudar mecanismos moleculares e epigenéticos, transformação leucêmica, testes de drogas e *screening* de novos alvos terapêuticos na medicina personalizada. Recentemente diversos trabalhos têm utilizado ferramentas de edição genética como TALEN e CRISPR-Cas9 para corrigir mutações em genes *driver* nas células iPSCs derivadas de pacientes com Anemia Falciforme, Doenças plaquetárias familiares, entre outras, cujo objetivo é reverter o fenótipo da doença para condições normais, como observado no modelo de iPSC controles (doadores saudáveis) (LIZUCA *et al.*, 2015, OSBORN *et al.*, 2016, FLYNN *et al.*, 2015).

No processo de reprogramação celular, a maquinaria epigenética combina múltiplas proteínas e enzimas interconectadas que regulam o *status* da cromatina e expressão gênica. As células somáticas apresentam assinaturas epigenéticas específicas do tipo do tecido ao que a célula pertence. Já as células tronco pluripotentes possuem uma assinatura epigenética única correspondente aos sítios ativos de genes associadas à pluripotência e autorrenovação, como são as marcas H3K4me3, H3K36me3, assim como aumento do *status* de histonas acetiladas e desmetilação do DNA correspondentes às regiões promotoras dos genes de pluripotência. Neste processo de desmetilação as enzimas TETs têm um papel importante na aquisição do estado da pluripotência (HU *et al.*, 2014). Por sua vez, as regiões dos genes tecido-específico permanecem inativadas com marcas epigenéticas associadas à repressão.

Além disso, no estado de pluripotência as regiões da expressão gênica de genes associados à diferenciação das três camadas germinativas apresentam elevados níveis de marcas epigenéticas bivalentes como H3K4m3 e H3K27m3. Os genes com marcas bivalentes permanecem em um estado de equilíbrio (*poised state*) que facilita a ativação ou repressão gênica pela maquinaria epigenética. Deste modo, mudanças no microambiente ou estímulos por fatores de crescimento podem levar à diferenciação destas células pluripotentes (GTADYCH *et al.*, 2015).

Dado que foram observadas alterações epigenéticas no perfil global de células do câncer, os reguladores epigenéticos poderiam ter um papel importante por contribuir nas mudanças epigenéticas. A utilização das iPSCs como modelo de estudo epigenético oferece uma nova tecnologia, representando um novo modelo *in vitro* da avaliação da associação de lesões moleculares, manutenção da pluripotência, e *status* de metilação

No nosso modelo de estudo, considerando que cada célula somática é capaz de se transformar em uma colônia iPSC, a indução de pluripotência a partir de células somáticas mutadas dos pacientes permite recapitular *in vitro* a heterogeneidade clonal dos pacientes. Desse modo, no caso de um paciente que carregue dois subclones com diferentes genótipos, o modelo fornece a possibilidade de obter duas colônias correspondente a cada mutação identificada no pool de células somáticas reprogramadas. Além disso, durante a reprogramação, as iPSCs sofrem um processo de desmetilação global, perdendo o perfil original de marcação epigenética, porém mantendo as mutações presentes nas células somáticas primárias dos pacientes (PAPP *et al.*, 2013).

Além disso, baseados no potencial de pluripotência das iPSCs é possível obter células hematopoéticas mieloides, o que permite estudar o impacto das mutações nesse processo. Assim, nesse modelo é possível avaliar o impacto das mutações genéticas em reguladores epigenéticos, como *TET2* e *ASXL1*, no restabelecimento do perfil de marcas epigenéticas. Por fim, a diferenciação hematopoética a partir das iPSCs permite o estudo *in vitro* de mecanismos associados com a fisiopatologia da doença. Desse modo, no contexto da diferenciação hematopoética, é possível reproduzir a diferenciação e avaliar o impacto das mutações presentes na célula hematopoética original nas marcas epigenéticas associadas com a doença.

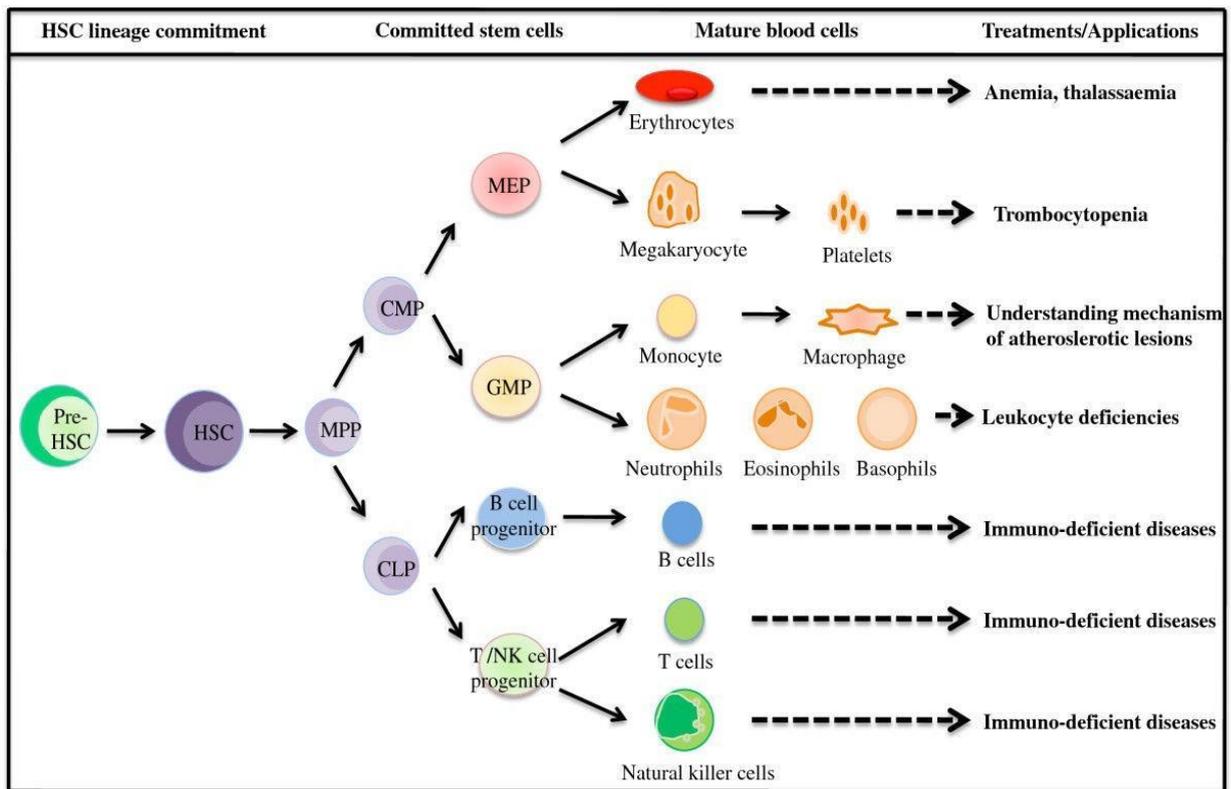
### **1.8. Células tronco hematopoiéticas e diferenciação hematopoiética**

O sistema hematopoiético está constituído por células em estágios iniciais (em um estado pouco diferenciado) capazes de se diferenciar em células maduras do sangue. A diferenciação hematopoética ocorre tanto na embriogênese quanto na vida adulta. Till e McCulloch, baseados em experimentos *in vivo*, observaram o crescimento de colônias hematopoiéticas nomeadas Unidades formadoras de colônias do baço (CFU-S do inglês *Colony-Forming Unit-Spleen*). Aquelas colônias que surgiram foram avaliadas a partir do baço de camundongos após 14 dias do transplante de células hematopoiéticas murinas na medula óssea. No estudo, os autores mostraram que uma população minoritária de células, era capaz de manter e reconstituir o sistema hematopoiético completo nos camundongos (TILL and MCCULLOCH *et al.*, 1963).

No ano 1980 foi sugerido que aquelas células fossem chamadas de CTHs, cuja característica principal é a capacidade de se-autorrenovar, proliferar e diferenciar tanto nas células da linhagem mieloide, quanto em células da linhagem linfóide. No mesmo trabalho, os

autores sugerem um dos primeiros modelos da organização hierárquica da linhagem mieloide na hematopoiese em murinos (TILL and MCCULLOCH *et al.*, 1980).

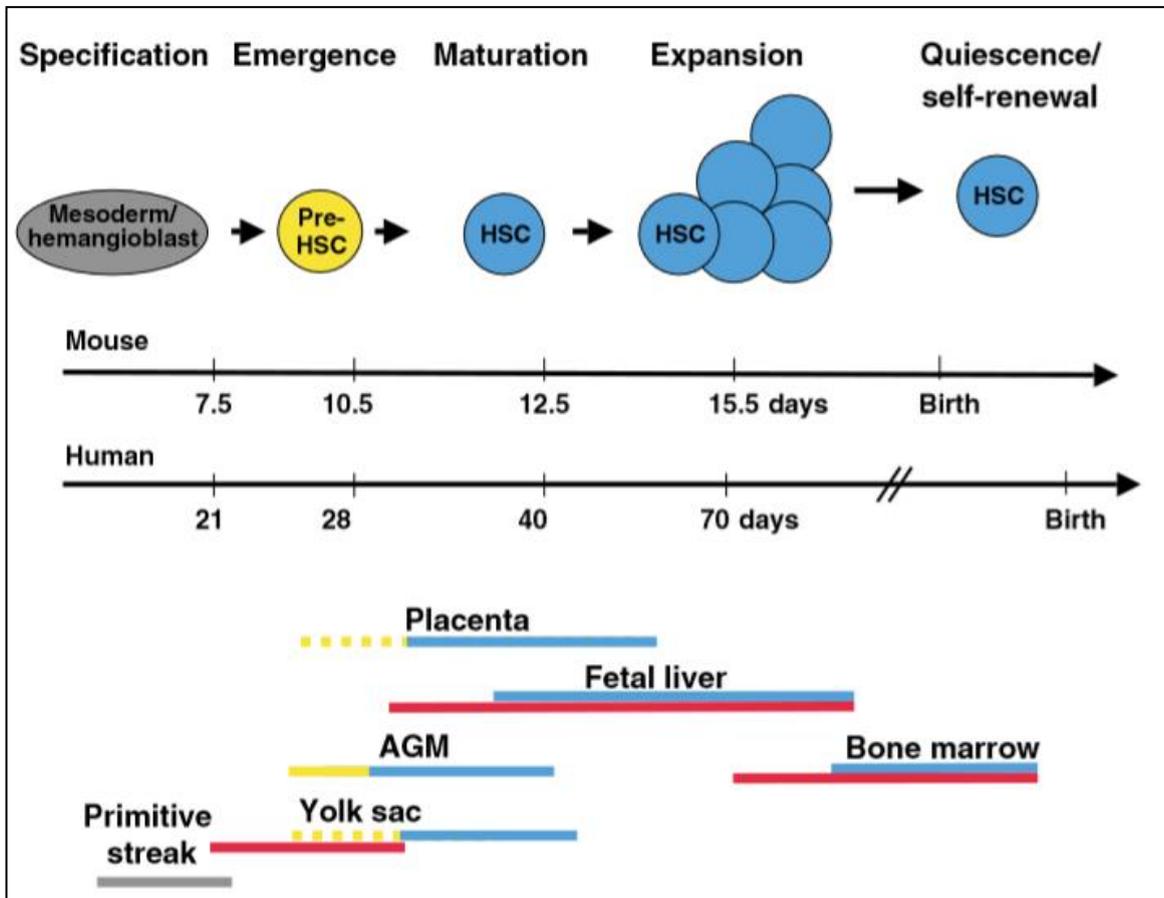
Posteriormente, o modelo de hematopoiese murina foi também identificado no sistema hematopoiético humano, que, apesar das semelhanças com o modelo murino, ainda é foco de inúmeros trabalhos que visam identificar a arquitetura hierárquica das células do sistema hematopoiético neste organismo. O modelo começa com uma única célula em estágios primitivos capazes de se diferenciar nas diferentes linhagens ou mieloida ou linfoidea (Figura 1.7).



**Figura 1.7. Hierarquia da diferenciação hematopoética a partir de CTH humanas.** As células CTH em estágios mais avançados têm a capacidade de autorrenovação e diferenciação. Em cada ciclo de autorrenovação, as CTH diferenciam em progenitores bipotenciais (MPP) capazes de gerar tanto os progenitores mieloides (CMP) quanto linfoides (CLP). Por cada divisão os progenitores são comprometidos em uma linhagem específica, como o caso dos progenitores GMP, dos quais as células monocíticas e granulocíticas são derivadas. Outro progenitor bipotencial, porém mais comprometido com a linhagem é o MEP, capaz de diferenciar ou em eritroblastos ou megacariócitos. Por outro lado os progenitores linfoides podem diferenciar ou em linfócitos B, T ou em células natural killer (NK). Em todos os casos, alterações na homeostase da hematopoiese pode levar a alguns tipos de doenças (reproduzido de LIM *et al.*, 2013).

A hematopoiese em humanos foi dividida em três principais fases. Na fase inicial, a hematopoiese se desenvolve na terceira semana da embriogênese: no saco vitelino, no alantoide, pedículo do embrião, artéria vitelina, placenta e, principalmente, na aorta embrionária (AGM). A segunda fase é a chamada fase hepatoesplênica ou fetal observada

entre a semana 6 e 8. Finalmente, na fase medular ou mieloide, que começa a partir dos 6 meses, a hematopoiese ocorre tanto no baço quanto na medula óssea, permanecendo nesta última até a vida adulta (MIKKOLA e ORKIN *et al.*, 2006) (Figura 1.8).



**Figura 1.8. Esquema da cinética de formação das células tronco hematopoiética em humanos.** A hematopoiese em humanos foi dividida em três principais fases. Na fase inicial, começa no saco vitelino e na aorta embrionária (AGM). A fase hepatoesplênica ou fetal observada entre a semana 6 e 8. Finalmente, na fase medular ou mieloide que ocorre na medula óssea (Reproduzido de MIKKOLA e ORKIN *et al.*, 2006).

No final da terceira semana, a migração das células mesenquimais derivadas da camada mesodérmica intra-embrionária dará origem ao sistema cardiovascular. Os progenitores hematopoiéticos dessa fase têm um potencial limitado, se diferenciando apenas na linhagem eritroides principalmente e também em algumas das linhagens mieloides (TAVIAN *et al.*, 2005).

Entre a semana 4 e 5, as células hematopoiéticas, principalmente as CTHs, migram ao fígado. Posteriormente, entre a semana 8 e 28, as células hematopoiéticas colonizam o baço. A partir dos 7 meses, as células hematopoiéticas do fígado fetal migram até a medula óssea, permanecendo neste sítio anatômico até a vida adulta (fase medular ou mieloide). Estas

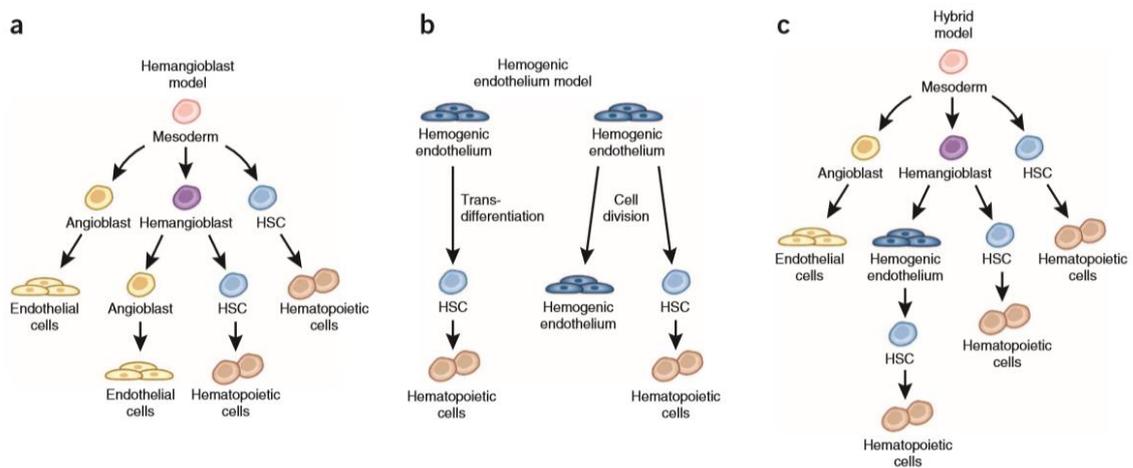
células hematopoéticas são capazes de gerar a população completa do sistema hematopoiético. A partir dos 4 anos, além das células hematopoéticas, o nicho de MO está constituído por osteoblastos, osteoclastos, células endoteliais, fibroblastos, mastócitos, adipócitos entre outros.

### **1.8.1. Modelos de formação das células tronco hematopoiética (CTH)**

Três modelos foram propostos para explicar quais progenitores poderiam ser capazes de gerar tanto as células hematopoiéticas quanto as células endoteliais na embriogênese (BATCH *et al.*, 2011). Entre eles se encontra o modelo que sugere que as células hematopoiéticas e endoteliais surgem a partir de um único progenitor, chamado hemangioblastos (Figura 1.9A). Inicialmente os progenitores mesodérmicos localizados no saco vitelínico e posteriormente na aorta dorsal podem dar origem tanto ao sistema vascular quanto hematopoiético. Os progenitores mesodérmicos são capazes de gerar CTH assim como os precursores endoteliais chamados de angioblastos, os quais dão origem às células endoteliais para formar os vasos sanguíneos e artérias.

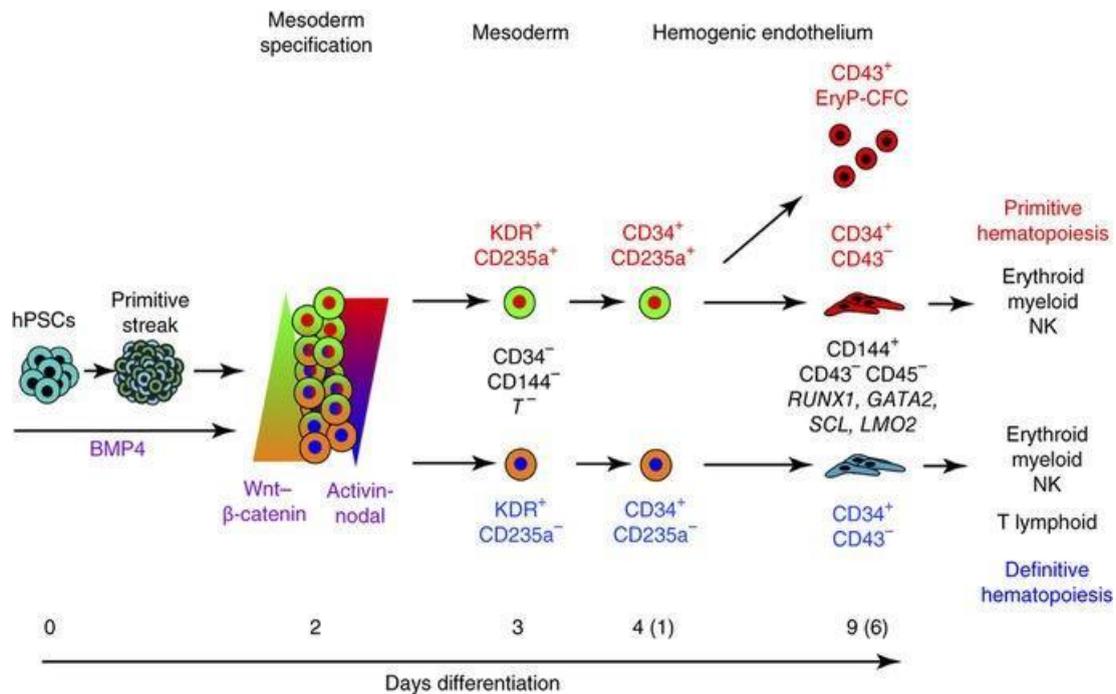
Outro tipo de células que surgem a partir das células mesodérmicas são os hemangioblastos, que devido à sua bipotencialidade, se diferenciam tanto em células endoteliais, que constituem o revestimento dos capilares dos vasos sanguíneos, quanto nas células hematopoiéticas primitivas. As células CTH primitivas incluem principalmente a formação de eritroblastos primitivos e, em menor proporção, as outras linhagens mieloides (fase inicial).

O segundo modelo sugere que as células hematopoiéticas são derivadas do endotélio hemogênico e esses precursores são capazes de formar as células CTH (Figura 1.9 B). Finalmente, o terceiro modelo (Figura 1.59), chamado de modelo híbrido, propõe a combinação dos modelos anteriores. Nesse modelo os hemangioblastos podem dar origem ao endotélio hemogênico e às CTH, e que por sua vez as células do endotélio hemogênico poderia dar origem às CTH.



**Figura 1.9. Modelo hipotético da geração de células hematopoiéticas e endoteliais na embriogênese.** Três modelos foram propostos para explicar quais progenitores poderiam ser capazes de gerar tanto as células hematopoiéticas na embriogênese. As CTH poderiam ser originadas a partir dos hemangioblastos (a), endotélio hemogênico (b) ou a partir de um modelo híbrido (c) (Reproduzido de BAUTCH *et al.*, 2011).

A diferenciação hematopoiética é dividida em dois tipos. A diferenciação primitiva ou primeira onda, cuja característica principal é que os progenitores eritroide/megacariocíticos são capazes de gerar unidades formadoras de colônias primitivas. A diferenciação definitiva, ou segunda onda, foi observada principalmente nas células CTH adulta na MO. Esses progenitores hematopoiéticos são multi-linhagens capazes de dar origem às linhagem mieloides e linfoides, com um maior potencial de proliferação que as CTH primitivas (Figura 1.10). Fisiologicamente, a diferenciação hematopoiética a partir da HSC é acompanhada por modulação diferencial do perfil epigenético das células, para as diferentes linhagens mieloides (ATTEMA *et al.*, 2007).



**Figura 1.10. Modelo de diferenciação de progenitores hematopoiéticos primitivos ou definitivos.** Esquema ilustrativo da diferenciação hematopoiética a partir de iPSCs. A diferenciação é dividida em dois tipos: (1) diferenciação primitiva chamada de primeira onda (imagem acima), (2) diferenciação definitiva, ou segunda onda (STURGEON *et al.*, 2014).

### 1.9. Potenciais implicações da aplicação de iPSCs no estudo das NMPs

As características moleculares das NMPs incluem mutações *drivers*, mutações em genes reguladores epigenéticos e mutações de predisposição à transformação leucêmica. A íntima relação de genes como *ASXL1* e *TET2* com genes de indução de pluripotência e também na manutenção do estado pluripotente nas células permite indagar se células somáticas carregando mutações nestes genes mantém o potencial de reprogramação a iPSCs se comparadas a células sem estas mutações. Da mesma forma, o impacto das mutações nestes genes na assinatura de metilação do DNA das células de NMPs coloca a questão de se estas marcas epigenéticas serão perdidas durante o processo de reprogramação e também se serão eventualmente readquiridas com o mesmo padrão em protocolos de geração *in vitro* de células mieloides a partir destas iPSCs derivadas de pacientes.

A natureza clonal da reprogramação de células individuais a iPSCs permite, adicionalmente, avaliar a estrutura clonal da doença de origem em termos da distribuição de mutações co-ocorrentes. No caso das NMPs, clones de iPSCs refletem a distribuição celular das mutações de origem das células reprogramadas, permitindo caracterizar, em baixa resolução, a arquitetura clonal da população hematopoiética de origem coletada a partir dos pacientes.

Os modelos de diferenciação mieloides *in vitro* a partir de iPSCs permitem ainda inferir se os mesmos defeitos ou desvios de diferenciação mielóide observados em pacientes com NMPs podem ser observados também nas células mieloides geradas a partir das iPSCs destes pacientes. Esta caracterização *in vitro* dos processos de diferenciação se presta à posterior utilização deste sistema como plataforma de avaliação de compostos químicos que possam reverter eventuais anomalias na diferenciação mielóide encontradas em células de pacientes carregando as mais variadas mutações descritas até aqui.

Em suma, as iPSCs representam um modelo extremamente rico para avaliar diferentes características moleculares e seus impactos em processos celulares nas NMPs, como a diferenciação hematopoiética, estudos epigenéticos e mecanismos de reprogramação celular.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1. Objetivo geral**

Explorar a diversidade clonal na mielofibrose primária e avaliar o impacto de diferentes mutações somáticas na reprogramação celular e na diferenciação hematopoética, usando a tecnologia das iPSCs.

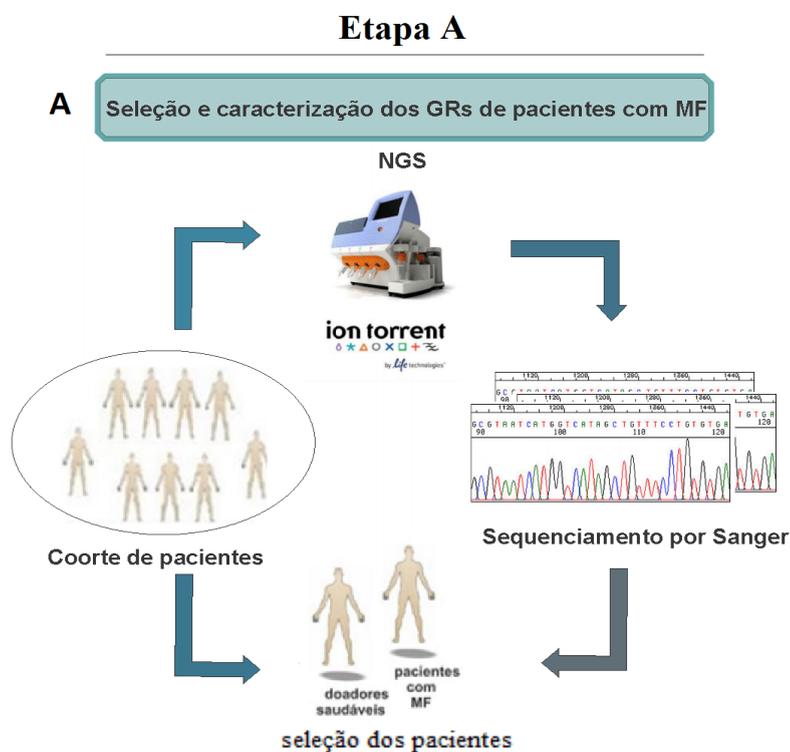
### **2.2. Objetivos específicos**

- 1) Avaliar a diversidade clonal dos pacientes a partir dos clones iPSCs obtidos na reprogramação celular de cada paciente.
  
- 2) Avaliar o impacto das mutações em *TET2*, *ASXL1* e *TP53* no processo de reprogramação das células primárias de pacientes com MF.
  
- 3) Avaliar a influência das mutações em *CALR* e *TET2* na diferenciação hematopoética, incluindo a obtenção e o potencial clonogênico dos progenitores e diferenciação para a linhagem granulocítica.

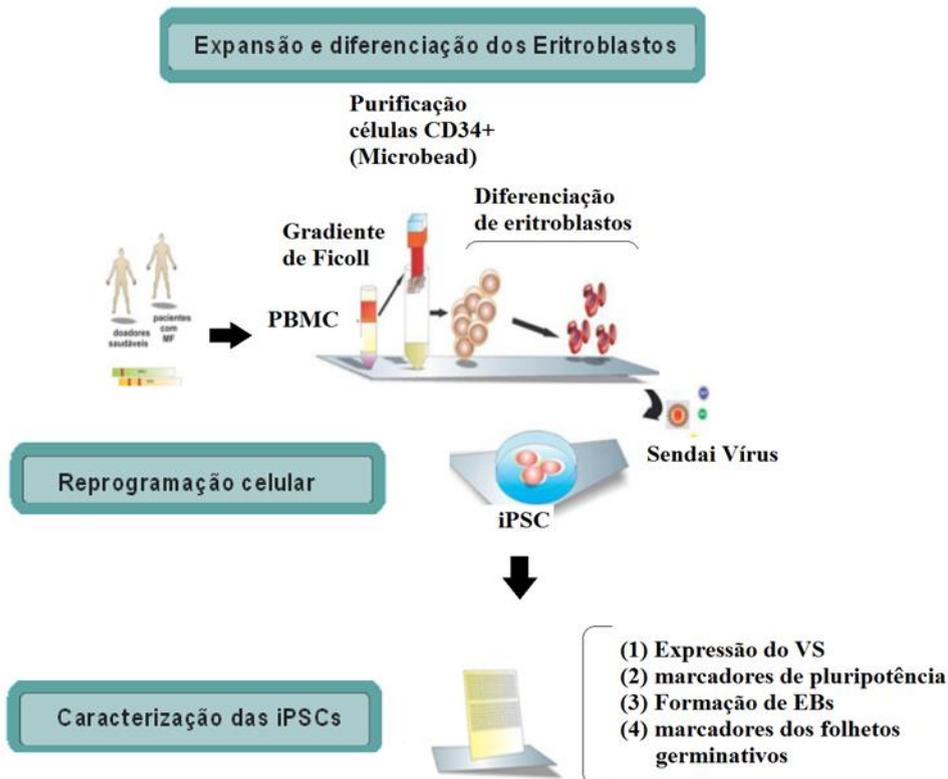
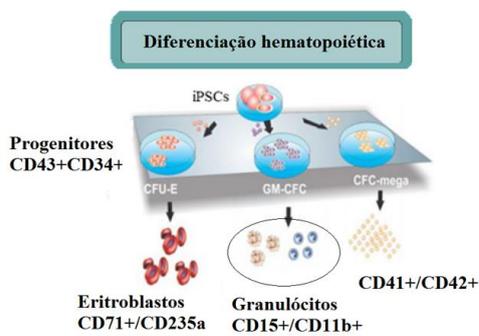
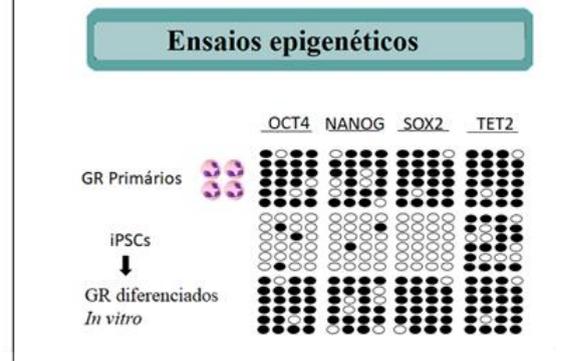
### 3. Materiais e métodos

#### 3.1. Desenho do estudo

A abordagem experimental desenvolvida no presente trabalho foi dividida em quatro etapas. Previamente, uma coorte de pacientes com MF havia sido caracterizada por sequenciamento de próxima geração (NGS) pelo nosso grupo. A partir desses dados, as etapas desenvolvidas neste trabalho foram: A) seleção dos pacientes com MF e validação dos dados de NGS por PCR e Sanger; B) reprogramação celular a partir de células primárias de pacientes e caracterização das iPSCs; C) diferenciação hematopoiética *in vitro* a partir das iPSCs e a etapa D) ensaios epigenéticos que será realizada posteriormente (Ver Perspectivas futuras) (Figura 3.1).



**Figura 3.1. Esquema representativo da abordagem experimental.** (A) A partir do sequenciamento de uma coorte de 37 pacientes com MF, 6 deles foram portadores de mutações driver em genes associados à proliferação, mutações em reguladores epigenéticos ou associados à transformação leucêmica foram selecionados para participar do estudo.

**B****Etapa B****C****Etapa C****D****Etapa D**

**Figura 3.1. Esquema representativo da abordagem experimental (continuação).** (B) Eritroblastos dos pacientes e de doadores saudáveis (controles) foram obtidos a partir da expansão e diferenciação de células progenitoras CD34<sup>+</sup>. Após a reprogramação celular com vírus Sendai, foi realizada a caracterização molecular e caracterização de pluripotência das iPSCs. (C) A diferenciação hematopoiética *in vitro* das iPSCs foi conduzida com um coquetel de citocinas hematopoiéticas. (D) Ensaio para a verificação de padrões de metilação e de expressão gênica serão realizados em células granulocíticas (GR) primárias, iPSCs e granulócitos diferenciados *in vitro* a partir das iPSCs. NGS: *Next Generation Sequencing*, GRs: Granulócitos, VS: Vírus Sendai, EBs: corpos embrioides.

## **3.2. Aspectos éticos**

O presente projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto Nacional de Câncer, sob o N° 62/08, com aprovação de um adendo no ano de 2012. No ano de 2017, o projeto foi incluído na Plataforma Brasil (Anexo1).

### **3.2.1. Coleta das amostras biológicas de sangue periférico**

Os pacientes com MF incluídos nesse estudo foram diagnosticados de acordo com os critérios da OMS e acompanhados nos respectivos hospitais. Entre eles, encontram-se o Hospital Universitário Pedro-Ernesto (HUPE) da Universidade Estadual de Rio de Janeiro (UERJ) e o Hospital Universitário Antônio Pedro (HUAP) da Universidade Federal Fluminense (UFF) de Rio de Janeiro.

Durante exames de rotina, as amostras de sangue periférico dos pacientes com MF foram coletadas em EDTA (ácido etilenodiamino tetra-acético) e referidas ao Laboratório de Biologia Molecular do CEMO. As amostras foram utilizadas para diagnóstico molecular e destinadas ao desenvolvimento do presente projeto. Já as amostras dos doadores saudáveis, utilizadas como controle, foram coletadas ao término da doação de sangue, a partir de um dispositivo que retém os leucócitos do sangue periférico.

Para participar nesse estudo, os pacientes e doadores saudáveis assinaram um termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE - Anexos 2 e 3).

As etapas de reprogramação, expansão de iPSCs e caracterização quanto à pluripotência foi realizada em colaboração com o grupo de pesquisa do Dr. Stevens Rehen, Rio de Janeiro. As etapas correspondentes à diferenciação hematopoiética *in vitro* a partir das iPSCs foram realizadas em colaboração com a Dra. Isabelle Plo no laboratório INSERM, UMR 1170 no Hospital Gustave Roussy, França. .

## **3.3. Enriquecimento de células tronco/progenitoras hematopoéticas**

### **3.3.1. Isolamento e expansão**

As frações de células mononucleares do sangue periférico (PBMCs, do inglês *peripheral blood mononuclear cells*) e granulócitos foram separadas por centrifugação em gradiente de densidade durante 25 min a 450 g utilizando Ficoll-Hypaque® (GE Healthcare Sicences, Reino Unido).

A fração correspondente às PBMCs foi coletada e lavada com solução tampão fosfato-salina (PBS, do inglês *phosphate buffer solution*). Após centrifugação durante 5 min a 200 g, as PBMC foram contadas em câmara de Neubauer, realizando-se a exclusão das

células não viáveis com azul de tripan. Estas células foram reservadas para purificação de células-tronco/progenitoras hematopoiéticas CD34<sup>+</sup>.

A purificação das células CD34<sup>+</sup> foi realizada utilizando 1x10<sup>8</sup> PBMCs ressuspensas em 300 µL de PBS-EDTA. Foram adicionados 100 µL de agente bloqueador FcR (imunoglobulina humana para bloqueio da ligação do FcR, FcR: receptor do domínio Fc, Fc: fragmento cristalizável) à suspensão celular e, em seguida, adicionados 100 µL do complexo anticorpo anti-CD34-esfera magnética. A amostra foi incubada durante 30 min a 4 °C. As células foram lavadas com PBS e, após centrifugação durante 5 min a 200 g, foram ressuspensas em 1 mL de PBS. Posteriormente, foi utilizada uma coluna magnética previamente hidratada com 3 mL de PBS para reter as células CD34<sup>+</sup>, de acordo com instruções do fabricante (*MACS magnetic separation*, Miltenyi Biotec, USA). Em seguida, a coluna foi lavada três vezes com 3 mL de PBS. Finalmente, a coluna foi transferida para um novo tubo e as células CD34<sup>+</sup> foram eluídas em 5 mL de PBS por pressão com êmbolo.

Uma alíquota foi retirada para contagem em câmara de Neubauer, utilizando-se azul de tripan para a exclusão das células não-viáveis. As células foram centrifugadas durante 5 min a 300 g e congeladas em soro fetal bovino (BSA, USA) 90% com 10% de dimetilsulfóxido (DMSO) (v/v). Os criotubos foram colocados no freezer a -80 °C e, após 24 h, foram armazenados em nitrogênio líquido.

Após o descongelamento, as células-tronco/progenitoras hematopoiéticas CD34<sup>+</sup> purificadas a partir dos pacientes P1-P5 foram cultivadas em meio de expansão (ME) preparado com IMDM (Iscove's Modified Dulbecco's Medium, USA) (50%) e Ham's F-12 Nutrient Mixture (F-12) (50%) (GIBCO®, USA), suplementado com albumina bovina fração V isenta de ácidos graxos (BSA, USA) (Sigma-Aldrich) (10%), 2-mercaptoetanol (Thermo Scientific Fisher, USA) (100 µM), ácido ascórbico (50 µg/mL), L-glutamina (2 mM), lipídios preparados *in house* (20 uL/mL), insulina-transferrina-selenium (GIBCO, USA), penicilina (100 U/mL) (GIBCO, USA) e estreptomicina (100 µg/mL) (GIBCO, USA).

### **3.3.2. Diferenciação de eritroblastos a partir de células tronco/progenitoras hematopoiéticas CD34<sup>+</sup>**

As citocinas e fatores de crescimento específicos para a diferenciação e expansão de eritroblastos foram suplementadas ao meio de expansão nas seguintes concentrações: 25 ng/mL de *human stem cell factor* (SCF) (Peprotech, USA), 10<sup>2</sup> U/mL interleucina-3 recombinante humana (IL-3) (Peprotech, USA) e 1U/mL de eritropoietina (EPO) (Peprotech, USA). As células foram cultivadas em estufa com 5% de CO<sub>2</sub> a 37 °C até o dia 9 ou 11 da diferenciação. O meio de cultivo foi trocado a cada 3 dias. As células CD34<sup>+</sup> purificadas do

paciente P6 foram mantidas em cultivo 24h pós-descongelamento em ME suplementado com 25 ng/mL de SCF, 100 ng/mL de *Fms-like* tirosina quinase 3 (FLT3L) (Peprotech, USA), e  $10^2$  U/mL e IL-3.

Para estabelecer a curva de proliferação, a contagem do número de células foi realizada nos dias 0, 4, 6 e 9 ou 11 em câmara de Neubauer realizando a exclusão das células não-viáveis, em presença de Trypan Blue.

### 3.3.3. Imunofenotipagem de eritroblastos

A avaliação da diferenciação dos eritroblastos foi monitorada por citometria de fluxo através da quantificação dos marcadores de superfície CD34, CD71 e CD235a nos dias 0, 6 e 9. Para isso, uma alíquota da suspensão celular foi utilizada para marcação com anticorpos. As informações dos anticorpos primário e secundário quanto à diluição, marca e número de catálogo encontram-se descritos na Tabela 3.1. Os anticorpos foram incubados durante 20 min a 4 °C, ao abrigo da luz. Para a marcação com o anticorpo anti-CD235a, as células foram lavadas uma vez com PBS e incubadas com o anticorpo secundário streptavidina-APC nas mesmas condições descritas para os anticorpos primários. Como controle negativo, os eritroblastos foram avaliados em ausência dos anticorpos. A seguir, as células foram lavadas com PBS e fixadas em 200 µL de paraformaldeído 4% para posterior leitura no citômetro de fluxo *BD Accuri C6 Flow Cytometer* (BD Biosciences, USA). A análise dos dados da citometria foi realizada utilizando o programa *Kaluza v5*.

**Tabela 3.1. Descrição dos anticorpos utilizados na imunofenotipagem dos eritrócitos**

	Anticorpo	Fabricação	Nº de Catálogo	Diluição
Imunofenotipagem • progenitores CD34 • eritroblastos	Mouse anti-CD34	BD Biosciences	348057	1: 10
	Mouse anti-CD71	BD Biosciences	347513	1:10
	Mouse anti-CD235a	BD Biosciences	555569	1:20
	Streptavidina	BD Biosciences	554067	1:200

### 3.3.4. Isolamento dos granulócitos primários

Após separação das PBMCs e granulócitos por gradiente de ficoll, a fração de granulócitos foi retirada e tratada durante 10 min a 4 °C com solução para lise de eritrócitos (*red cell lysis buffer*, RCLB). Após centrifugação durante 10 min a 200 g e retirada do sobrenadante, as células foram lavadas com PBS duas vezes. As alíquotas da suspensão celular foram retiradas para caracterização dos granulócitos por imunofenotipagem e avaliação de sua morfologia por microscopia. Para a caracterização molecular, o DNA

genômico (DNAg) dos granulócitos foi extraído usando o sistema Maxwell (Promega) baseado no uso de esferas magnéticas, de acordo com instruções do fabricante.

### 3.3.5. Imunofenotipagem dos granulócitos

Para avaliar o enriquecimento da fração de granulócitos, foi realizada a caracterização imunofenotípica de 5 amostras aleatórias de granulócitos primários de MF, obtidas rotineiramente após separação em ficoll. Para a caracterização,  $1 \times 10^6$  células foram incubadas com os anticorpos anti-CD14, anti-CD15, e anti-CD45 durante 15 min a TA (Tabela 3.2). Como controle negativo, os granulócitos foram avaliados em ausência dos anticorpos acima descritos. Após lavar com PBS, as amostras foram submetidas à citometria de fluxo em citômetro FACSCanto™ II (Becton Dickinson) e os resultados foram analisados usando o software Kaluza v. 5.1.

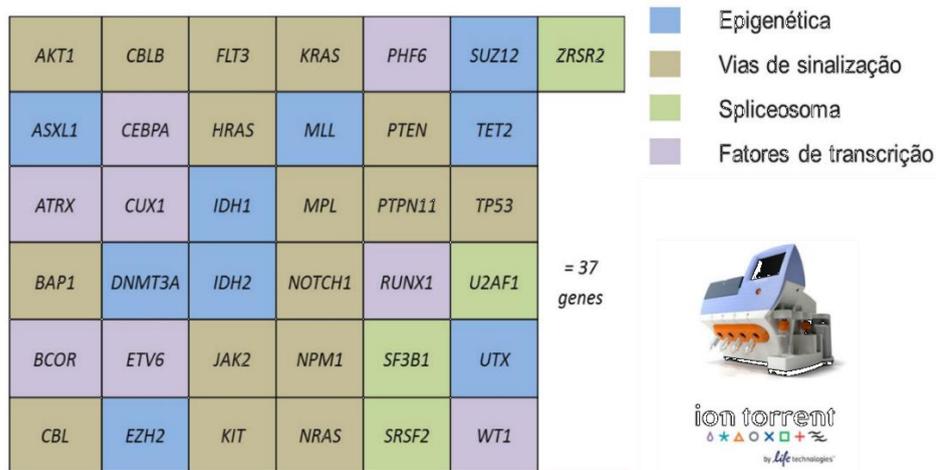
**Tabela 3.2.** Anticorpos utilizados na imunofenotipagem dos granulócitos

Imunofenotipagem dos Granulócitos primários	Anticorpo	Fabricante	Nº de Catálogo	Host	Diluição
	CD14	BD Biosciences	347497	Mouse	1/10
	CD15	BD Biosciences	347423	Mouse	1/10
	CD45	BD Biosciences	340953	Mouse	1/10

## 3.4. ETAPA A - Seleção dos pacientes com MF e caracterização molecular das amostras

### 3.4.1. Caracterização molecular de granulócitos

Na primeira etapa do projeto, foram selecionados pacientes com MF para uma posterior reprogramação celular. Para isso, a seleção foi baseada nos dados prévios de NSG, o qual foi realizado pelo nosso grupo de pesquisa no laboratório de Biologia Molecular no Centro de Transplante de Medula Óssea (CEMO). A plataforma *Ion Torrent* foi utilizada para sequenciar uma coorte de 37 pacientes com MF usando um painel de 37 genes-chave envolvidos em neoplasias mieloides (Figura 3.2). O DNAg dos granulócitos desses pacientes foi utilizado para tal caracterização.



**Figura 3.2. Painel de genes candidatos utilizados para o sequenciamento de próxima geração das amostras dos pacientes com MF.** Um painel de 37 genes envolvidos em neoplasias mieloides foi estabelecido para NGS no Laboratório de Biologia Molecular do CEMO.

#### 3.4.1. 1. Caracterização molecular de eritroblastos

A extração de DNA e RNA foi realizada a partir de eritroblastos diferenciados *in vitro* dos pacientes P1-P5 ou de células CD34<sup>+</sup> do paciente P6, com o *kit All Prep DNA/RNA Mini Kit- Qiagen*.

#### 3.4.2. Reação em cadeia da polimerase (PCR)

As mutações identificadas por NGS foram revalidadas por PCR para os genes candidatos: *JAK2*, *CALR*, *TP53*, *IDH1*, *TET2* e *ASXL1*. Como primeiro passo, após extração do DNAg, as amostras foram quantificadas no aparelho Nanodrop® ND1000 Spectrophotometer v3.5 (Unisciences, USA) e amplificadas por PCR no termociclador Veriti® 96 poços (Applied Biosystem).

A padronização das condições de reação para todos os genes foi realizada no CEMO, previamente ao desenvolvimento do presente trabalho. Basicamente, 100 ng de DNAg foram misturados com tampão de PCR (1X), MgCl<sub>2</sub> (1.5 mM), dNTPs (0.25 mM cada), e Taq DNA polimerase recombinante (Invitrogen, USA) (2,5 U) e 10 pmol de cada primer forward e reverse específicos. Os primers utilizados, assim como o tamanho dos produtos resultantes foram listados na tabela 3.3 e o perfil térmico padronizado para cada reação de PCR foi descrito na tabela 3.4.

**Tabela 3.3. Lista de primers utilizados em cada reação de PCR dos genes candidatos**

Gene	Pares de primers	Éxon	Tamanho do produto	Referência
<i>JAK2</i>	F- 5' AGC ATT TGG TTT TAA ATT ATG GAG TAT ATT 3' R- 5' CTG AAT AGT CCT ACA GTG TTT TCA GTT TCA 3' IC- 5' ATC TAT AGT CAT GCT GAA AGT AGG AGA AAG 3'	14	203pb: Alelo mutado 364pb: controle interno	BAXTER <i>et al.</i> , 2005
<i>CALR</i>	F- 5' TAACAAAGGTGAGGCCTGGT3' R- 5' TCTTAGCTCCCCCCTCAACT3'	9	260 WT 265pb: inserção 5pb 208pb: deleção 52pb	KLAMPFL <i>et al.</i> , 2013
<i>TP53</i>	F-5'TGTTCACTTGTGCCCTGACT3' R-5'TCTCTGGGAGGAGGGTTAA3'	4-5	467pb	IARC TP53 Database
<i>IDH1</i>	F-5'TGCCACCAACGACCAAGTCA 3' R- 5'TGTGTTGAGATGGACGCCTATTG3'	4	437pb	WAGNER <i>et al.</i> , 2010
<i>TET2</i>	F-5'-TTGCAACATAAGCCTCATAAACAG-3 R-5'-ATTGGCCTGTGCACTCTGACTAT-3'	3	788pb	ROCQUAIN <i>et al.</i> , 2010
	F-5'- GCTCTTATCTTTGCTTAATGGGTGTT 3' R- 5' TGACATTTGGTCTAATGGTACAACG 3'	11	748pb	DELHOMMEAU <i>et al.</i> , 2009
<i>ASXL1</i>	F- 5' AGGTCAGATCACCCAGTCAGTT 3' R- 5' TAGCCCATCTGTGAGTCCAACCTGT 3'	12	561pb	ROCQUAIN <i>et al.</i> , 2010

**Tabela 3.4. Condições das PCRs específicas para amplificação a partir do DNA genômico de fragmentos dos genes *JAK2*, *CALR*, *TP53*, *IDH1*, *TET2* e *ASXL1***

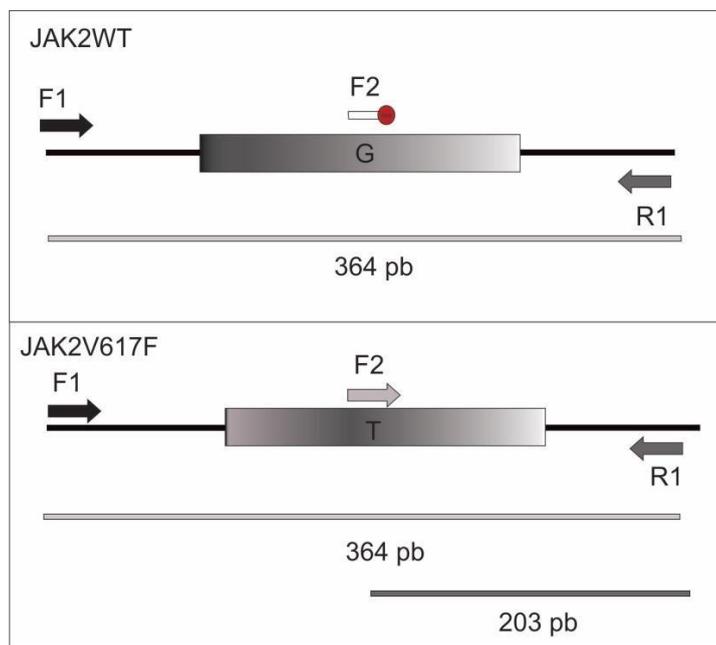
Gene	1 ciclo		N° de ciclos						
	Desnaturação inicial		Desnaturação		Anelamento		Extensão		N° Ciclos
	T (°C)	Tempo (s)	T (°C)	Tempo (s)	T (°C)	Tempo (s)	T (°C)	Tempo (s)	
<i>JAK2</i>	94	5	94	30	57	30	72	60	36
<i>CALR</i>	95	4	95	30	67	30	72	60	35
<i>TP53</i>	94	2	94	30	61	45	72	52	35
<i>IDH1</i>	94	3	94	30	60	30	72	60	35
* <i>TET2</i>	94	3	94	30	56	30	72	60	35
** <i>TET2</i>	94	3	94	30	65	30	72	60	35
<i>ASXL1</i>	94	3	94	30	65	30	72	60	35

As condições de temperatura e tempo de extensão final foram as mesmas para todos os genes: 72 °C por 10 min. Condições correspondentes para \* *TET2* éxon 3 \*\**TET2* éxon 11

### 3.4.3. PCR qualitativo alelo específico do éxon 14 do gene *JAK2*

Para a reação de PCR qualitativo, os primers controle interno (IC, F1) (0,5 µM) e reverso (R) (1 µM) utilizados se anelam tanto no alelo *JAK2*<sup>WT</sup> quanto no alelo *JAK2*<sup>V617F</sup>, resultando na amplificação de um produto de 364 pb (controle interno positivo). Já o primer forward (F) (0,5 µM) se anela de maneira específica no alelo mutado, e em conjunto com o primer R, ocorre a amplificação de um produto adicional de 203 pb (alelo mutado) (Figura

3.3). Desse modo, uma banda de 203 pb é observada unicamente em pacientes portadores da mutação *driver*  $JAK2^{V617F}$  seja em homozigose ou heterozigose (Tabela 3.3).



**Figura 3.3. Esquema do PCR alelo específico  $JAK2^{V617F}$ .** A amplificação do éxon 14 do gene *JAK2* com os primers (F1 e R1) resulta em uma banda de 364 pb, nomeada de controle interno (CI), que corresponderia ao alelo não-mutado. O primer F2 não reconhece a sequência normal do éxon (WT), logo, a combinação dos primers (F2, R1) amplifica a região correspondente à mutação no gene  $JAK2^{V617F}$ , resultando em uma banda relativa à mutação de 203 pb. Esquema modificado de BAXTER *et al.*, 2005.

#### 3.4.4. PCR para amplificação do éxon 9 do gene *CALR* e análise de fragmento por eletroforese capilar

Na reação de PCR do éxon 9 do gene da *CALR* foram utilizados os primers descritos na tabela 3.6 na concentração de 0,4 mM. O primer F foi marcado com 6-carboxifluoresceína (6-FAM), visando identificar os tamanhos das bandas do produto final de PCR mediante análise de fragmentos por eletroforese capilar, utilizando-se o sequenciador genético 3130xi (Applied Biosystems, Inc, USA). Como passo prévio à etapa da injeção das amostras no capilar do sequenciador, o DNA correspondente ao produto final da reação (3  $\mu$ L) junto com Hi-Di™ formamida (8,7  $\mu$ L) (Applied Biosystems Inc, USA) e com um marcador padrão de tamanho marcado com fluoróforo (0,3  $\mu$ L) (GeneScan™ - Liz®500 Size Standard, Applied Biosystems Inc, USA) foi desnaturado durante 5 minutos a 95°C. A formamida foi utilizada para evitar a formação de estruturas secundárias que poderiam interferir na velocidade de migração das diferentes bandas. Os resultados foram analisados utilizando o software Chimer Marker (Soft Genetics). O alelo WT foi

identificado por um fragmento de 260 pb e picos adicionais maiores ou menores correspondem a inserções ou deleções (indels) em *CALR*. Um pico adicional de 210 pb corresponde à deleção de 52 pb, descrita como mutação de tipo 1 e um pico adicional de 265 pb corresponde à inserção de 5 pb ou mutação de tipo 2 (KLAMPFL *et al.*, 2013).

#### **3.4.5. PCR para identificação de mutações nos genes *TP53*, *IDH1*, *TET2* e *ASXL1***

Em todas as reações de PCR correspondentes aos genes *TP53*, *IDH1*, *TET2* e *ASXL1* foram usados os primers em uma concentração de 0,4 µM (tabela 3.3). A amplificação das regiões de interesse foi realizada por PCR como descrito acima e os produtos da reação foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 2%. Os fragmentos foram visualizados em sistema de transiluminação Gel Doc XR (BioRad®) por meio do software Quantity One (BioRad®). Os produtos de PCR foram então purificados utilizando o Illustra GFX PCR DNA e o kit de purificação de banda em gel (GE Healthcare Sciences, Reino Unido) e semi-quantificados em relação ao marcador de peso molecular Low Mass (Invitrogen®).

#### **3.4.6. Sequenciamento pelo método de Sanger**

Os produtos de PCR correspondentes aos genes *JAK2*, *TP53*, *TET2*, *IDH1* e *ASXL1* (3 µL) foram submetidos à reação de sequenciamento direto. Na mesma reação utilizou-se BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (1µL) e BigDye Sequencing Buffer (1,5 µL). Além disso, em cada reação foi utilizado o primer R ou F (0,5 µL) (Applied Biosystems) e completado com H<sub>2</sub>O para um volume final de 10 µL. As condições de ciclagem foram 94°C (10s), 50°C (5s) e 60°C (4min) por 40 ciclos. Após precipitação dos produtos, as amostras foram submetidas a sequenciamento capilar no sequenciador genético 3130xI (Applied Biosystems) e as sequências foram analisadas pelo software Chromas V2.32 (Technelysium Pty Ltd) e posterior análise no programa Mutation Surveyor 5.1 (Soft Genetic LLC).

#### **3.4.7. Análise da frequência alélica das mutações em eritroblastos diferenciados *in vitro***

Para o rastreamento das mutações e análise da frequência alélica nas células reprogramadas, o DNAg foi sequenciado por NGS, usando o mesmo painel de genes utilizado na caracterização dos granulócitos primários dos pacientes com MF. Para a obtenção da biblioteca das amostras, foi utilizado o *kit Ion Ampliseq*. Os passos seguintes correspondentes à metodologia do NGS foram realizados conforme descrito no item 3.7.4.

Alternativamente, a avaliação da análise da frequência alélica foi realizada mediante a técnica de clonagem. Desse modo, como primeiro passo realizamos o PCR conforme condições previamente descritas no item 3.4.2. A seguir, o produto de PCR purificado foi

ligado ao vetor pCR™2.1 (Invitrogen) usando o Kit The Original TA Cloning (Invitrogen) seguindo as especificações do fabricante do TA Cloning® Kit. A reação de ligação do produto de PCR e o vetor foi realizada em uma proporção 3:1, incubados *overnight* à TA.

Para preparação das bactérias competentes (E.Coli DH5 alfa) (50 µL) foi utilizado o Mix & Go E. Coli Transformation Kit (Zymo Research™). As bactérias foram transformadas com 3 µL da reação de ligação e semeadas em placas de 100 mm (J. ProLab) contendo meio LB sólido (composição: 1% tripton, 10% pepton, 0,5% extrato de levedura, 1% NaCl, 15% agar-agar) e 100 µg/mL de ampicilina. As placas foram incubadas a 37°C durante 12 h. Vinte colônias de cada placa foram selecionadas e o DNA plasmidial, purificado com resina Chelex® 100 Chelating Resin (Bio-Rad, USA). Em seguida, o inserto foi amplificado a partir do DNA plasmidial utilizando os primers específicos para o vetor M13 (Reverso: CAGGAAACAGCTATGAC e Forward: GTAAAACGACGGCCAG). As condições do PCR foram: 95 °C durante 5 min na etapa de desnaturação inicial, e 35 ciclos com uma temperatura de desnaturação de 94 °C durante 30s, seguido de uma temperatura de anelamento de 56 °C durante 30s e temperatura de extensão de 72 °C durante 1,5 min e extensão final de 7 min. Os primers foram utilizados na concentração final de 200 nM. Os produtos de reação foram purificados utilizando o Accuprep® PCR Purification Kit e posteriormente sequenciados. O cálculo da frequência alélica foi realizado utilizando a seguinte fórmula:

$$\text{Frequência Alélica} = \frac{\text{Nº de Colônias com os genes mutados}}{\text{Nº de Colônias Totais}}$$

### 3.5. ETAPA B - Reprogramação celular

Após da caracterização molecular dos eritroblastos expandidos *in vitro* dos pacientes P1-P5, quando apresentaram ao menos 50% da população positiva para CD71<sup>+</sup>/CD235a<sup>+</sup> entre os dias 9 e 11, e as células CD34<sup>+</sup> isoladas do paciente P6, após 24h pós-descongelamento foram utilizados para o início da reprogramação celular. As células primárias foram testadas para micoplasma utilizando o Kit MycoAlert™ PLUS (Lonza, USA) antes do início da reprogramação celular (Anexo 4).

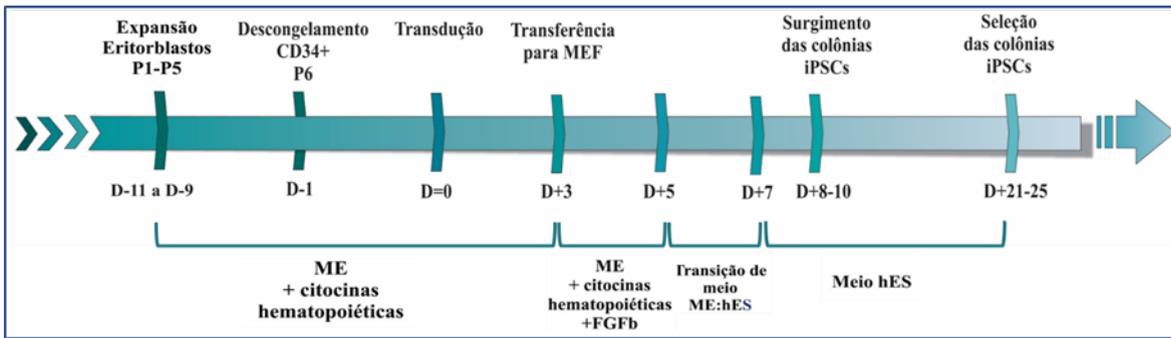
As células dos pacientes e controles foram reprogramadas usando o sistema Vírus Sendai (VS) CytoTune™-iPS geração 1.0 ou 2.0 (Thermo Fisher Scientific, USA), que contém os 4 fatores de pluripotência, também nomeados “fatores de Yamanaka” (OCT3/4, SOX2, KLF-4, c-MYC- OSKM). O protocolo utilizado no presente trabalho foi estabelecido segundo as recomendações do fabricante e segundo YANG e colegas (YANG *et al.*, 2012).

Desse modo,  $5-10 \times 10^4$  células (eritroblastos ou células CD34<sup>+</sup>) foram plaqueadas em um poço de placa de 24 poços e transduzidas com o VS, com MOI (multiplicidade de infecção) de 6-10 (Figura 3.4). As células foram mantidas em meio ME com as respectivas citocinas acima descritas.

Três dias depois da transdução, as células foram plaqueadas sobre fibroblastos embrionários de camundongo (*mouse embryonic fibroblasts*, MEF) irradiados (Thermo Fisher Scientific, USA). As células foram utilizadas como *feeder* e mantidas em meio ME com as citocinas de expansão para eritroblastos e suplementado com 10 ng/mL FGFb fresco (passagem P0). Previamente ao plaqueamento das MEFs, realizou-se a co-ativação com gelatina 0,1% por 30 min. As MEFs foram descongeladas, lavadas com meio MEF, cuja preparação consistiu em DMEM/F12 (*Dulbecco's Modified Eagle Medium/F-12*, Gibco, USA), 15% de Soro Fetal Bovino (SFB), aminoácidos não essenciais (MEM) 100 µM, 100 U/mL penicilina e 100 µg/mL estreptomicina, e centrifugadas por 5 min a 200 g à TA. Após descarte do sobrenadante, as células foram ressuspensas em 6 ml de meio MEF e distribuídas em uma placa de 6 poços (1 mL/poço). Após 24h, quando observamos adesão homogênea das MEF, o meio MEF foi trocado pelo meio utilizado no dia 3 da reprogramação como acima descrito.

A partir do dia 5, foi iniciada a transição do meio ME para meio de cultura específico de células embrionárias humanas (meio hES) composto de DMEM/F12, 15% Soro KnockOut™ (KOSR- Gibco, USA), aminoácidos não-essenciais (100 µM), 2 mM L-Glutamina, 100 µM β-Mercaptoetanol, 100 U/mL penicilina e 100 µg/mL de estreptomicina, suplementado com 10 ng/mL FGFb. Metade do volume de meio de cultivo foi substituída diariamente. A partir do dia 7, o meio hES foi trocado diariamente.

Entre os dias 21 e 25, os pequenos agrupamentos que surgiram com morfologia típica de iPSCs foram repicados manualmente e individualmente transferidos para um poço de placa de 24 poços (passagem P1). Para isso, as colônias foram fragmentadas utilizando agulha sob observação ao microscópio invertido Evos XL Cell Imaging System (Thermo Fischer, USA). Os agrupamentos celulares foram transferidos com ponteira de 200 µL para novos poços previamente recobertos com MEFs, utilizando meio fresco hES e 10 µM de inibidor iROCK (Sigma-Aldrich, USA) durante 24 h. O mesmo procedimento foi realizado até a passagem P2.



**Figura 3.4. Esquema do protocolo de reprogramação celular.** Os eritroblastos diferenciados *in vitro* dos pacientes P1-P5 foram reprogramados entre 9 e 11 dias da expansão. As células tronco/progenitoras hematopoiéticas CD34<sup>+</sup>, purificadas do paciente P6, foram reprogramadas 24h após descongelamento. As células foram transduzidas usando o sistema VS e mantida em meio ME com as citocinas de expansão. No dia 3 as células foram plaqueadas sobre MEF (células *feeder*) e mantidas em cultura com ME suplementado com as citocinas de expansão e FGFb. No dia 5 começou o início da transição (1:1) do meio ME para o meio específico de células embrionárias (hES). A partir do dia 7 o meio foi trocado diariamente até o dia 21-25, nesse dia foram selecionadas e repicadas as colônias iPSCs individualmente. (P: Paciente, ME: meio de expansão de eritroblastos, MEFs: células embrionárias de camundongos).

### 3.5.1. Expansão e manutenção das iPSCs

A partir da passagem P3, as iPSCs foram expandidas usando Matrigel® (BD Biosciences, USA) e meio mTeSR1 (Stem Cells Technologies, USA) no caso das reprogramações realizadas com o sistema Vírus Sendai geração 1.0. Para as reprogramações realizadas com o Vírus Sendai geração 2.0 foi utilizado Geltrex® (Thermo Fisher Scientific, USA) e meio *Essential* 8 (E8) (Thermo Fisher Scientific, USA). Para ambas as condições, o meio foi trocado diariamente. Para o preparo prévio das placas, o Matrigel® foi diluído para 85 µg/mL e o Geltrex® (Thermo Fischer Scientific, USA) diluído 1:100 em DMEM/F12 gelado. A superfície foi coberta e as placas foram incubadas durante 30 min em estufa a 37°C antes do uso (WAGNER e WELCH *et al.*, 2010).

Para o repique enzimático das iPSCs, as células diferenciadas espontaneamente foram retiradas pelo método manual com uma ponteira de micropipeta. A seguir, o repique enzimático foi realizado com Accutase®, no caso das células cultivadas sobre Matrigel® e meio mTeSR, ou EDTA (0,5 mM) para as células cultivadas em Geltrex® e meio E8. Em ambas as condições as células foram centrifugadas durante 4 min a 200 g. As células foram ressuspensas cuidadosamente com pipeta de 5 mL em meio fresco (mTeSR ou E8) e transferidas para um novo poço revestido com Matrigel® ou Geltrex®, respectivamente.

Para congelamento, as iPSCs foram repicadas em pequenos fragmentos, após incubação prévia de cerca de 1 h em presença de 10 µM iROCK. As células foram centrifugadas durante 4 min a 200 g e ressuspensas em meio de congelamento, composto

de 45% SFB, e 45% KOSR, 10% DMSO. Para um congelamento eficiente, os criotubos foram colocados em *cooler* no freezer -80 °C e, após 24h, foram armazenados no nitrogênio líquido. Para descongelamento das iPSCs, os criotubos foram incubados em banho maria a 37 °C para descongelamento rápido. Posteriormente, a suspensão celular foi cuidadosamente transferida para um tubo falcon 15 mL que continha meio DMEM/F12 e centrifugado durante 4 min a 200 g. Quando descartado o sobrenadante, as células foram ressuspensas em meio de expansão para iPSC e plaqueadas.

### 3.6. Caracterização molecular das iPSCs

A extração de DNA e RNA foi realizada a partir de eritroblastos diferenciados *in vitro* dos pacientes P1-P5 ou de células CD34<sup>+</sup> do paciente P6, com o *kit All Prep DNA/RNA Mini Kit- Qiagen*.

#### 3.6.1. Extração de DNA

O *pellet* obtido de cada iPSC foi estocado no freezer -80 °C até extração do DNA. Para a extração, foram adicionados 200 µL de Proteinase K buffer e 8 µL de RNase A (10µg/ml) (PureLink™, Invitrogen) gelados. A suspensão foi misturada por inversão e incubada durante 15 min à TA, em seguida foram adicionados 4 µL de Proteinase K (10mg/mL) (Invitrogen) e a amostra foi misturada por inversão e incubada a 55 °C por 3 h ou *overnight*. Posteriormente, a suspensão foi incubada por 30 min à TA e foram adicionados 400 µL de fenol: clorofórmio: álcool isoamílico (Sigma-Aldrich) (25:24:1), sendo a seguir misturada por inversão e centrifugada durante 2 min a 10.000 g à TA. A camada superior foi removida e transferida para outro tubo. O procedimento foi então repetido: foram adicionados 400 µL de clorofórmio: álcool isoamílico (24:1) e misturado por inversão, e centrifugada durante 5 min a 16.000 g à TA. A camada superior foi retirada cuidadosamente e transferida para outro tubo.

Em seguida, foram adicionados 40 µL de NaOAc (acetato de sódio) pH 5,2, e 1 mL de Etanol 95% gelado. Após misturar por inversão, a suspensão foi armazenada a -20 °C por ao menos 20 min. Decorrido este tempo, a suspensão foi centrifugada durante 5 min a 16.000 g a 4 °C e o sobrenadante foi descartado. O DNA precipitado foi lavado com 1 mL de Etanol 70% e centrifugado por 5 min a 16.000 g a 4°C. O sobrenadante foi removido e o tubo, invertido durante 5 min. Finalmente, o precipitado de DNA foi diluído em água de injeção e deixado durante 20 min a 55°C.

A posterior caracterização molecular para identificação dos genótipos das iPSCs foi realizada como descrito no item 3.7.

Para o rastreamento das mutações nas iPSCs foram utilizadas as condições de PCR e metodologías descritas previamente no item 3.4.1. para caracterização molecular dos granulócitos primários.

### **3.6.2. Avaliação da expressão dos genes *TETs* nas iPSC**

A quantificação da expressão gênica por Reação em Cadeia da Polimerase Quantitativo em Tempo Real (RT-PCR) para o estudo do padrão de expressão dos genes da família *TETs* foi realizada em duplicata tanto para os genes *TETs* quanto para o gene de expressão constitutiva de *PPIA* ou *HPRT*, os quais foram utilizados como controle interno.

A reação foi realizada em um volume final de 25 uL e foram adicionados 25 ng do cDNA sintetizado, 12,5 uL de SYBR Green PCR Master Mix (Invitrogen), 10 pmoles de cada um dos primers (Tabela 3.14) e completado com água RNase free. As análises das curvas de melting foram realizadas em rampa de aquecimento de 65 °C a 95 °C com 25 aquisições por C.

Para a quantificação relativa das amostras estudadas, utilizou-se o método limiar crítico comparativo  $2^{-\Delta Ct}$ . Neste método, a média do Ct dos genes *TETs* é subtraída pela média do Ct do controle interno (*PPIA* ou *HPRT*), resultando em um  $\Delta Ct$ . Para o cálculo da expressão substituímos o valor de  $\Delta Ct$  obtido na fórmula  $2^{-\Delta Ct}$ . Os números finais obtidos são apresentados como razão entre a expressão do gene de interesse em relação ao gene de controle interno (*PPIA* ou *HPRT*).

### **3.7. Análise da pluripotência**

As etapas de caracterização da pluripotência das iPSCs foram divididas em: (1) confirmação da ausência da expressão do VS nas iPSCs, (2) avaliação da imunoexpressão de marcadores associados ao estado de pluripotência, (3) formação dos corpos embrioides (EB) e diferenciação espontânea das células dos três folhetos germinativos e (4) avaliação por imunofluorescência e RT-PCR dos marcadores correspondentes às células diferenciadas.

### 3.7.1. Avaliação da expressão dos genes de pluripotência do Vírus Sendai (VS)

A reprogramação das células somáticas mediada pelo VS induz a superexpressão transiente de genes associados à pluripotência (também referidos como os 4 fatores de Yamanaka -OSKM) (Zhang *et al.*, 2013). Após a indução da expressão dos genes exógenos pelo VS, que geralmente ocorre entre as passagens 8 e 15 após a transdução, as células eficientemente reprogramadas expressam apenas os genes de pluripotência endógenos. Desse modo, o estado de pluripotência e autorrenovação é mantido pelas vias de sinalização ativadas pela própria célula. Logo, como primeira etapa da caracterização, faz-se necessário avaliar a expressão dos genes exógenos a fim de confirmar que o estado de pluripotência das células não está sendo dependente dos genes do VS.

O CytoTune™-iPS 1.0 expressa os 4 fatores de Yamanaka: OCT-3/4, SOX-2, KLF-4 e c-MYC (OSKM) em vetores independentes. Já o CytoTune™-iPS 2.0 consta de 3 vetores de reprogramação, o primeiro contém o gene c-MYC, o segundo vetor, o gene KLF-4 e o terceiro o vetor é policistrônico e contém os genes KLF-4, OCT-3/4 e SOX-2. Baseados em ambos os sistemas, para a avaliação da expressão do VS por RT-PCR utilizamos diferentes primers.

Para análise da expressão do VS nas iPSCs, foi realizada extração do RNA total utilizando o *GeneJET RNA Purification Kit* (Thermo Fisher Scientific, USA), seguindo as especificações do fabricante. Foram analisadas iPSCs em passagem acima de P8. Como controle positivo de expressão dos genes exógenos do VS, amostras de iPSCs controles em passagem P3 foram utilizadas. Os RNAs obtidos foram quantificados e aferidos quanto à sua pureza por espectrofotometria utilizando o *NanoDrop 2000c Spectrophotometer* (Thermo Fisher Sciences, USA).

A integridade do RNA extraído foi verificada por análise eletroforética. Basicamente, 300 ng de RNA foram avaliados em gel de agarose 1% em TAE 1x (Tris-acetato-EDTA), acrescido do agente intercalante de DNA SYBR® Safe na diluição de 1:10.000 (Invitrogen, USA) e visualizados no transiluminador (Loccus onoliga, Brasil, L. Pix). Em seguida, 2 µg de RNA foram tratados com DNase I (Invitrogen, USA) com intuito de eliminar qualquer resquício de DNA genômico da amostra. O procedimento foi realizado de acordo com a metodologia indicada pelo fabricante. Para testar a eficiência do tratamento, realizou-se uma PCR.

Para a reação de PCR, 0,5 µl (~120 ng) de RNA tratado com DNase foram misturados com tampão de PCR, MgCl<sub>2</sub> (1,5 mM), dNTPs (0,2 mM cada), primers forward e reverso para GAPDH (*glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase*) (0,2 µM cada) e *Taq DNA Polymerase Recombinant* (Invitrogen, USA) e submetidos à seguinte ciclagem térmica:

desnaturação a 95 °C por 30 s, anelamento a 58 °C por 30 s, e alongação a 72 °C por 30s ( 35 ciclos) e uma extensão final a 72 °C por 4 min (equipamento Applied Biosystems™ ProFlex™ PCR System).

Os produtos do PCR foram visualizados em gel de agarose 2% nas mesmas condições descritas acima. Os primers utilizados estão descritos na tabela 3.8. Para a síntese de DNA complementar (cDNA) foi utilizada a transcriptase reversa *M-MLV Reverse Transcriptase* (Invitrogen, USA) (209 U), de acordo com as especificações do fabricante. Após a síntese de cDNA, realizou-se PCR nas mesmas condições descritas anteriormente. A sequência dos primers está descrita na tabela 3.5.

**Tabela 3.5. Sequência dos primers para detecção da expressão dos genes de pluripotência do VS.**

	Target	Primer sets	Tamanho do produto
RT-PCR Virus Sendai	SeV	F-5' GGA TCA CTA GGT GAT ATC GAG C3' R-5' ACC AGA CAA GAG TTT AAG AGA TAT GTA TC3'	181 pb
	KOS	F-5' ATC CAC CGC TAC GAC GTG AGC GC3' R-5' ACC TTG ACA ATC CTG ATG TGG'	528 pb
	Klf4	F-5' TTC CTG CAT GCC AGA GGA GCC C3' R-5' ATT GTA TCG AAG GTG CTC AA3'	410 pb
	c-Myc	F-5' TAA CTG ACT AGC AGG CTT GTC G3' R-5' TCC TAC AGT CCT GGA TGA TGA TG3'	532 pb
	Sox2	F-5' ATG TCA CTAGAT ATC GAG C3' R-5' AAT GTA TCG AAG GTG CTCAA 3'	451 pb
	Oct3/4	F-5' CCC GAA AGA GAA AGC GAA CCAG3' R-5' AAT GTA TCG AAG GTG CTC AA3'	488 pb

### 3.7.2. Formação de corpos embrioides

O estado de pluripotência está relacionado ao potencial das iPSCs em se diferenciar nas células dos três folhetos germinativos. Para avaliar essa capacidade, foi realizado o ensaio de formação de corpos embrioides (EBs) a partir das iPSCs.

As iPSCs foram plaqueadas em placa de 100 mm e, quando atingiram confluência, foram lavadas com PBS e incubadas a 37 °C durante 5 a 10 min com Accutase®.(Stem Cells Technologies, USA) Posteriormente, as células foram centrifugadas a 200 g durante 3 min e ressuspendidas em meio de diferenciação de EB. O meio foi preparado com DMEM suplementado com 15% KSR, MEM (100 µM), L-Glutamina (200 mM), Piruvato de sódio (1 mM), 10µM inibidor iROCK, 100 U/mL penicilina e 100 µg/mL estreptomicina), em ausência de bFGF, para permitir a formação dos EBs (todos os reagentes foram adquiridos da Thermo Fisher Scientific, USA). Em seguida, as células foram plaqueadas em placas de 60 mm não-

aderentes (Corning, USA). Após as primeiras 24h, o meio foi trocado a cada dois dias em ausência do iROCK.

As culturas foram mantidas todos os dias em *shaker* horizontal até o dia 7. No dia 7, os EBs foram plaqueados em placa de 96 poços, previamente ativadas com gelatina 0,1% para os ensaios de imunofluorescência ou em placas de 60 cm<sup>2</sup> para avaliação da presença ou ausência da expressão gênica de genes específicos relativos às três camadas germinativas. Deste modo, a diferenciação ocorreu entre 5 e 10 dias, com troca de meio diariamente. Ao final, as células foram fixadas com paraformaldeído 4% e estocadas a 4° C até a análise. A imunomarcagem foi realizada como descrito anteriormente, para os marcadores: SMA (mesoderma), AFP, Sox17 (endoderma), PAX6, Nestina, Tubulina-β3 (ectoderma) (tabela 3.8).

A análise da expressão de genes específicos das três camadas germinativas foi feita por RT-PCR. O cDNA obtido conforme descrito anteriormente foi submetido à PCR usando primers específicos para os seguintes genes alvo: *NESTINA*, *GFAP* (Ectodermal), *SMA*, *CK8* e *CK18* (Mesodermal) e *AFP* e *SOX-17* (Endodermal) (tabela 3.6 e 3.7), conforme protocolos descritos anteriormente no item 3.4.1.

**Tabela 3.6.** Sequência dos primers utilizados para a amplificação dos genes em corpos embrioides

	Target	Primer sets	Tamanho do produto (pb)
RT-PCR Marcadores de diferenciação	GAPDH	Forward: TTC GAC AGT CAG CCG CAT C Reverse: GAC TCCACG ACGTAC TCA GC	213
	CK18	Forward: CAC ACA GTC TGC TGA GGT TGG AG Reverse: CTG CTG TCC AAG GCA TCA CCA	128
	CK8	Forward: AGC AGC AGA AGA CGG CTC GAA Reverse: GAA GTT GAT CTC GTC GGT CAG C	301
	NESTINA	Forward: AGC CCT GAC CAC TCC AGT TTA G Reverse: CCC TCT ATG GCT GTT TCT TTC TCT	290
	GFAP	Forward: CCC TGG ACA TCG AGA TCG C Reverse: TGT GCT CCT GCT TGG ACT C	348
	AFP	Forward: AGA GTT GCT AAA GGA TAC CAG GA Reverse: AGG CCA ATA GTT TGT CCT CAC	374
	SOX-17	Forward: GTG AAT CTC CCC GAC AGC Reverse: TGT TTT GGG ACA CAT TCA AAG C	352

**Tabela 3.7.** Condições de PCR para verificar a expressão dos genes alvos nos corpos embrioides

Gene	35 ciclos					
	Desnaturação		Anelamento		Extensão	
	T (°C)	Tempo (s)	T (°C)	Tempo (s)	T (°C)	Tempo
<b>GFAP</b>	95	30	60	30	72	4 min
<b>Nestina</b>	95	30	60	30	72	1 min
<b>AFP</b>	95	30	54	30	72	1 min 30 s
<b>CK8</b>	95	30	60	30	72	13 s
<b>CK18</b>	95	30	60	30	72	13 s
<b>SOX-17</b>	95	30	60	30	72	14 s
<b>GAPDH</b>	95	30	58	30	72	13 s

### 3.7.3. Imunofluorescência

Após verificar a ausência da expressão do VS nas iPSCs, em passagens superiores à P8, foi estudada a expressão de marcadores de pluripotência por imunofluorescência. Para isso, colônias iPSCs foram plaqueadas em placa de 96 poços (CellCarrier, Perkin-Elmer, USA) e fixadas com 4% de paraformaldeído durante 15 min à TA. As células fixadas foram permeabilizadas com Triton-X 0,3% e bloqueadas com BSA 2%. Posteriormente, as células foram lavadas com PBS e incubadas com anticorpo primário diluídos 1:1.000, a 4 °C, *overnight*, em câmara úmida.

Os anticorpos primários foram lavados com PBS (800 g durante 2 min) e as células incubadas com anticorpos secundários diluídos 1:400 à TA durante 1 h. Os anticorpos utilizados na imunofluorescência encontram-se descritos na tabela 3.8. Como passo seguinte, as células foram lavadas uma vez com PBS e incubadas com DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) durante 5 min. Finalmente, as células foram cobertas com glicerol, ao abrigo da luz, e armazenadas a 4 °C até a análise. As imagens foram adquiridas usando o microscópio invertido Evos XL Cell Imaging System (Thermo Fisher Scientific, USA) ou com o Operetta® High-Content imaging System, usando a objetiva 20X e High numerical apertures (NA) (PerkinElmer, USA).

**Tabela 3.8. Descrição dos anticorpos utilizados nos protocolos de imunofenotipagem**

Imunomarcação	Anticorpo	Fabricação	Nº de Catálogo	Diluição
• Marcadores de pluripotência	Rabbit anti-SOX2	Merck Millipore	MAB5603	1: 100
	Mouse anti-OCT3/4	Santa Cruz Biotechnologies	SC5279	1:100
	Mouse anti- Nanog	Millipore	AB-9220	1:00
	Mouse anti- TRA-1-81	Merck Millipore	MAB4371	1:100
	Mouse anti-TRA-1-60	Merck Millipore	MAB-4360	1:100
	Mouse anti-SSEA-4	Merck Millipore	MAB-4304	1:250
• Marcadores das três camadas germinativas	Mouse anti-SMA	Sigma-Aldrich	A2547	1:300
	Rabbit anti-Nestina	Sigma-Aldrich	N5413	1:250
	Mouse anti-Blll-Tubulina	Merck Millipore	MAB1637	1:100
	Mouse anti-PAX-6	Merck Millipore	MAB5552	1:100
	Rabbit anti-AFP	Santa Cruz Biotechnologies	SC15375	1:100
	Mouse anti-SOX-17	AB Cam	AB-84990	1:100
• Anticorpos secundários	Goat anti-rabbit IgG Alexa Fluor®488	Thermo Fisher Scientific	A11008	1:400
	Goat anti-mouse IgG Alexa Fluor®594	Thermo Fisher Scientific	A11032	1:400

### 3.7.4. Análise da ploidia

Para análise de ploidia, os granulócitos primários e as iPSCs foram sequenciadas por *low-pass whole-genome sequencing*. Para tanto, 100 ng de DNAg foram fragmentados enzimaticamente, seguido da ligação de adaptadores de sequenciamento usando o *Kit Ion Xpress™ Plus Fragment Library* (Thermo Fisher Scientific, USA).

O tamanho dos fragmentos ligados (entre 250 e 350 pb) foram selecionados por eletroforese usando gel de agarose pré-fabricado *E-Gel SizeSelect 2%* (Thermo Fisher Scientific, EUA). A biblioteca gerada de cada amostra foi amplificada por PCR usando a mistura de iniciadores com o *Kit Ion Xpress™ Plus Fragment Library* (Thermo Fisher Scientific, EUA). Após amplificação, a quantificação da biblioteca foi realizada por PCR em tempo real usando o *Ion Library Quantitation Kit*, conforme instruções do fabricante. Depois da diluição das bibliotecas para obter uma quantidade final de 24 pmol de cada uma delas, foram agrupadas para realizar a amplificação clonal usando o sistema *Ion OneTouch* seguido do enriquecimento da biblioteca com o equipamento *Ion OneTouch ES* (Thermo Fisher Scientific, EUA).

Finalmente, o sequenciamento das bibliotecas já misturadas foi realizado utilizando o *Ion PGM™ Hi-Q Sequencing kit* em Ion 316 Chip na *Ion Personal Genome Machine* (Thermo Fisher Scientific, EUA). A análise dos dados foi realizada usando o Ion

Reporter™ version 5.0 software. Os critérios definidos para verificar a precisão do número de cópias foi estabelecido em  $\geq 300,000$  leituras/amostra, assim como a diferença da mediana absoluta em pares (MAPD) foi  $\leq 0,3$  e uma profundidade média de cobertura foi estabelecida como  $\geq 0,2$ .

### 3.7.5. Análise do cariótipo

As células iPSCs foram plaqueadas em placas de 60 mm de diâmetro (Corning, USA) até atingir semiconfluência. Em seguida, foram adicionados 60  $\mu$ L de KaryoMAX® Democolcine (Sigma- Aldrich) (10  $\mu$ g/mL) para cada 5 mL de meio de cultura. As células foram incubadas na estufa com 5% de CO<sub>2</sub> a 37 °C durante 60 min, com o fim de inibir o ciclo celular na metáfase. Posteriormente, as células foram dissociadas com Accutase® por 5 min e realizada uma lavagem com PBS. Após centrifugação a 200 g durante 8 min, retirou-se o sobrenadante e foram adicionados lentamente 10 mL de solução hipotônica fresca (KLC 75 mM) pré-aquecida a 37 °C. As células foram homogeneizadas e incubadas a 37 °C durante 30 min. A seguir, a solução hipotônica foi inativada acrescentando-se fixador (metanol/ácido acético 3:1) lentamente. As células foram lavadas duas vezes com fixador e centrifugadas a 200 g durante 8 min, sendo a solução celular então estocada a -20 °C.

Como passo seguinte, a suspensão celular foi gotejada nas lâminas (previamente lavadas e refrigeradas a 4°C). Em seguida, as lâminas foram secas à TA e estocadas a 4°C ao menos durante 4 dias.

Para a análise da metáfase, foi utilizada a técnica GTG (Padrão de banda G-Tripsina-Giemsa). Para isso, as lâminas foram incubadas em solução de tripsina (1 mg/mL) diluída com tampão Dulbecco (Thermo Fisher Scientific, USA) composto de NaCl, KCl, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, NA<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>) aquecida a 37 °C por 3 a 4 segundos, sendo rapidamente retiradas e lavadas em um tampão fosfato (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, NaOH) (67 mM) (Thermo Fisher Scientific, USA) , gelado. Após secagem à TA, as lâminas foram cobertas com solução de Giemsa (10% em tampão fosfato) por 3 min e lavadas com água destilada. A análise do padrão de bandas foi realizada em microscópio (Olympus B653) utilizando o software *Applied Spectral Imaging* (Genesis). Vinte metáfases foram analisadas para cada clone das iPSCs derivadas do paciente P1.

### 3.7.6. Hibridação fluorescente *in situ* (FISH)

O processamento da amostra e fixação foi realizado com etanol 70% seguido de etanol 100%, colocados durante 5 min respectivamente. A posteriori, as amostras

permaneceram à TA até secar completamente. As amostras foram tratadas com RNase (Quiagen, USA), para isso 90 µL da mesma foi colocada nas lâminas, cobertas com uma lamínula plástica e incubadas a 37°C durante uma hora em câmara úmida. As lâminas foram fixadas com paraformaldeído 4% a temperatura ambiente durante 10 min no agitador. As amostras foram permeabilizadas, e o mix de hibridação foi colocado sob a lamínula e a seguir a lamínula invertida foi colocada em contato com a amostra *overnight*, a 37°C. Finalmente, com o fim de retirar o excesso de sondas foram realizadas lavagens pós-hibridação com PBS. Após anelamento da sonda com a sequência alvo, foi visualizadas em microscópio e detectado o sinal.

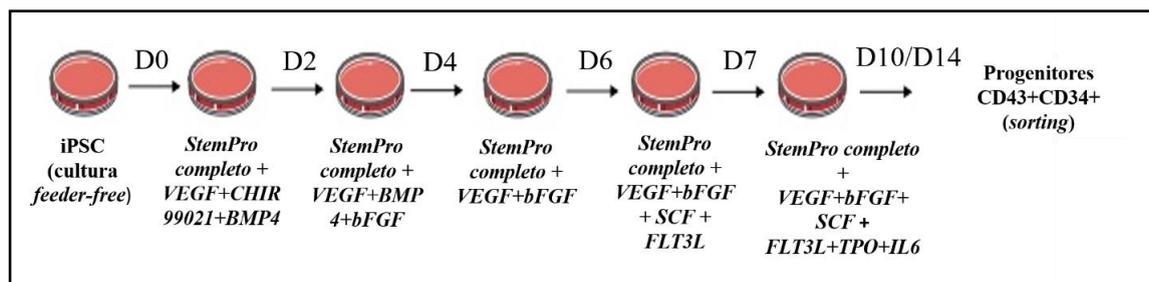
### **3.8. ETAPA C- Diferenciação hematopoiética *in vitro* a partir das iPSCs**

A partir da caracterização, as iPSCs derivadas de pacientes ou de controles foram selecionadas e induzidas à diferenciação hematopoiética para obtenção de progenitores hematopoiéticos e granulócitos maduros.

#### **3.8.1. Diferenciação em progenitores hematopoiéticos**

A diferenciação hematopoiética a partir de iPSCs foi induzida no sistema *feeder-free in vitro* conforme ilustrado na figura 3.5. As células foram repicadas mecanicamente. e plaqueadas em baixa quantidade sobre Geltrex™ em meio E8 em 4 poços de placa de 6 poços. As células foram incubadas em estufa a 37°C durante 24 h em 5% CO<sub>2</sub>. No dia seguinte (D=0), o meio foi trocado por meio RPMI 1640 (Thermo Fisher Scientific, USA) em ausência de soro, suplementado com 2 mM de L-Glutamina e 25 mM de HEPES (Thermo Fisher Scientific, USA). Em cada poço foram adicionados ao meio 20 ng/mL BMP-4, 50 ng/mL VEGF e 2 µM inibidor CHIR99021 (Sigma-Aldrich, USA). No dia 2 (D+2), o meio RPMI foi substituído por meio fresco adicionando-se 20 ng/mL BMP-4, 50 ng/mL VEGF, 20 ng/mL bFGF em ausência do inibidor CHIR99021.

No D+3, o meio RPMI foi trocado por meio StemPro (Thermo Fisher Scientific, USA) adicionando-se 20 ng/mL BMP-4, 50 ng/mL VEGF e 20 ng/mL bFGF. Nos D4 e D5 o meio foi substituído por meio StemPro fresco adicionando-se 15 ng/mL de VEGF e 20 ng/mL de bFGF. No seguinte dia (D+6), o meio StemPro foi substituído por meio fresco adicionando-se 25 ng/mL de bFGF, 25 ng/mL de SCF e 5 ng/mL de Flt3L. Finalmente, no D+7 foram adicionados 20 ng/mL de TPO, 1 U/mL de EPO e 10 ng/mL de IL-6. Todas as citocinas foram adquiridas de Thermo Fisher Scientific, USA. As placas foram monitoradas todos os dias até se observar o surgimento dos progenitores hematopoiéticos.



**Figura 3.5.** Esquema do protocolo de diferenciação hematopoiética *feeder free*.

### 3.8.2. Ensaios clonogênicos

Para avaliação do potencial clonogênico dos progenitores hematopoiéticos, dois tipos de ensaios foram realizados: metilcelulose e coágulo plasmático (do inglês: *plasm clot assay*). Ambos permitem identificar e quantificar o surgimento de colônias mieloides.

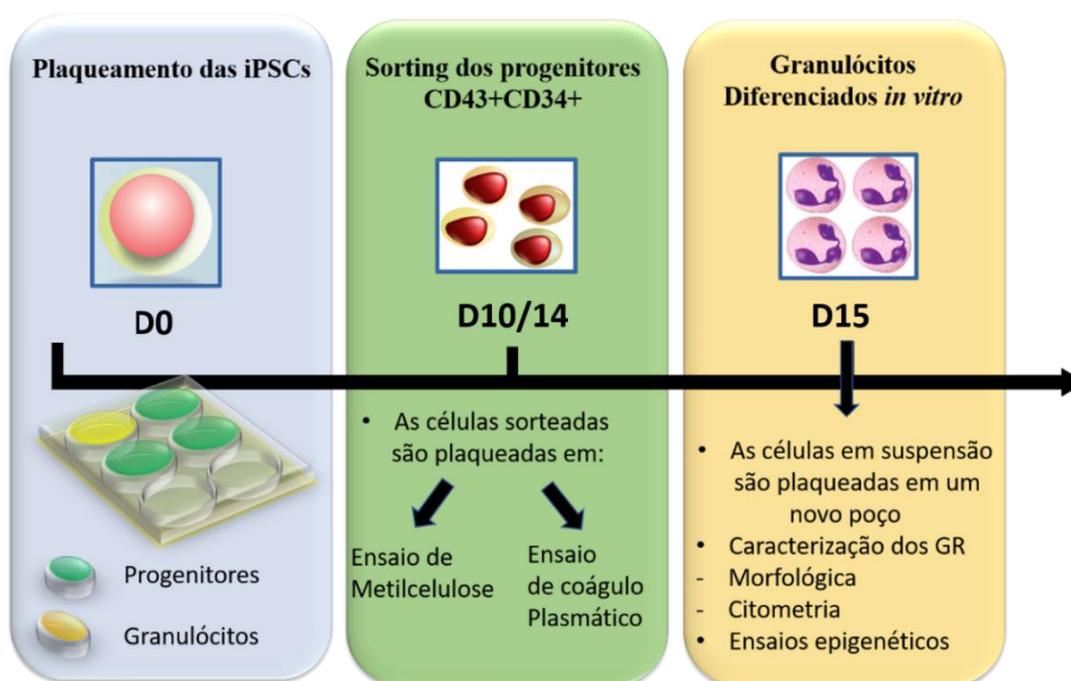
Entre o dia D10 e D11, foram selecionados 3 poços para os experimentos de avaliação do potencial clonogênico dos progenitores hematopoiéticos (metilcelulose ou ensaio de coágulo plasmático) e no poço restante foi dada continuidade ao experimento da diferenciação para granulócitos (Figura 3.6). Deste modo, no D10, três poços da placa foram selecionados e as células progenitoras hematopoiéticas em suspensão foram marcadas por imunofluorescência, como descrito anteriormente, usando os anticorpos CD43, CD34, CD235a e CD41a (Tabela 3.9). No mesmo dia, as células progenitoras CD43<sup>+</sup>CD34<sup>+</sup> foram sorteadas com o fim de dar seguimento aos próximos experimentos. Entre os dias D12 e D14 um segundo *sorting* foi realizado a partir dos mesmos poços em que foram sorteados os progenitores no D10, seguindo os procedimentos acima descritos.

**Tabela 3.9.** Anticorpos usados para o *sorting* dos progenitores hematopoiéticos diferenciados a partir das iPSCs

	Anticorpos	Fabricante	Nº de Catálogo	Diluição
<b>Imunofenotipagem dos Progenitores hematopoiéticos</b>	Mouse anti-CD43	BD Biosciences	560198	1:50
	Mouse anti-CD34	Beckman Coulter	A21691	1:50
	Mouse anti-CD235a	BD Biosciences	340947	1:50
	Mouse anti-CD41a	BD Biosciences	555466	1:50

Para avaliação do potencial clonogênico dos progenitores hematopoiéticos CD43<sup>+</sup>CD34<sup>+</sup>, foi realizado ensaio de metilcelulose para avaliação de Unidades Formadoras de Colônia (CFU) mieloides e Ensaio de coágulo plasmático para avaliação de Unidades Formadoras de Colônia Megacariocítica (CFU-MK). Para isso, os progenitores

hematopoiéticos  $CD43^+CD34^+$  sorteados (2.000 células/placa de 35  $cm^2$ ) foram ressuspensos em metilcelulose (MethoCult™ H4434, Stem Cells Technologies) suplementado com fatores de crescimento e citocinas hematopoiéticas capazes de promover a formação de todas as unidades formadoras de colônia (CFU- do inglês : *colony-forming unit*) mieloides. As colônias mieloides CFU que cresceram a partir dos progenitores hematopoiéticos foram quantificadas 12 dias após o plaqueamento.



**Figura 3.6.** Esquema dos experimentos realizados a partir do sorting dos progenitores hematopoiéticos  $CD43^+CD34^+$ .

Alternativamente, os progenitores hematopoiéticos  $CD43^+CD34^+$  sorteados foram ressuspensos em meio semissólido denominado de coágulo plasmático humano rico em fibrinogênio. O meio foi preparado com meio IMDM (Gibco), monotioglicerol (Sigma), 20  $\mu L/mL$  BSA suplementado com 10% de bicarbonato, lipossomos (preparado “*in-house*”), 3,7  $mg/mL$   $CaCl_2$ , 2  $mg/mL$  Asparagina, 140 $mg/mL$  ácido amino caproico e 10  $mg/mL$  fibrinogênio *Fraction I Type I-S* de plasma bovino (Aldrich-Sigma). Previamente o fibrinogênio foi dissolvido em PBS e incubado em estufa durante 30 min. Após filtração da solução com filtro 0,22  $\mu m$  (Millipore) foram adicionados 25  $ng/mL$  de SCF e 20  $ng/mL$  de TPO além de trombina (3 U/ $mL$ ) para coagulação do meio.

A seguir, as células foram ressuspensas e plaqueadas em placas de 35  $cm^2$ . As unidades formadoras de colônia (CFU-MK) megacariocíticas foram imunomarcadas com o anticorpo monoclonal anti-CD41a (BD Biosciences, N° de Catálogo: 555465) e identificada pelo método colorimétrico com fosfatase alcalina (AP) (Goat F(ab')<sub>2</sub> anti-mouse IgG

antibody conjugated to alkaline phosphatase, BD Biosciences, N° de Catálogo: A3562) usando o kit SIGMAFAST p-nitrophenyl phosphate tablets (Aldrich-Sigma Saint Louis, MO, USA). As colônias CFU-MK que cresceram a partir dos progenitores foram quantificadas 9 dias após plaqueamento.

### 3.8.3. Diferenciação das iPSC para geração de granulócitos *in vitro*

Para a diferenciação *in vitro* de granulócitos a partir de iPSCs, um poço de placa de 6 poços foi destinado à geração de células maduras em vez de sortear os progenitores hematopoiéticos. Desse modo, a partir do D10 da diferenciação hematopoiética, o meio StemPro foi trocado por meio StemPro fresco, adicionando-se 20 ng/mL de SCF, 10 ng/mL de IL-3 e 10 ng/mL de G-CSF. No dia 15 da diferenciação, as células em suspensão foram centrifugadas a 200 g por 3 min, o sobrenadante foi aspirado, e as células foram ressuspendidas em meio fresco em um poço de placa de 12 ou 6 poços (segundo a quantidade de células observadas no poço de origem). As células foram mantidas em cultura entre os dias D 25 e 30. As células foram monitoradas por citometria de fluxo conforme protocolo descrito anteriormente. Para a imunofenotipagem, foram usados os anticorpos anti-CD15, anti-CD14, anti-CD11b, anti-CD45 e anti-CD43 (Tabela 3.10).

**Tabela 3.10.** Anticorpos usados para imunofenotipagem dos granulócitos diferenciados a partir das iPSCs

	Anticorpos	Fabricante	N° de Catálogo	Diluição
<b>Imunofenotipagem dos granulócitos diferenciados <i>in vitro</i></b>	Mouse anti-CD14	BD Biosciences	561384	1:200
	Mouse anti-CD15	BD Biosciences	561584	1:200
	Mouse anti-CD34	Beckman Coulter	A21691	1:200
	Mouse anti-CD43	BD Biosciences	560198	1:200
	Mouse anti-CD45	BD Biosciences	555482	1:200

Para complementar a caracterização dos granulócitos obtidos *in vitro*, as células foram avaliadas segundo a morfologia. Desse modo, as células foram avaliadas pelo método May-Grünwald-Giemsa.

### **3.9. Análise estatística**

Os resultados obtidos foram apresentados na forma de gráficos, expressos como média  $\pm$  desvio padrão (DP). As análises estatísticas foram realizadas no Prisma software v.5. Os valores foram analisados com o teste One-way ANOVA (não paramétrico) combinado com pós teste de Tukey para comparar as amostras entre si. Os resultados foram considerados significativamente diferentes quando  $p < 0,05$ .

## 4. RESULTADOS

O presente trabalho foi dividido em quatro etapas principais. A primeira etapa (Etapa A) consistiu na seleção dos pacientes com MF portadores de mutações *driver* em genes associados a proliferação (*JAK2* ou *CALR*), mutações em reguladores epigenéticos (*TET2*, *IDHI*, *ASXL1*) ou associados à transformação leucêmica (*TP53*). Após a seleção dos pacientes com base em dados prévios de NGS, foi realizada a revalidação por sequenciamento de Sanger da presença das mutações nos granulócitos primários dos pacientes.

Na segunda etapa (Etapa B), as células primárias dos pacientes selecionados na etapa A foram submetidas à reprogramação celular. Para tanto, a expansão dos eritroblastos a partir de progenitores CD34<sup>+</sup> dos pacientes e doadores saudáveis (controles) foi realizada como um passo prévio à reprogramação celular. Após a obtenção de colônias, as iPSCs foram caracterizadas quanto ao *status* mutacional e de pluripotência. Esta etapa teve como objetivo avaliar a influência das mutações dos genes reguladores epigenéticos ou associados à transformação leucêmica no processo de indução de pluripotência.

A seguir, na etapa C, as colônias de iPSCs derivadas dos pacientes e controles foram selecionadas para indução da diferenciação hematopoiética *in vitro*, visando estudar a influência das mutações em tal processo. Finalmente, na etapa D, os ensaios epigenéticos serão realizados com o objetivo de comparar o *status* de metilação e expressão gênica de alvos de interesse das células granulocíticas primárias do paciente, as iPSCs e os granulócitos rediferenciados *in vitro* a partir das iPSCs (ver perspectivas futuras).

### 4.1. ETAPA A- Caracterização das amostras dos pacientes com mielofibrose primária

#### 4.1.1. Caracterização molecular dos granulócitos

Estima-se que cerca de 50% dos pacientes com MF sejam portadores da mutação *driver* *JAK2*<sup>V617F</sup> e cerca de 30%, de mutações no gene *CALR*. Em torno de 80% das mutações em *CALR* correspondem a uma inserção de 5pb (ins5, tipo 1) (32%) ou uma deleção de 52pb (del52, tipo 2) (58%). Mutações *driver* em *JAK2* e *CALR*, em geral, são descritas como mutuamente exclusivas. As mutações *driver* foram associadas com a ativação constitutiva da via JAK-STAT e responsáveis pelo fenótipo mieloproliferativo (RAMPAL *et al.*, 2017).

Além dessas mutações nos genes relacionados à proliferação, uma alta frequência de mutações somáticas *non-driver*, ou também nomeadas cooperativas, em genes

reguladores epigenéticos e de transformação leucêmica foram descritas em pacientes com MF e associadas a progressão da doença (RUTHER *et al.*, 2011, LUNDERGERG *et al.*, 2014).

Nosso grupo de pesquisa no laboratório de Biologia Molecular do CEMO INCA realiza diagnóstico molecular rotineiro para os pacientes com NMP. As técnicas utilizadas, entre outras, são PCR alelo específico para detecção da mutação  $JAK2^{V617F}$ , PCR convencional e análise de fragmento por eletroforese capilar para identificação de indels no éxon 9 de *CALR* e sequenciamento direto para identificar mutações no éxon 10 de *MPL*. Além disso, utilizando NGS, o grupo realizou a caracterização de uma coorte de 37 pacientes com MF para um painel de 37 genes, visando detectar mutações somáticas adicionais.

Baseados no resultado da caracterização molecular da coorte de estudo dos pacientes com MF, na primeira etapa do presente projeto foram selecionados 6 pacientes para uma posterior reprogramação celular. Os pacientes foram selecionados em função das mutações detectadas: mutações *driver* ( $JAK2^{V617F}$  ou *CALR* indels), e mutações adicionais em genes reguladores epigenéticos como *IDHI*, *TET2*, *ASXL1* ou associados à transformação leucêmica, como *TP53*. Sendo assim, os genótipos identificados nesses pacientes pelo NGS foram revalidados pelo método clássico de sequenciamento de Sanger.

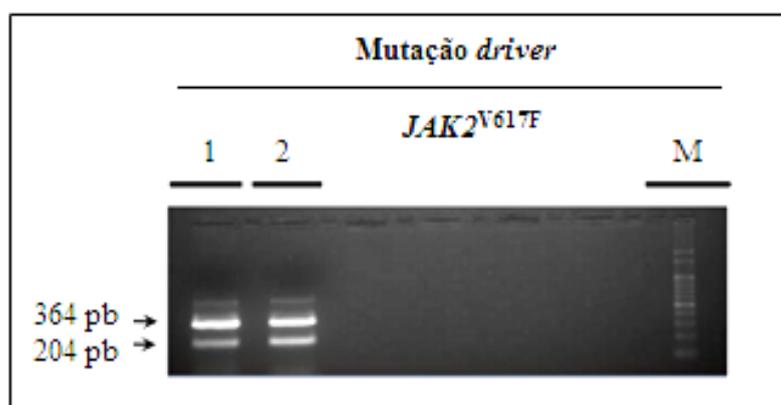
A tabela 4.1 resume as principais informações dos 6 pacientes (P1-P6) selecionados, assim como dos doadores saudáveis utilizados como controles (C1 e C2). Do mesmo modo, encontra-se descrito o genótipo identificado na caracterização molecular pelo NGS e a frequência alélica das mutações.

O paciente P1 carrega a mutação  $JAK2^{V617F}$  com uma carga alélica mutacional de 92% segundo os dados obtidos pelo NGS, o que sugere que possui os dois alelos mutados na mesma célula. Nas NMPs é descrito que a recombinação mitótica leva à perda de heterozigosidade (LHO) do braço curto do cromossomo 9 (Dissomia Uniparental) e, deste modo, resulta em homozigose para mutação de  $JAK2^{V617F/V617F}$ .

Por outro lado, no paciente P2 a mutação em  $JAK2^{V617F}$  foi detectada com 42% de carga alélica mutacional. Para confirmação do genótipo dos granulócitos isolados do P1 e P2 foi realizado PCR alelo específico para  $JAK2^{V617F}$  (Figura 4.1) e sequenciamento pelo método de Sanger da banda correspondente ao controle interno (dado não mostrado). Para P2, os resultados do NSG também indicaram a presença de mutações nos genes reguladores epigenéticos *IDHI* e *TET2*, embora com uma baixa frequência alélica (12 e 5,6% respectivamente). Por estarem abaixo da sensibilidade esperada para o método de sequenciamento direto de Sanger, esses dados não foram revalidados por esta metodologia.

**Tabela 4.1. Pacientes com MF selecionados para reprogramação celular.** Principais informações clínicas e genóticas dos pacientes (P1-P6) e dos controles (C1 e C2) selecionados para uma posterior reprogramação celular. (\*) Considerando que a carga alélica das mutações nos genes *TET2* e *IDH1* nas células primárias do P2, determinadas por NGS, apresentaram baixos valores, e que a sensibilidade analítica do sequenciamento clássico se estima em um mínimo de detecção da mutação de 10 a 20%, as mutações correspondentes a ambos os genes não foram revalidadas pelo método de Sanger. No entanto, foram sequenciadas as iPSCs geradas a partir das células do paciente P2. s-AML: Leucemia mieloide aguda secundária, M: masculino, F: feminino, NGS: Next Generation Sequencing, GR: Granulócitos primários, CD34: Células tronco/progenitores hematopoiéticos CD34+, n.d.: informação não disponível.

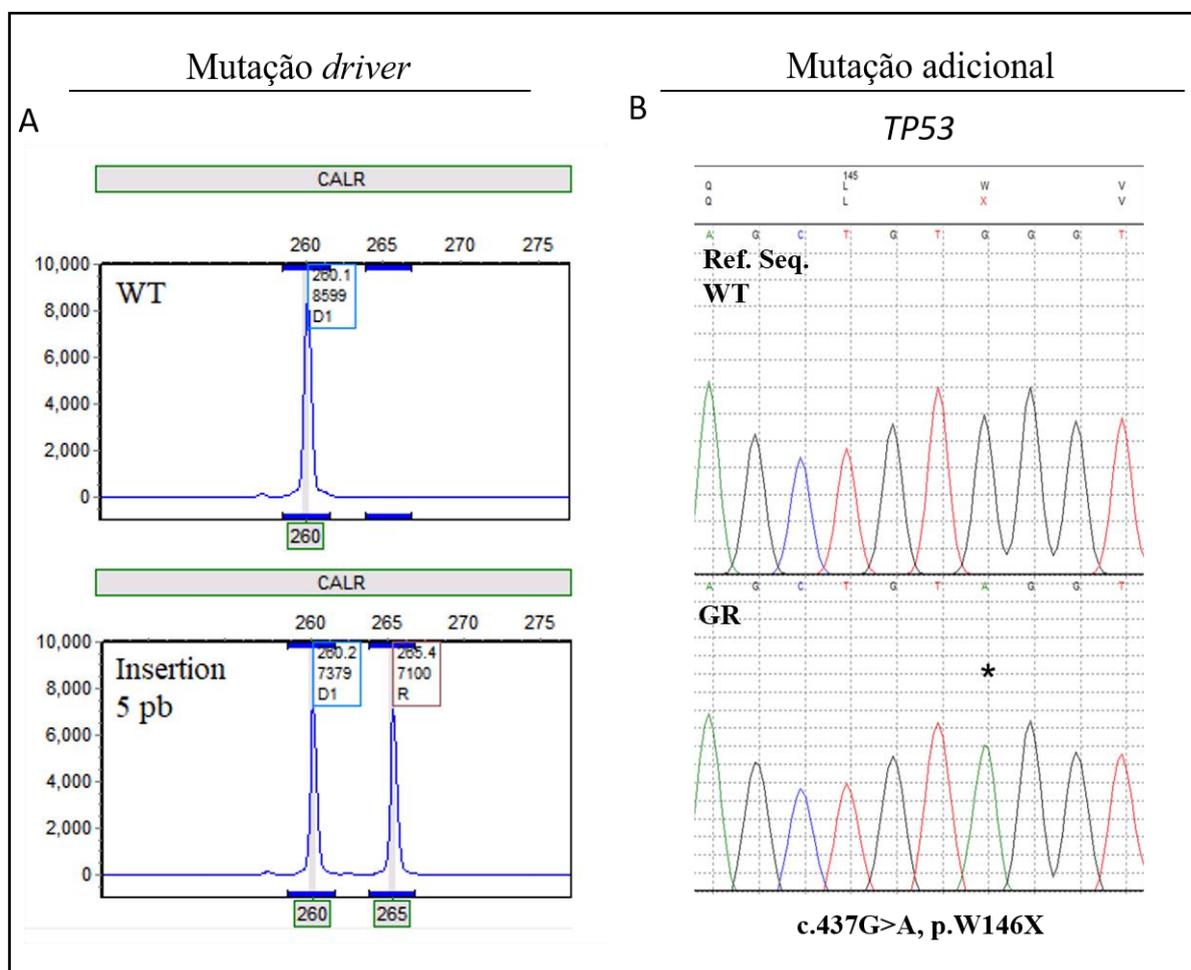
Informações do paciente				Genótipo		Dados do NGS				Revalidação
Paciente (P)	Fenótipo	sexo	Idade	Mutação driver	Mutação adicional	Nº de amostra	Tipo de células	reads	Frequência	Método de Sanger
P1	MF	M	57	<i>JAK2</i> V617F c.1849G>T	-	29279	GR	538/545	98% ( <i>JAK2</i> )	Sim
P2	MF	M	n.d	<i>JAK2</i> V617F c.1849G>T	<i>TET2</i> , c.4757C>A, p.S1586X <i>IDH1</i> , c.395G>A, p.R132H	29343	GR	136/326 14/247 64/524	42% ( <i>JAK2</i> ) 5,6% ( <i>TET2</i> ) 12% ( <i>IDH1</i> )	Sim (*)
P3	MF	M	67	<i>CALR</i> ins5	<i>TP53</i> , c.437G>A, p.W146X	30579	GR	378/422	89% ( <i>TP53</i> )	Sim
P4	MF	M	52	<i>CALR</i> ins5	<i>TET2</i> , c.2692G>T, p.G898X <i>ASXL1</i> , c.1934insG, p.G646fs*12	29344	GR	722/892	80% ( <i>TET2</i> )	Sim
P5	MF	M	60	<i>JAK2</i> V617F c.1849G>T	<i>ASXL1</i> , c.1771_1772insA, p.Y591fs*1	29280	GR	90/207 185/396	43% ( <i>JAK2</i> ) 47% ( <i>ASXL1</i> )	Sim
P6	s-AML	F	61	<i>CALR</i> del52	<i>ASXL1</i> , c.2077C>T, p.R693X	45139	GR	179/384	46% ( <i>ASXL1</i> )	Sim
C1	Doador	n.d	n.d	WT	WT	-	CD34	-	-	Sim
C2	Doador	M	32	WT	WT	-	CD34	-	-	Sim



**Figura 4.1. Caracterização molecular dos granulócitos dos pacientes P1 e P2.** PCR alelo específico para identificação do alelo mutado *JAK2*<sup>V617F</sup> (204 pb). A banda de 364 pb corresponde ao controle interno (CI) do PCR. 1. M: Marcador, 2: GR isolado de P1, GR isolado de P2

No paciente P3 foi detectada uma mutação *driver* no gene da *CALR*<sup>ins5</sup> (c.1154\_1155insTTGTC, k385fs\*47) e uma mutação adicional (*nonsense*) no gene *TP53*

(c.437G>A, p.W146X) localizada no éxon 5, que resulta em um códon de parada (*stop codon*) e cuja carga alélica mutacional identificada pelo NGS foi de 89%. A mutação foi revalidada pelo método de Sanger na amostra de granulócitos (Figura 4.2).



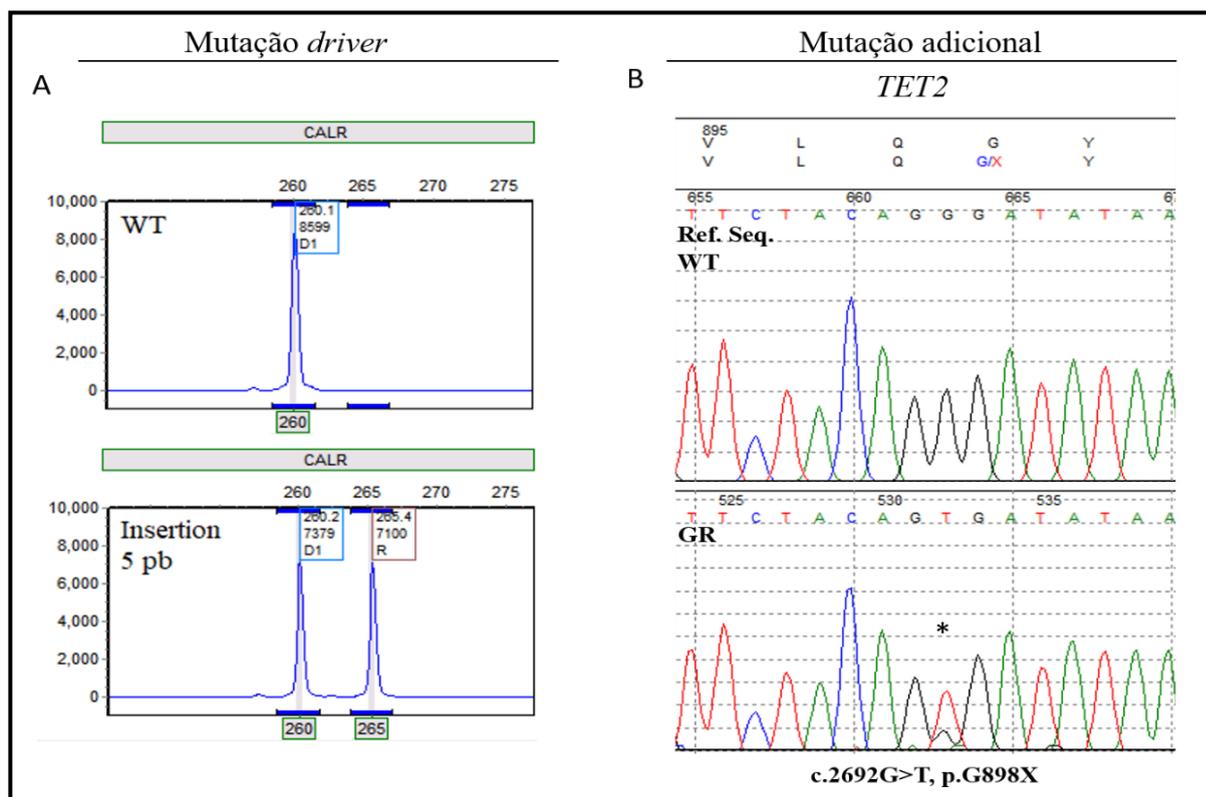
**Figura 4.2. Caracterização molecular dos granulócitos do paciente P3.** **A.** Após PCR convencional e análise de fragmentos por eletroforese capilar identificou-se uma inserção de 5pb no gene da *CALR*. **B.** Sequenciamento da banda correspondente ao gene *TP53* (éxons 4 e 5). Acima seqüência de referência obtida do *NCBI Data Base*, e em baixo sequenciamento dos granulócitos isolados do paciente P3.

Já o paciente P4, além de ser portador da mutação no gene da *CALR*<sup>ins5</sup> (c.1154\_1155insTTGTC, k385fs\*47), apresenta uma mutação pontual no gene *TET2* (c.2692G>T, p.G898X), que resulta em um códon de parada.

Outro dos genes reguladores epigenéticos mutados no paciente P4 foi *ASXL1* com uma mutação *frameshift* (c.1934\_1935insG) no éxon 12, posição 646 (p.G646fs\*12), ocorrendo uma inserção de uma G posterior a uma seqüência de 8 G (Figura 4.3).

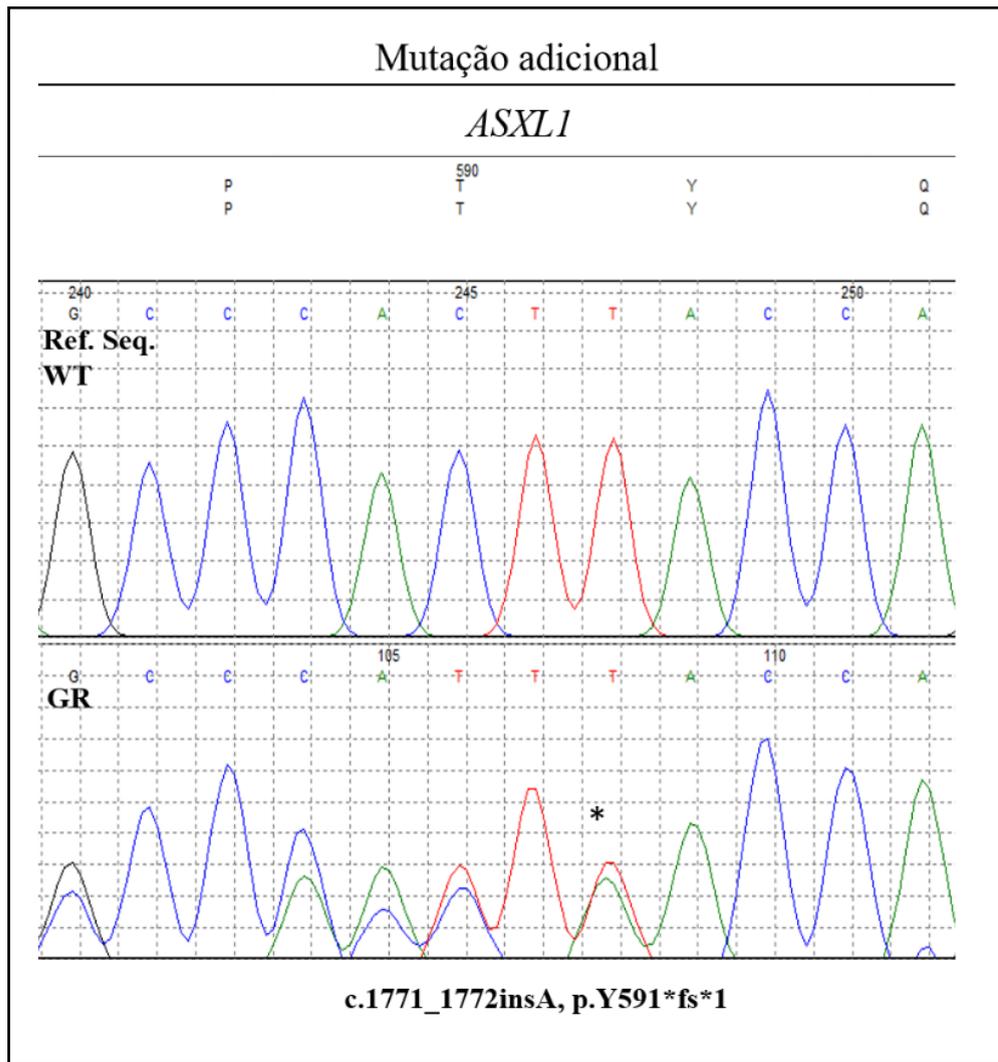
No paciente P5 foi identificada a mutação *driver* *JAK2*<sup>V617F</sup> e uma mutação *frameshift* (c.1771\_1772insA) no éxon 12 do gene *ASXL1* na posição 591 (p.Y591fs\*1). A

revalidação por sequenciamento direto foi realizada utilizando-se o *primer* reverse (Figura 4.4.).

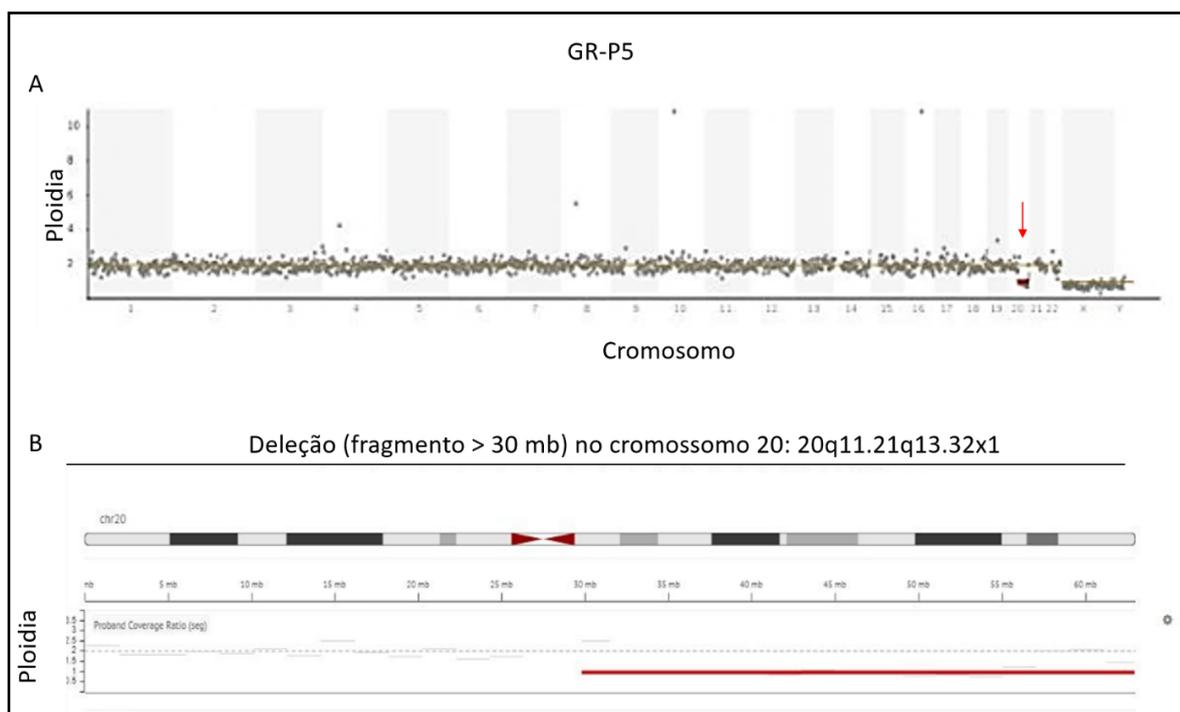


**Figura 4.3. Caracterização molecular dos granulócitos do paciente P4.** A. Após PCR convencional e análise de fragmentos por eletroforese capilar identificou-se uma inserção de 5pb no gene da CALR. B. Sequenciamento da banda correspondente ao gene *TET2* (éxon 3). Acima, podemos observar a sequência de referência obtida do *NCBI Data Base* e abaixo o sequenciamento dos granulócitos isolados do paciente P4.

Posteriormente, esta mesma amostra de granulócitos foi caracterizada usando a técnica de sequenciamento low-pass whole-genome para avaliar aneuploidias. A figura 4.5 mostra um fragmento deletado, maior do que 30 Mb, identificado no cromossomo 20 na posição 20q11.21q13.32x1. Uma lista de genes baseado no mapeamento da região deletada foi identificada, entre eles encontram-se os reguladores epigenéticos *ASXL1* e *DNMT3b*, proteína tirosina fosfatase *PTPN1*, o fator de transcrição CCAAT enhancer-binding protein-beta (*CEBPB*), o E2F, entre outros. A lista completa de alguns genes contidos na região cromossômica deletada está descrita no anexo 5.

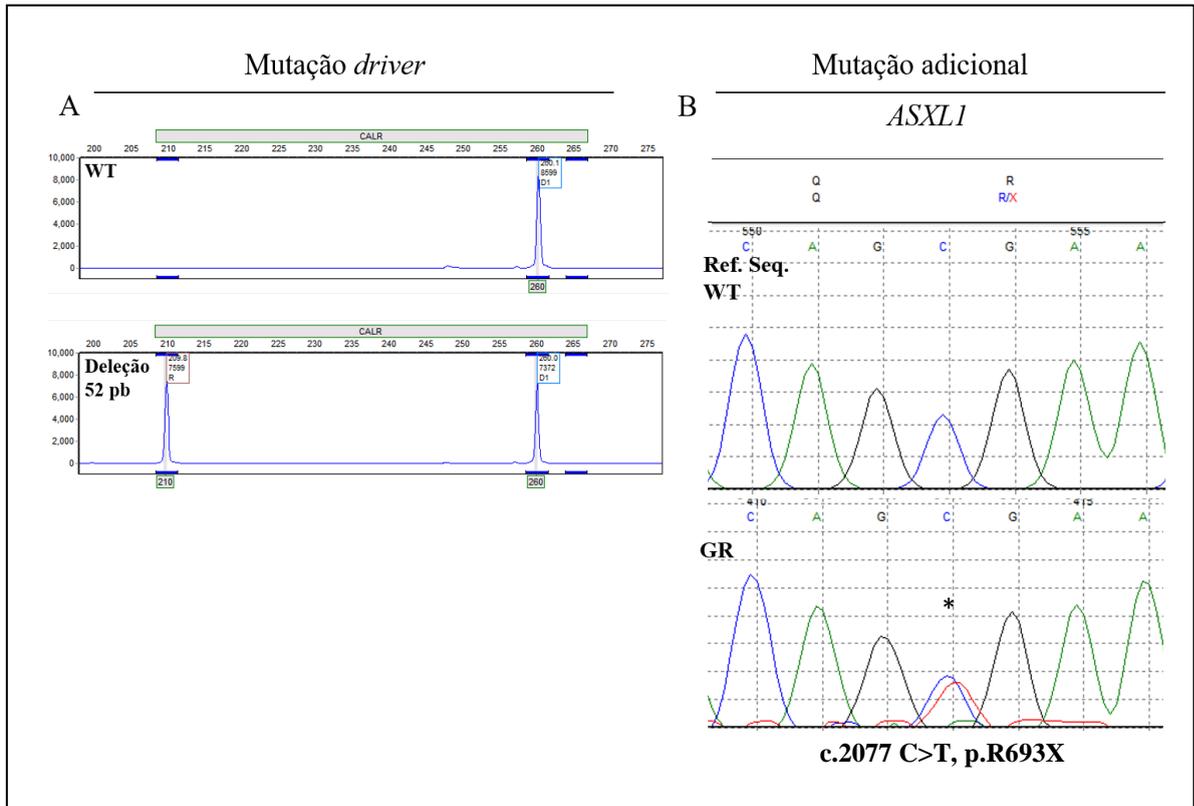


**Figura 4.4. Caracterização molecular dos granulócitos do paciente P5.** Sequenciamento da banda correspondente ao gene *ASXL1* (éxon 12). Acima sequência de referência obtida do *NCBI Data Base* e embaixo sequenciamento dos granulócitos isolados do paciente P5.



**Figura 4.5. Análise de aneuploidia dos granulócitos do paciente P5.** A. Imagem da análise do número de cópias (CNV) de cada cromossomo avaliado usando o low-pass whole genome sequencing Snapshot of IGV Ligth Whole Genome. **A.** A deleção foi identificada no cromossomo 20 (seta vermelha). Os pontos correspondem a sequências de 2 Mb. As informações da leitura do GR-P5 foram: MAPD: 0,179, Read count: 205,251, Total de número de bases: 340 Mb, Número de bases totais (AQ20): 320Mb., *Mean coverage depth (fold)*: 0,1. MAPD: *median absolute pairwise difference*. **B.** Imagem que representa o fragmento deletado do cromossomo 20.

O paciente P6 foi diagnosticado com MF de acordo com os critérios da WHO aos 58 anos no HUPE, 2,7 anos mais tarde a doença progrediu para leucemia mieloide aguda (LMA). Em ambos os estágios da doença foi identificada uma deleção de 52pb no gene da *CALR* (c.1092\_1143del) e uma mutação pontual no gene *ASXLI* na posição 693 (p.R693X) resultando em um códon de parada. A carga alélica da mutação, segundo os dados de NGS, era de 47%. A validação dessa mutação foi feita por sequenciamento de Sanger da mesma amostra de granulócitos (Figura 4.6).



**Figura 4.6. Caracterização molecular dos granulócitos do paciente P6.** A. Após PCR convencional e análise de fragmentos por eletroforese capilar identificou-se uma deleção de 52pb no gene da *CALR*. B. Sequenciamento da banda correspondente ao gene *ASXL1*<sup>R693X</sup> (éxon 12). Acima seqüência de referência obtida do *NCBI Data Base* e abaixo o sequenciamento dos granulócitos isolados do paciente P6.

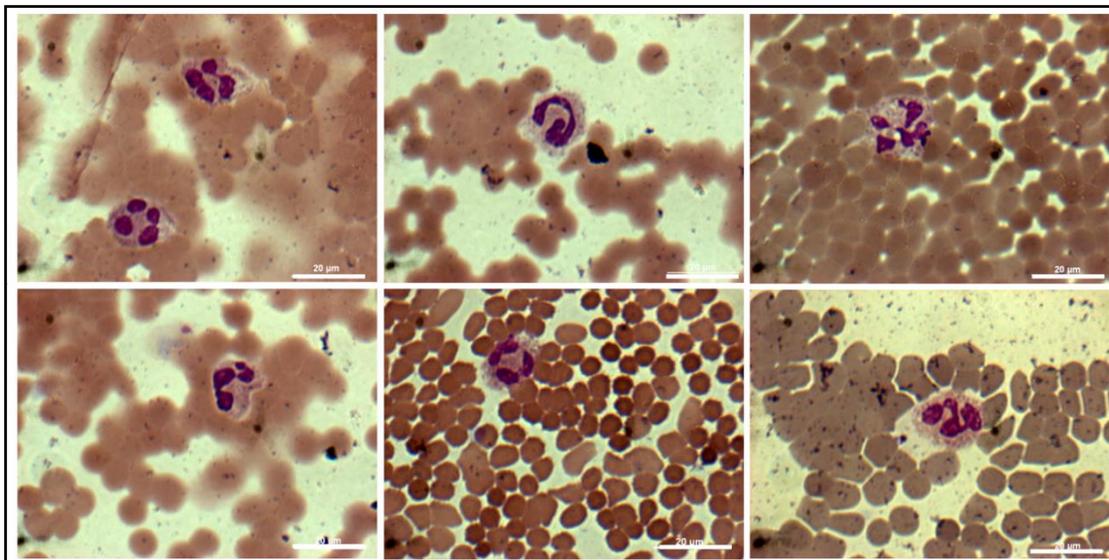
#### 4.1.2 Caracterização morfológica e imunofenotípica de granulócitos primários

No presente projeto, foi proposto como um dos objetivos avaliar as alterações epigenéticas e de expressão gênica dos granulócitos primários isolados dos pacientes e comparar com os granulócitos diferenciados *in vitro* a partir das iPSCs derivadas dos pacientes.

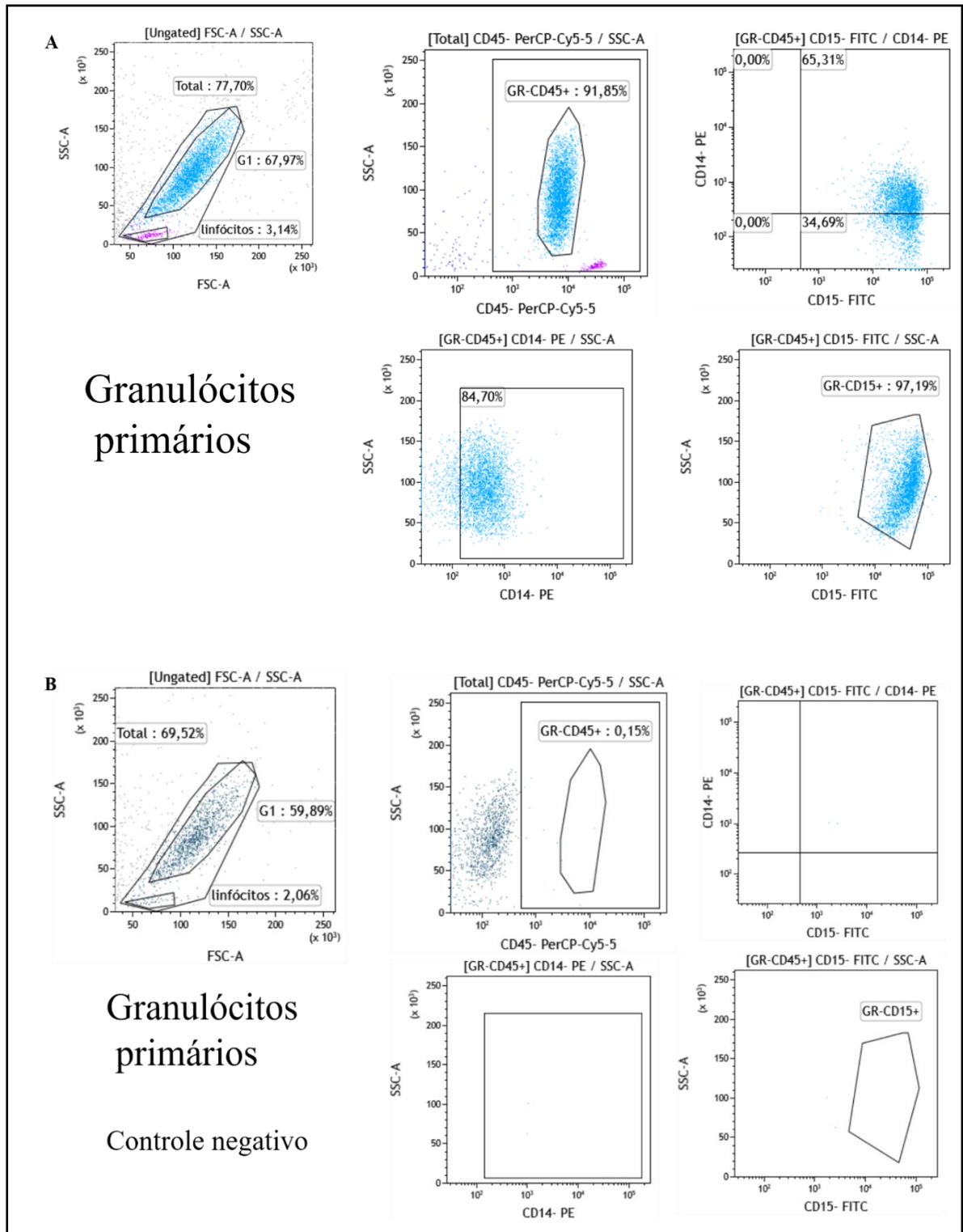
Visando estimar a pureza da fração granulocítica obtida após o procedimento rotineiro de separação em gradiente de Ficoll, amostras de cinco pacientes com MF foram aleatoriamente selecionadas para avaliação morfológica e imunofenotípica. Após a separação da camada correspondente aos granulócitos, as amostras foram avaliadas quanto às características morfológicas utilizando a técnica May-Grünwald-Giemsa. Nas amostras dos pacientes foram observados mais frequentemente neutrófilos (Figura 4.7).

Para complementar esses resultados, os marcadores específicos de granulócitos foram avaliados por citometria de fluxo, entre eles o antígeno CD15, expresso em cerca de 90% dos granulócitos em circulação. O antígeno CD14 também foi avaliado, marcador expresso em níveis baixos em neutrófilos e em altos níveis em monócitos (ANTAL-

SZALMAS *et al*, 1997). A figura 4.8 é ilustrativa da citometria de fluxo dos granulócitos isolados dos pacientes com MF, representada pela análise obtida do primeiro paciente. Os resultados evidenciam uma pureza média das amostras de granulócitos cerca de 84% (população G1), e a população CD45+ e o marcador CD15+ cerca de 99% (tabela 4.2).



**Figura 4.7. Morfologia dos granulócitos separados a partir de sangue periférico de pacientes com MF.** Imagem dos granulócitos isolados da amostra correspondente ao primeiro paciente dos cinco selecionados. As células foram coradas usando o método de May-Grünwald-Giemsa. As imagens foram adquiridas usando o microscópio Axioskop 40 (Carl Zeiss Microscopy, LLC, DA) e analisadas com o AxioVision LE 4.8.1 Microscopy Software, a barra corresponde a 20 µm.



**Figura 4.8. Imunofenotipagem dos granulócitos separados por Ficoll. A.** Os granulócitos primários isolados de pacientes com MF foram avaliados por citometria de fluxo usando os marcadores: CD45, CD15 e CD14. Os marcadores CD15 e CD14 foram avaliados dentro da população CD45<sup>+</sup>. **B.** Controle negativo da citometria dos granulócitos primários. GR: granulócitos.

**Tabela 4.2. Análise por citometria de fluxo de cinco amostras de granulócitos separadas por Ficoll.** Os granulócitos foram separados por Ficoll a partir de amostras de sangue periférico de 5 pacientes diferentes. Os valores mostrados na tabela correspondem às amostras dos pacientes selecionados aleatoriamente, sendo os resultados representativos das análises de granulócitos primários dos 5 pacientes com MF.

Paciente (P)	Fenótipo	Pureza da amostra		Marcadores específicos (análise dentro do Gate: GR-CD45 <sup>+</sup> )			
		SSC vs FSC Linfócitos (%)	SSC vs FSC População GR (%)	CD15 <sup>+</sup> (%)	CD14 <sup>+</sup> (%)	CD14 <sup>+</sup> /CD15 <sup>+</sup> (%)	CD14 <sup>+</sup> /CD15 <sup>+</sup> (%)
Amostra 1	MF	3,14	87,47	97,19	81,70	65,31	34,68
Amostra 2	MF	8,95	80,9	99,7	74,47	50,86	49,3
Amostra 3	MF	20,67	69,1	99,55	54,42	27,90	72,09
Amostra 4	MF	5,31	88,9	98,74	80,78	61,38	34,69
Amostra 5	MF	2,56	93,4	99,69	85,80	38,77	61,21

#### **4.2. ETAPA-B: Reprogramação celular a partir de células CD34<sup>+</sup> de pacientes e de doadores saudáveis.**

Na etapa B do presente estudo, estabelecemos como objetivo avaliar se as mutações nos genes reguladores epigenéticos *TET2* e *ASXL1*, assim como no gene *TP53*, poderiam influenciar na reprogramação das células dos pacientes e na manutenção do estado de pluripotência destas iPSCs.

O segundo objetivo foi avaliar se a partir das iPSCs geradas de cada paciente poderíamos identificar os diferentes genótipos e inferir a arquitetura clonal desses pacientes. Para tanto, a avaliação do *status* mutacional das iPSCs foi baseado nos mesmos protocolos de caracterização molecular utilizados para os granulócitos primários dos pacientes.

##### **4.2.1. Diferenciação *in vitro* de eritroblastos a partir de células tronco/progenitoras hematopoiéticas**

Previamente à reprogramação celular, as células mononucleares e granulócitos primários dos pacientes foram separadas por Ficoll. Em seguida, a fração correspondente aos granulócitos foi utilizada para a caracterização molecular como descrito anteriormente

e a camada correspondente às células mononucleares foi utilizada para enriquecimento das células tronco/progenitoras hematopoiéticas CD34<sup>+</sup>. Sendo assim, a primeira etapa efetuada como parte do protocolo da reprogramação celular, previamente à transdução com vírus Sendai, foi a partir das células CD34<sup>+</sup> de dois controles e dos pacientes P1-P5 induzir a diferenciação e expansão *in vitro* para eritroblastos.

Entre 15 e 20% dos pacientes com MF podem desenvolver leucemia. Entre os genes mutados identificados nesses pacientes, encontra-se o gene *ASXL1*, detectado como um dos genes mais frequentemente mutados, atrás apenas de *JAK2* e *CALR* na MF.

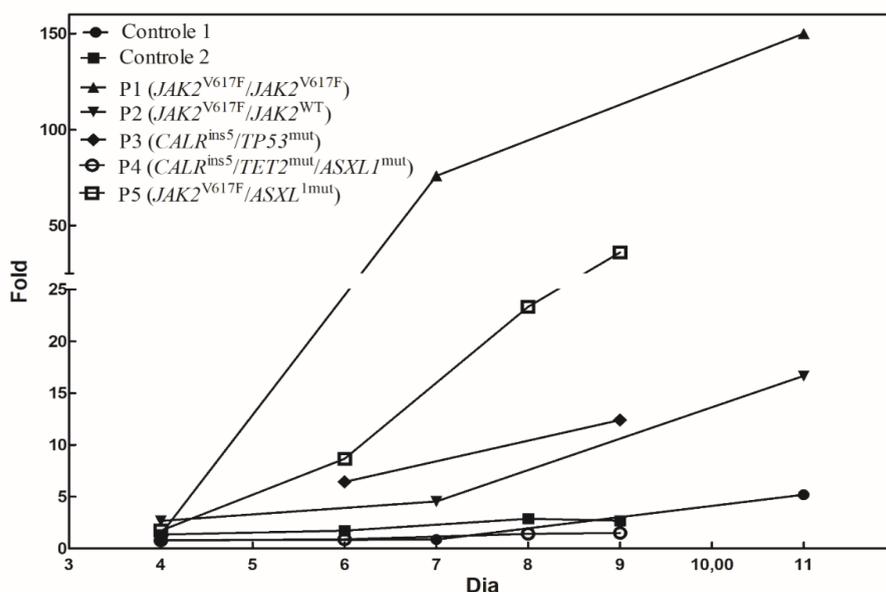
Em algumas neoplasias mieloides, que inclui casos nos pacientes com MF, as mutações no gene *ASXL1* são frequentemente identificadas tanto nos estágios pré-leucêmicos quanto após transformação leucêmica (20-35%) (FERRER-MARÍN *et al.*, 2013). Entretanto, o papel das mutações no gene *ASXL1* no processo de transformação ainda precisa ser elucidado.

Desse modo, a fim de obter um modelo *in vitro* de leucemia mieloide aguda pós-MF de um paciente portador de uma mutação no gene *ASXL1*, iniciamos a reprogramação celular do paciente P6 a partir das células CD34<sup>+</sup>.

No caso dos pacientes P1-P5, após a expansão e diferenciação *in vitro* dos eritroblastos, uma parte dessas células foi destinada à caracterização molecular e a outra parte à reprogramação celular. As diferenciações foram realizadas em três momentos diferentes: no primeiro momento foram incluídos P1, P2 e C1; no segundo, P3 e um controle (resultado não mostrado) e, por fim, P4, P5 e C2 na última reprogramação.

Uma curva da expansão *in vitro* dos eritroblastos diferenciados a partir dos progenitores hematopoiéticos CD34<sup>+</sup> dos pacientes e controles foi estabelecida, com o aumento em “vezes” (*fold*) versus tempo, relativas ao número inicial das células quantificadas no dia 0 da diferenciação (Figura 4.9).

A curva mostra um aumento progressivo do número de células observado entre os dias 0 e 11. As células dos pacientes que apresentaram mutações em *JAK2*<sup>V617F</sup> como P1, P2 e P5 proliferaram 150, 16 e 36 vezes respectivamente em relação ao número inicial de células (dia 0 da diferenciação). Para o paciente P3 com mutação no gene *CALR*<sup>ins5</sup> e *TP53*<sup>W416X</sup> o número de células aumentou em 12 vezes. O número de células do paciente P4 aumentou 1,5 vezes enquanto as células dos controles C1 e C2 proliferaram 5 e 2,7 vezes respectivamente.

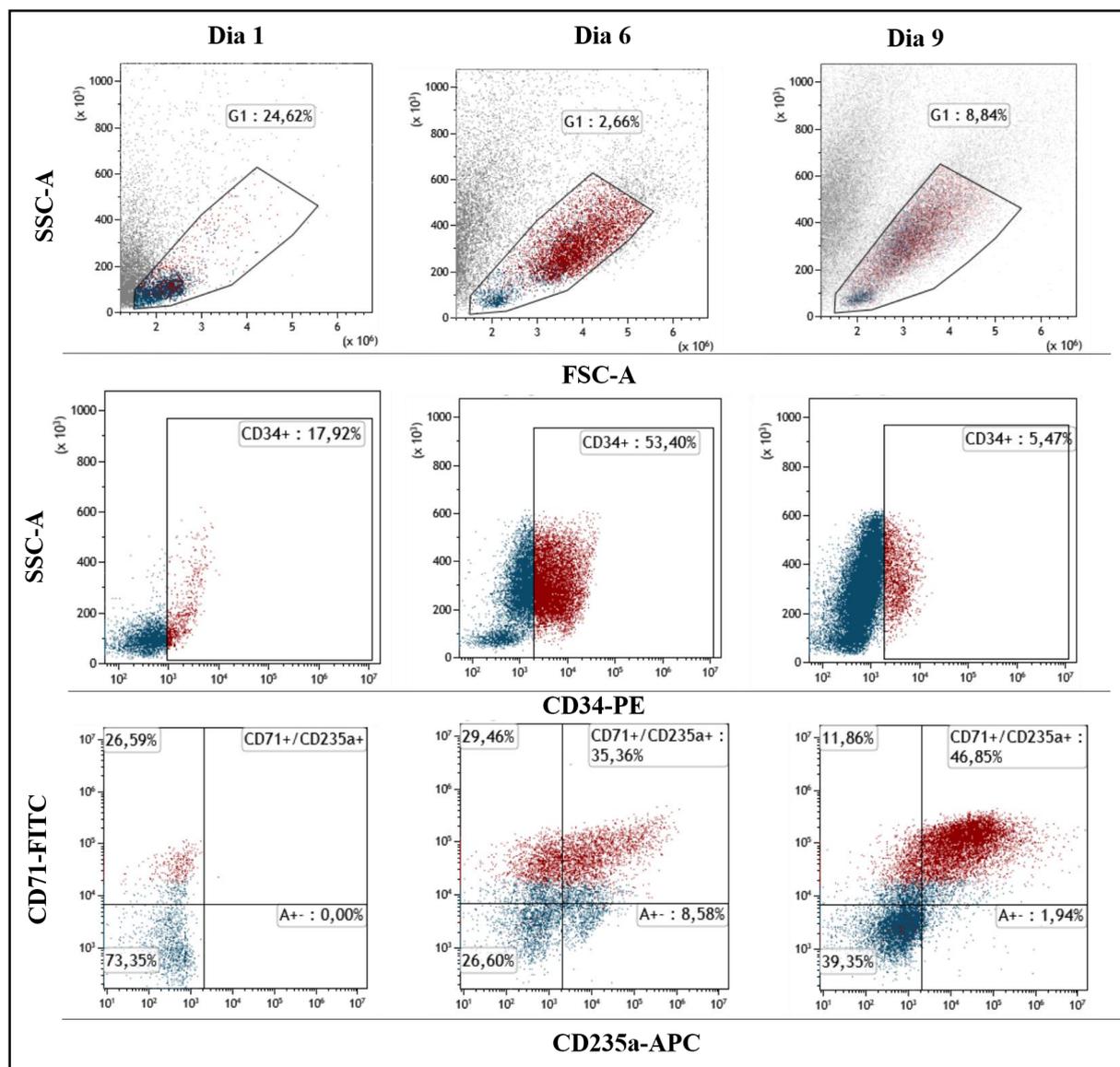


**Figura 4.9.** Curva de expansão e diferenciação dos eritroblastos a partir das células tronco/progenitoras hematopoiéticas CD34<sup>+</sup>. A contagem celular foi feita em câmara de Neubauer realizando a exclusão das células não viáveis.

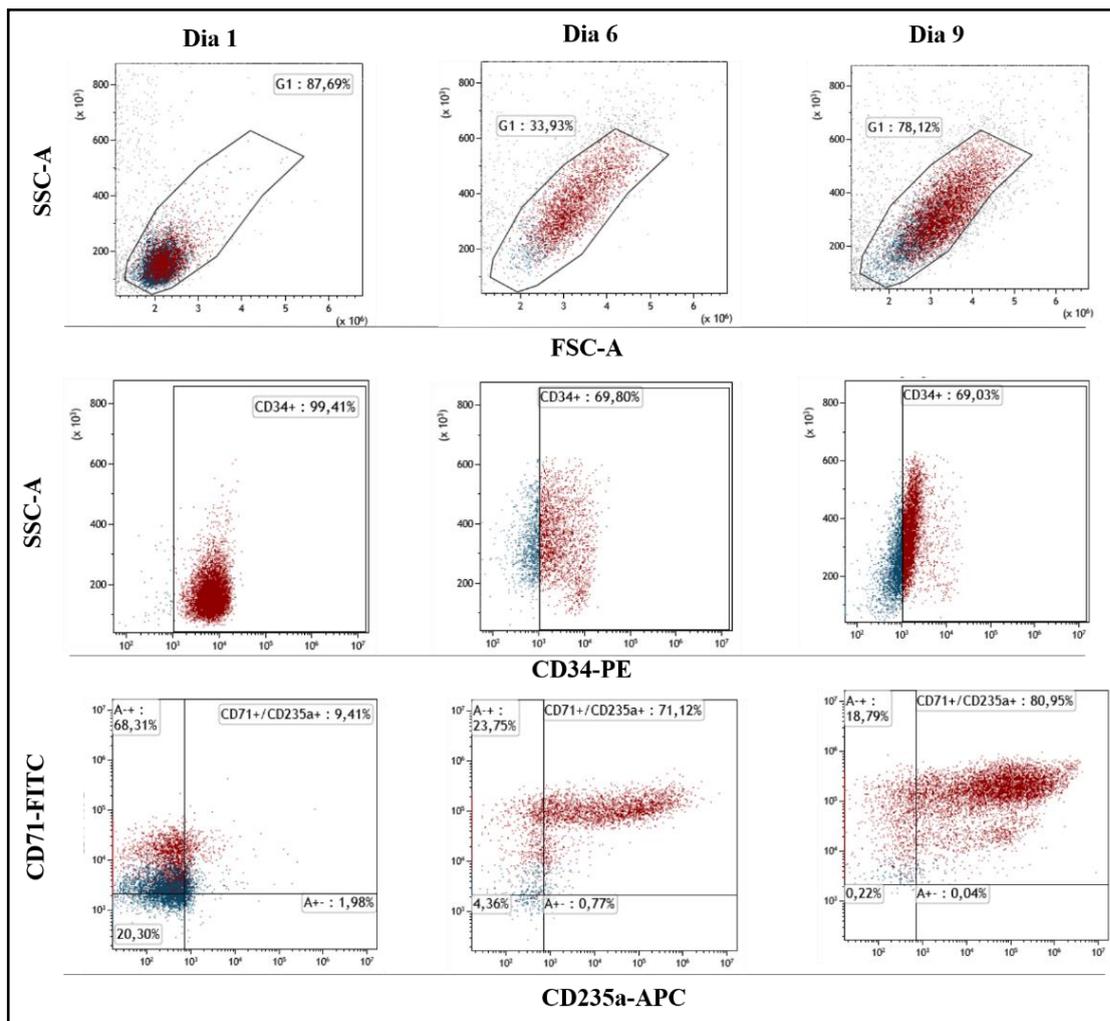
#### 4.2.2. Monitoramento por citometria de fluxo da diferenciação celular

Para avaliação da expansão e diferenciação de eritroblastos *in vitro*, o processo foi monitorado por imunofenotipagem com anticorpos específicos para os marcadores de superfície CD34 (células tronco/progenitoras hematopoiéticas), CD71 e CD235a (eritroblastos) e analisado por citometria de fluxo para todos os pacientes, assim como os controles C1 e C2, nos dias 0, 6 e 9. A figura 4.10 representa os resultados do controle 2 e a figura 4.11 corresponde ao paciente P1, cujo resultado é representativo da expansão e diferenciação dos outros pacientes (P2-P5).

A tabela 4.3. contém as informações das análises por citometria de todos os pacientes nos diferentes dias da diferenciação. A reprogramação foi iniciada entre os dias 9 e 11 da diferenciação dos eritroblastos, quando as células apresentaram ao menos 50% da expressão dos marcadores CD71 e CD235a. A única exceção foi o paciente P3, em que os valores correspondentes à citometria do dia 9 não foram obtidos, porém observamos por microscopia por contagem celular que as células CD34<sup>+</sup> diferenciaram efetivamente para eritroblastos.

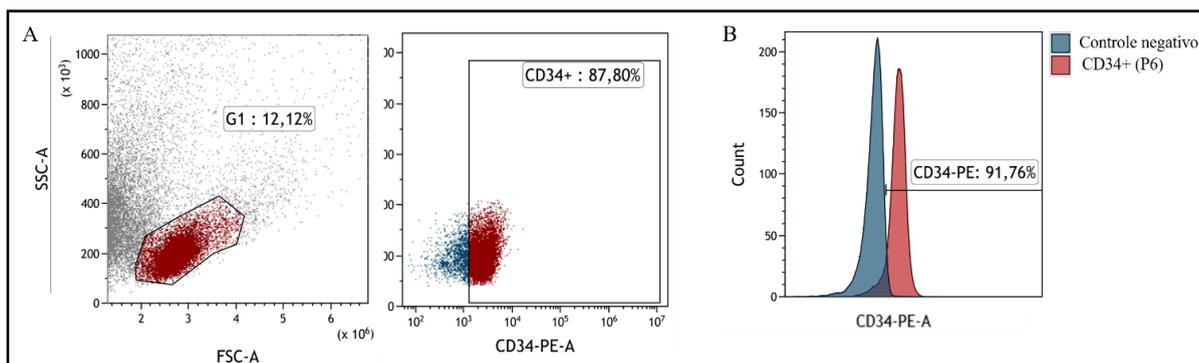


**Figura 4.10. Imunofenotipagem da diferenciação e expansão dos eritroblastos a partir de células CD34+ obtidas do controle 2.** As análises das amostras de um doador saudável (controle) foi realizada nos dias 1, 6 e 8 por citometria. Os progenitores hematopoiéticos purificados foram marcados no dia +1 com marcação single CD34, (células tronco/progenitores hematopoiéticos), seguido da análise da dupla marcação CD71a/CD235a (eritroblasto). As análises por citometria foram realizadas no citômetro de fluxo Accuri BD Bioscience e os dados analisados com o software Kaluza v 5.1.



**Figura 4.11. Imunofenotipagem da diferenciação e expansão dos eritroblastos a partir de células CD34<sup>+</sup> obtidas do paciente P1.** As análises das amostras de um paciente (P1) foi realizadas nos dias 1, 6 e 8 por citometria. Os progenitores hematopoiéticos purificados foram marcados no dia +1 com marcação single CD34, (células tronco/progenitores hematopoiéticos), seguido da análise da dupla marcação CD71a/CD235a (eritroblasto). As análises por citometria foram realizadas no citômetro de fluxo Accuri BD Bioscience e os dados analisados com o software Kaluza v 5.1.

No caso das células CD34<sup>+</sup> do paciente P6, foi realizada a citometria de fluxo tanto no dia 0 (dia do descongelamento), quanto no dia 1. A partir do resultado obtido no dia 1, a reprogramação foi iniciada junto com os pacientes P4, P5 e o controle 2. (Figura 4.12).



**Figura 4.12. Imunofenotipagem relativa às células CD34+ purificadas do paciente P6.** Análise de imunofenotipagem realizada por FACS no dias 1 pós-descongelamento.

**Tabela 4.3. Lista dos valores da citometria de fluxo correspondentes aos pacientes com MF**

Paciente (P)	Células CD34+	Dados da citometria								
		SSC/FSC (%)			CD34+ (%)			CD71+/CD235a+ (%)		
	Nº inicial	D1	D6	D10	D1	D6	D10	D1	D6	D10
P1	1,2 x 10 <sup>6</sup>	87,69	38,18	73,09	99,41	69,80	71,12	9,41	69,03	80,95
P2	15000	-	-	8,9	-	-	8,1	-	-	57,5
Controle 1	150000	40,2	-	73,41	71,2	-	22,15	7,9	-	63,8
		D1	D6	D9	D1	D6	D9	D1	D6	D9
P3	700000	4,9	-	21,2	62,4	-	26,9	2,5	-	-
P4	90000	8,8	0,3	4,59	70,7	92,7	25,3	0,1	1,2	56,5
P5	150000	15,1	0,9	15,1	34,3	22,4	1,7	0,1	41,1	61,4
Controle 2	520000	24,44	2,73	15,45	17,82	53,40	5,47	0	35,36	46,85

### **4.2.3. Geração e caracterização das células tronco de pluripotência induzida (iPSCs) a partir de pacientes com MF e doadores saudáveis**

A geração de colônias iPSCs e a caracterização molecular a partir de um *pool* de células primárias do paciente permite inferir os diferentes genótipos dos subclones que formam parte da arquitetura e evolução clonal do paciente, uma vez que uma única célula é capaz de se desdiferenciar em uma colônia iPSC. Portanto, tornou-se um dos nossos objetivos identificar a diversidade clonal dos pacientes selecionados para reprogramação.

Os reguladores epigenéticos têm um papel importante na reprogramação celular visto que as células somáticas, quando reprogramadas, sofrem hipometilação global no perfil epigenético, adquirindo marcas epigenéticas associadas à autorrenovação e pluripotência. Considerando que os pacientes P2-P6 são portadores de mutações com perda da função em genes reguladores epigenéticos ou associados à transformação leucêmica, temos como um dos objetivos no presente projeto, avaliar a influência dessas mutações na reprogramação celular e indução/manutenção de pluripotência.

#### **4.2.3.1. Condições da reprogramação celular e colônias obtidas**

As iPSCs vêm sendo amplamente utilizadas para modelagem *in vitro* de diversas patologias, incluindo as doenças hematológicas. Diversos protocolos de reprogramação a partir de células hematopoiéticas foram estabelecidos, utilizando diferentes metodologias para expressão dos quatro fatores de Yamanaka (OSKM). Tanto os métodos com integração no genoma, como retrovírus, lentivírus e vetores transposon, quanto métodos livres de integração no genoma, como vetores episomais, microRNAs (miRNA), e vírus Sendai (VS) são utilizados para geração das iPSCs. Cada ferramenta apresenta uma eficiência de reprogramação que varia desde >0,001% até 2%, sendo o VS atualmente uma das ferramentas tecnológicas mais eficientes (CHOU *et al.*, 2011, SCHLAEGER *et al.*, 2014).

A eficiência de reprogramação é calculada como o número de colônias iPSCs emergentes da placa de reprogramação pelo número inicial de células plaqueadas. Alguns fatores podem influenciar na precisão desse parâmetro como a taxa de proliferação e transfecção/transdução das células somáticas, por outro lado, fatores como os protocolos utilizados para repique e eficiência de plaqueamento das células somáticas também podem influenciar as condições iniciais da reprogramação (SCHLAEGER *et al.*, 2014).

No presente projeto, as reprogramações do primeiro e segundo grupo foram efetuadas utilizando o VS em “condições mínimas”, iniciando as reprogramações em ambos

os casos com o número mínimo de células e MOI. Posteriormente, no terceiro grupo de reprogramações, aumentamos o número das condições mínimas por dois principais motivos: primeiro, visando capturar a heterogeneidade clonal eventualmente existente nos pacientes através da obtenção de um maior número de colônias iPSCs e segundo, visando inferir se as mutações nos reguladores epigenéticos poderiam diminuir a eficiência de reprogramação. Na tabela 4.4 encontram-se descritas as condições utilizadas nas diferentes reprogramações.

No primeiro grupo, as reprogramações foram realizadas para os pacientes que apresentaram a mutação *driver* em  $JAK2^{V617F}$ , ambos os pacientes com diferentes cargas alélicas mutacionais (P1 (98%) e P2 (42%), respectivamente), além dessa mutação, no P2 foram identificadas duas mutações adicionais nos genes *TET2* e *IDH1*. No segundo grupo, a reprogramação foi efetuada com o paciente P3 portador da mutação *driver* no gene  $CALR^{ins5}$  e uma mutação adicional no gene *TP53*. Por fim, o terceiro grupo foi constituído pelos pacientes P4 ( $CALR^{ins5}$ ), P5 ( $JAK2^{V617F}$ ) e P6 ( $CALR^{del52}$ ), portadores das mutações adicionais nos reguladores epigenéticos *TET2* e/ou *ASXL1*.

Para o primeiro e segundo grupo de reprogramações foi utilizado o CytoTune®-iPS 1.0 *Sendai Reprogramming Kit*, enquanto para o terceiro grupo foi utilizado o *Sendai Reprogramming Kit* 2.0. Cada reprogramação foi efetuada junto com um controle (doador saudável). A tabela 4.4 resume os genótipos de cada paciente, as condições da reprogramação celular e o número de células iPSCs que surgiram a partir do dia 21 nas diferentes reprogramações. Para todas as reprogramações dos pacientes e controles mostrados na tabela 4.18 foi observado o surgimento de iPSCs.

Nas condições descritas observamos uma diferença no número total de iPSCs que surgiram entre os dias 21 e 25 da reprogramação para cada paciente e os respectivos controles. No caso dos pacientes do terceiro grupo de reprogramação, em comparação ao primeiro e segundo grupo, foi observada uma diferença em relação ao número de colônias obtidas. Após a quantificação das colônias iPSC, observamos uma diferença entre o número total de iPSC derivadas do paciente P4 e P5, 32 e 17 iPSCs, respectivamente, comparadas com o controle C2, cujo número total foi de 148 iPSCs.

**Tabela 4.4. Condições da reprogramação das células dos pacientes com MF.** Para cada paciente (P1-P6) está indicado o genótipo, o sistema VS utilizado na reprogramação, assim como o MOI e número de células iniciais utilizados. Na última coluna encontra-se o número total de iPSCs que surgiram na placa de reprogramação.

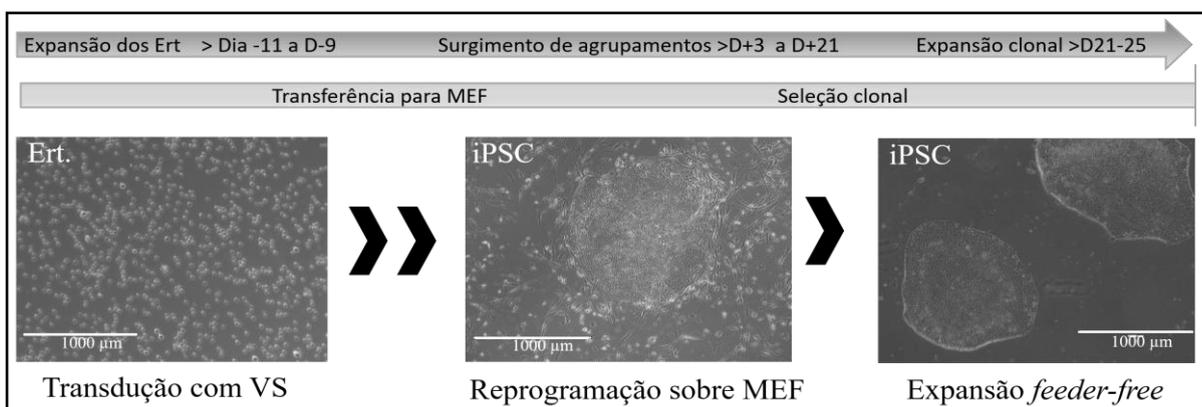
Paciente (P)	Fenótipo	Genótipo (paciente)		Condições da reprogramação				Eficiência de reprogramação (%)
		Mutação <i>driver</i>	Mutação adicional	VS (geração)	MOI	Nº inicial de células	Nº de iPSC	
C1	Doador saudável	WT	WT	1.0	6	75000	25	0,034
P1	MF	<i>JAK2</i> <sup>V617F</sup>	-	1.0	6	75000	33	0,045
P2	MF	<i>JAK2</i> <sup>V617F</sup>	<i>TET2</i> <sup>S1586X</sup> <i>IDH1</i> <sup>R132H</sup>	1.0	8	50000	10	0,013
P3	MF	<i>CALR</i> <sup>ins5</sup>	<i>TP53</i> <sup>W146X</sup>	1.0	6	75000	20	0,026
C2	Doador saudável	WT	WT	2.0	10	100000	148	0,148
P4	MF	<i>CALR</i> <sup>ins5</sup>	<i>TET2</i> <sup>G898X</sup> <i>ASXL1</i> <sup>G646fs*12</sup>	2.0	10	100000	32	0,032
P5	MF	<i>JAK2</i> <sup>V617F</sup>	<i>ASXL1</i> <sup>Y591fs*1</sup>	2.0	10	100000	18	0,018
P6	s-LMA	<i>CALR</i> <sup>del52</sup>	<i>ASXL1</i> <sup>R693X</sup>	2.0	10	100000	140	0,14

Para cada reprogramação foi calculada a eficiência de reprogramação. Desse modo, na primeira e segunda reprogramação, observamos que a eficiência do controle C1 resultou em 0,034%, para P1 de 0,045%, no caso de P2 e P3 em torno de 0,02%. Já no terceiro grupo de reprogramações observamos que o controle C2 e P6 apresentaram uma eficiência cerca de 0,15%, e no caso de P4 e P5 resultou em 0,032 e 0,018%, respectivamente. Apesar dessa variação, não podemos atribuir a diminuição da eficiência à mutação que a amostra de cada paciente possui.

Durante o processo de reprogramação as células em suspensão sofrem uma modificação do fenótipo modulada pela transição mesenquimal-epitelial. As células adquirem características morfológicas de células aderentes, cada célula individualmente prolifera até formar um agrupamento cuja morfologia é observada como colônias homogêneas, compactadas e com bordas definidas. Essas características foram apontadas em outros trabalhos para identificação de iPSCs no processo de reprogramação (AMIT, ITKOVITZ-ELDOR *et al.*, 2012). Por esse motivo, foram monitoradas as seguintes características das colônias: crescimento a partir de colônias individuais, formação de bordas definidas, autorrenovação e aquisição da morfologia similar às observadas em ESC.

Após surgimento de pequenos agrupamentos, entre os dias 21 e 25, as colônias iPSCs foram repicadas e expandidas individualmente (Figura 4.13). Para os pacientes P1, P2, P3, P6 e controles C1 e C2, 10 iPSCs foram selecionadas, enquanto para P4 e P5 o total

de iPSCs observadas foram repicadas. Todos os clones iPSCs selecionados foram expandidos ao menos até a passagem 6 para monitorar se as colônias mantinham as características de iPSC e efetuar a caracterização molecular.

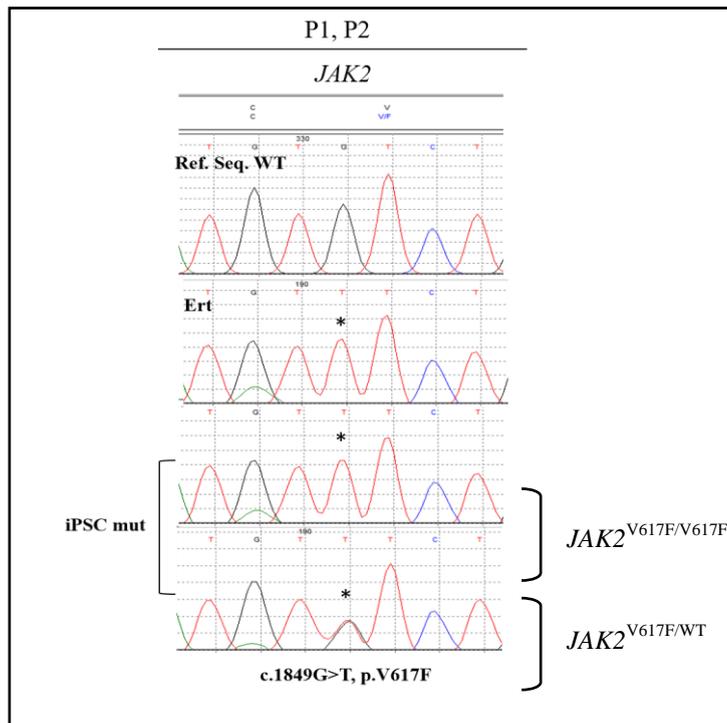


**Figura 4.13. Morfologia das iPSCs.** Na primeira imagem observamos a morfologia dos eritroblastos (Ert) que foram previamente expandidos e transduzidos com o vírus Sendai (VS). Após serem transferidas para MEF no dia D+3, a segunda imagem é representativa dos agrupamentos que surgiram da placa de reprogramação (entre o D+7 e D+21) (passagem 0). A terceira imagem é representativa dos clones iPSCs selecionados e expandidos individualmente (iPSC derivada de P2, Passagem P8) que foram repicados sobre Geltrex®. Todas as imagens foram adquiridas usando o microscópio invertido Evos XL Cell Imaging System. Barra: 1.000 µm.

#### 4.2.3.2. Caracterização molecular das colônias iPSCs

Após expansão, realizamos a caracterização molecular dos clones, o qual consistiu em rastreamento de mutações originalmente observadas nas células primárias e análise de ploidia. Para tanto, as diferentes regiões de interesse foram avaliadas por sequenciamento do método de Sanger tanto nas células transduzidas com VS (eritroblastos, para P1-P5 e C1-2, e progenitores CD34<sup>+</sup> para P6), quanto nas iPSC derivadas dos respectivos pacientes e controles. A presença ou ausência de deleções ou ampliações cromossômicas foram avaliadas pela técnica de low-pass whole genome sequencing para uma iPSC de cada genótipo.

A figura 4.14 apresenta os resultados obtidos para o sequenciamento do gene *JAK2* nas iPSCs derivadas dos pacientes P1 e P2. Para o paciente P1, que apresentava carga alélica de *JAK2*<sup>V617F</sup> de 92% nos granulócitos, os três clones iPSCs caracterizados eram portadores da mutação em homozigose.

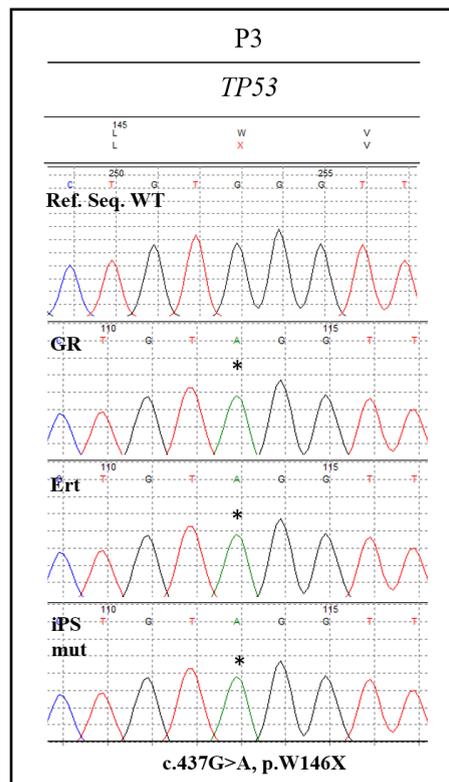


**Figura 4.14. Sequenciamento de *JAK2*.** A região de interesse em *JAK2* foi sequenciada nos eritroblastos e clones iPSCs derivados dos pacientes P1 e P2. O sequenciamento foi realizado a partir do produto correspondente a banda do controle interno (CI) amplificado de PCR alelo específico para identificação do alelo mutado *JAK2*<sup>V617F</sup> dos clones iPSC-P1 e P2. Acima sequência de referência obtida do *NCBI Data Base* (WT: *wild type*), seguido do sequenciamento dos eritroblastos diferenciados *in vitro* do paciente P1, sequenciamento dos clones iPS.MFP1.1 e iPS.MF.P2.18 ilustrando a presença da mutação *JAK2*<sup>V617F</sup> em homozigose e em heterozigose *JAK2*<sup>V617F/V617F</sup> e *JAK2*<sup>V617F/WT</sup>, respectivamente.

Com relação a P2, cuja carga alélica nos granulócitos era de 42%, observamos três clones iPSCs com *JAK2*<sup>V617F</sup> em heterozigose e um clone, em homozigose (Figura 4.14). Ainda com relação a P2, nenhum dos quatro clones apresentou as mutações adicionais em *IDH1*, *TET2* e *ASXL1*, detectadas em baixa frequência nos granulócitos primários por NGS.

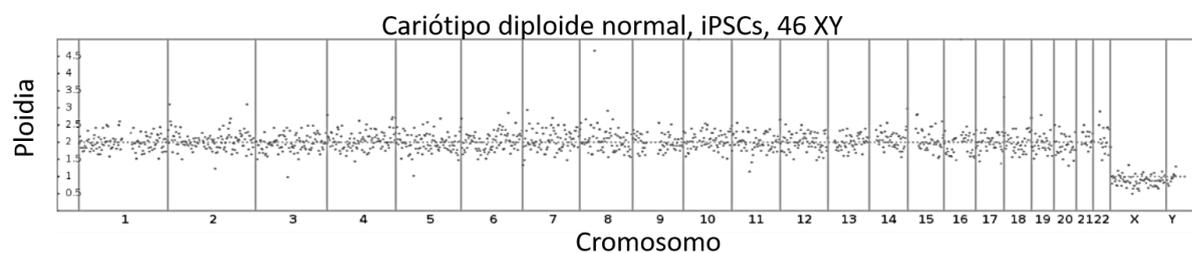
No caso das iPSCs derivadas do paciente P3 (iPS.MP3.13, iPS.MP3.13, iPS.MP3.14, iPS.MP3.17, iPS.MP3.30) confirmamos a presença da mutação *CALR*<sup>ins5</sup> nos cinco clones iPSCs. Além dessa mutação *driver*, também foi confirmada a mutação no gene *TP53*<sup>W146X</sup>, presente em homozigose em todos os clones (Figura 4.15).

Para os pacientes P1 e P3, em todas as iPSC observamos o mesmo genótipo identificado nas células originais, o que poderia sugerir que as mutações identificadas poderiam ser parte do clone majoritário e responsáveis pela expansão clonal dos mesmos nesses pacientes.



**Figura 4.15. Sequenciamento de éxon 4-5 no gene *TP53*.** Acima sequência de referência obtida do *NCBI Data Base* (WT), seguida do sequenciamento dos granulócitos primários do paciente, eritroblastos diferenciados *in vitro* do paciente P3 e clone iPS.MFP3.13, apresentando a mutação *TP53*<sup>W146X</sup> em homozigose.

A análise de ploidia foi realizada para as iPSCs derivadas dos pacientes iPS.MFP1.1, iPS.MFP2.10 (*JAK2*<sup>V617F/V617F</sup>), iPS.MFP2.18 (*JAK2*<sup>V617F/WT</sup>) e iPS.MFP3.17(*CALR*<sup>ins5</sup>), para todos eles confirmamos o cariótipo normal (anexo 6). O resultado representativo encontra-se na figura 4.16.



**Figura 4.16. Análise de ploidia da iPS.MFP3.17 derivada do paciente P3.** A análise corresponde à iPS.MFP3.17, porém nas iPS.MFP1e iPS.MFP2.10/18 observou-se um resultado similar. A imagem mostra o resultado obtido da análise do número de cópias (CNV) de cada cromossomo avaliado usando o low-pass whole genome sequencing Snapshot of IGV Light Whole Genome. As informações da leitura foram: **iPS.MFP1:** MAPD: 0,179, Read count: 329712, Total de número de bases: 340 Mb, Número de bases totais (AQ20): 320Mb, Mean coverage depth (fold): 0,1. **iPS.MFP2.10/18** MAPD: 0,161, Read count: 198145/177955 , Total de número de bases: 392 Mb, Número de bases totais (AQ20): 364 Mb, Mean coverage depth (fold): 0,1. MAPD: median absolute pairwise difference. **iPS.MFP3.17:** MAPD: 0,161, Read count: 212821, Total de número de bases: 392 Mb, Número de bases totais (AQ20): 364 Mb, Mean coverage depth (fold): 0,1. MAPD: median absolute pairwise difference. B. Imagem do fragmento deletado do cromossomo 20.

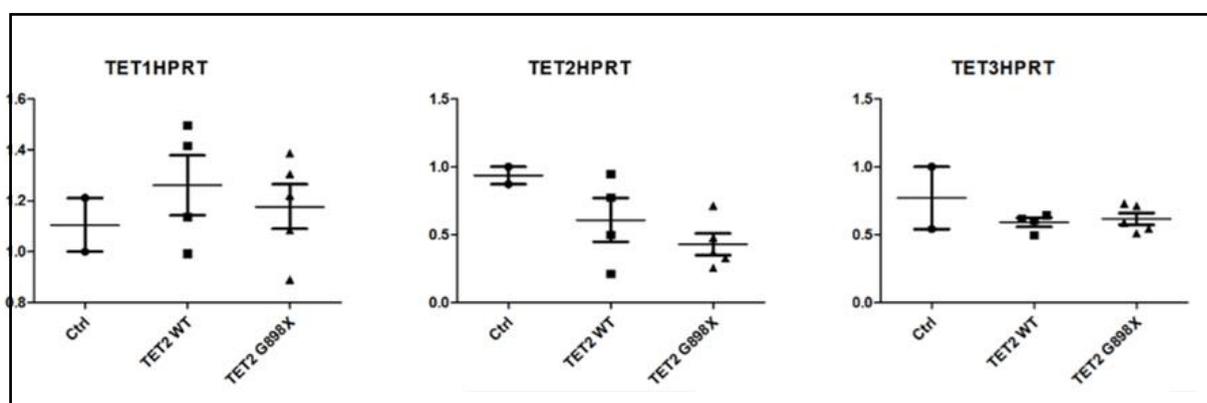


**Tabela 4.5. Resultados da frequência alélica das células de P4.** Frequência alélica obtida pelo NGS quando sequenciados os GRs primários do paciente P4, os eritroblastos (Ert.), e na última linha estão descritos os números de iPSCs com o genótipo  $TET2^{G898X}$  em relação ao total de 32 iPSCs geradas na reprogramação.

Tipo de células	Dados do NGS (mutação $TET2^{G898X}$ )	
	Reads	Frequência (%)
Granulócitos primários	722/892	81
Eritroblastos diferenciados <i>in vitro</i>	74/254	29
Dados do método de Sanger ( mutação $TET2^{G898X}$ )		
	Nº de clones	Frequência (%)
iPSCs	12/32	37,5

Como a mutação G898X introduz um códon prematuro de parada, avaliamos também a expressão gênica de  $TET2$  por PCR em tempo real, comparando as iPSCs derivadas do paciente P4: cujo genótipo é  $CALR^{ins5}/TET2^{G898X}$ ,  $CALR^{ins5}/TET2^{WT}$  e as iPSCs derivadas do controle  $CALR^{WT}/TET2^{WT}$  (Figura 18). Observamos a diminuição da expressão em  $TET2$  na iPSC( $CALR^{ins5}/TET2^{G898X}$ ) quando comparada com a iPSCs  $CALR^{ins5}/TET2^{WT}$  e a  $CALR^{WT}/TET2^{WT}$ .

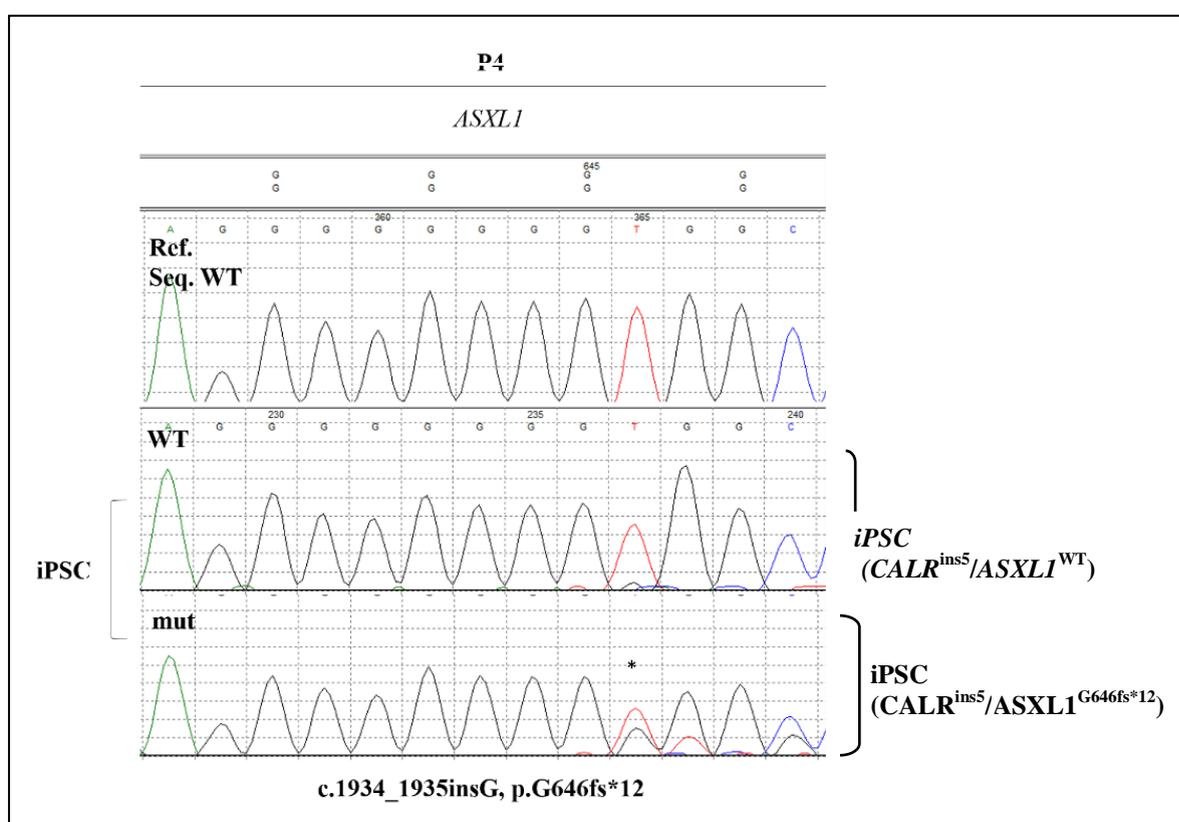
Com o objetivo de compreender se as enzimas  $TET1$  e  $3$  poderiam estar envolvidas na compensação da deficiência de  $TET2$ , avaliamos a expressão de  $TET1$ , e  $TET3$  nas iPSCs para compreender se eventualmente um aumento em sua expressão poderiam estar influenciando a reprogramação das células do paciente P4. Observamos que não houve diferença entre as iPSCs derivadas do paciente P4 e do controle. Em conjunto, esses resultados sugerem que a mutação G898X em  $TET2$ , mesmo presente em homozigose, não inviabiliza a reprogramação celular.



**Figura 4.18. Análise da expressão dos genes  $TETs$ .** Análise da expressão do gene  $TET1, 2$  e  $3$  das iPSC portadoras da mutação no gene  $TET2^{G898X}$  e  $TET2^{WT}$  comparadas com as iPSC derivadas do controle.

Nas iPSCs derivadas do paciente P4, além das mutações acima descritas, também foi identificada uma mutação em outro gene regulador epigenético,  $ASXL1^{p.G646fs*12}$ , detectada primeiramente nos GR primários (Figura 4.19). A partir desses resultados observamos 15 iPSCs com genótipo  $TET2^{WT}/ASXL1^{WT}$ , 7 iPSCs com genótipo  $TET2^{G898X}/ASXL1^{p.G646fs*12}$ , 5 iPSCs com genótipo  $TET2^{G898X}/ASXL1^{WT}$  e 5 iPSCs com genótipo  $TET2^{WT}/ASXL1^{p.G646fs*12}$ . Uma maior diversidade clonal foi observada, sendo quatro genótipos diferentes identificados no total de 32 iPSCs, conforme descrito na tabela 4.18.

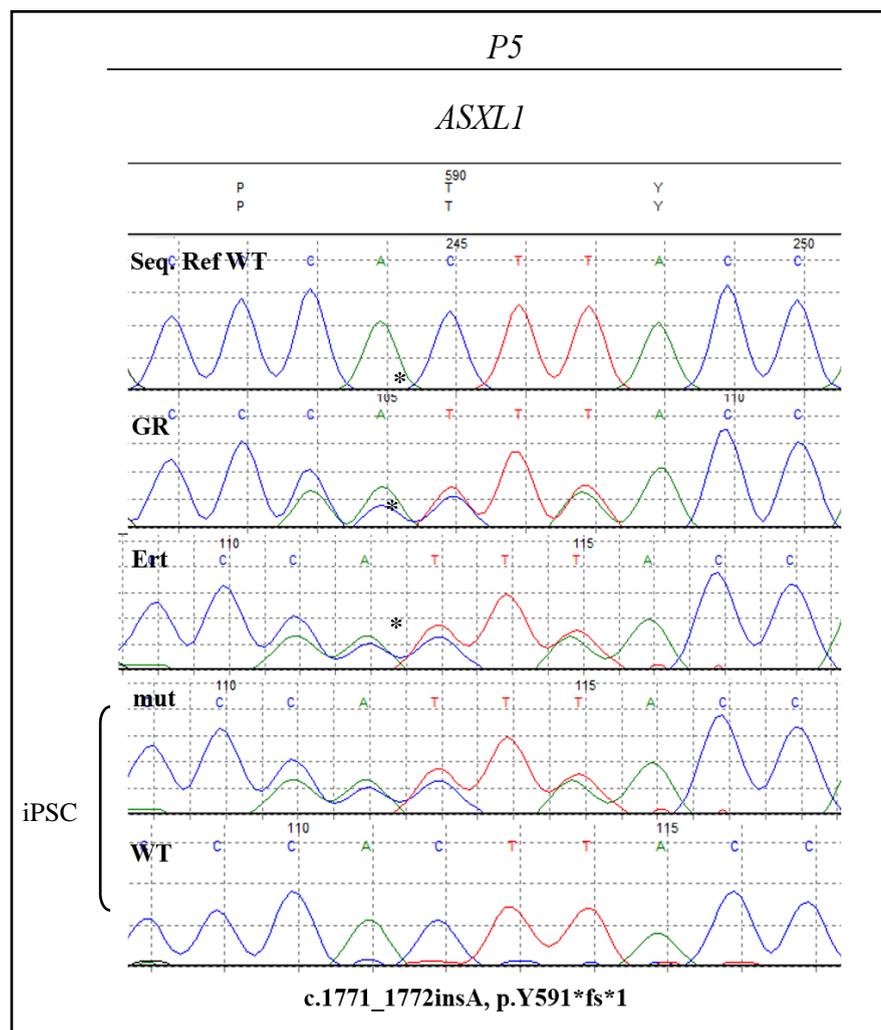
A análise de ploidia foi efetuada para cinco iPSCs derivadas do paciente P4 (iPSMFP4.7, iPSMFP4.5, iPSMFP4.34, iPSMFP4.24, iPSMFP4.32), confirmando o cariótipo normal em todas as amostras (Anexo 4).



**Figura 4.19. Caracterização molecular correspondente ao gene  $ASXL1$  dos clones iPSCs derivados do paciente P4.** Sequenciamento para identificação do gene  $ASXL1$  wt e/ou mut dos clones iPSC derivados do paciente P4. Em ordem: Acima sequência de referência obtida do *NCBI Data Base* (WT), seguido sequenciamento dos clones iPSCs derivados do paciente P4, mutado ( $ASXL1^{p.G646fs*12}$ ) e  $ASXL1^{WT}$ .

A análise das iPSCs do P5 evidenciou dois genótipos diferentes: 16 iPSCs foram WT para os genes  $JAK2$  e  $ASXL1$  enquanto duas iPSCs foram portadoras da mutação *driver* no gene  $JAK2^{V617F}$  e de mutação no gene regulador epigenético  $ASXL1^{Y591fs*1}$ . A figura 4.20 compara os resultados obtidos do sequenciamento dos GRs primários, os eritroblastos (Ert)

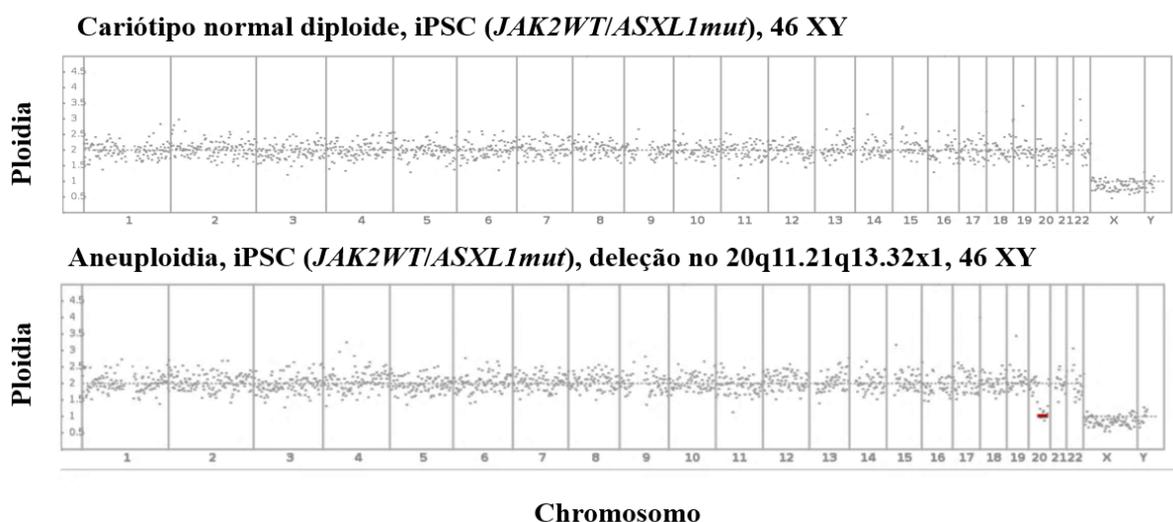
(utilizados para a reprogramação celular) diferenciados *in vitro* e as iPSCs, tanto mutadas, quanto WT para o gene *ASXL1*.



**Figura 4.20.** Sequenciamento para identificação do *status* mutacional do gene *ASXL1* nas células do P5. Em ordem: Acima, seqüência de referência obtida do *NCBI Data Base* (WT), seguido de sequenciamento dos GR primários do paciente, eritroblastos diferenciados *in vitro* do paciente P5, sequenciamento dos clones iPSCs (*ASXL1*<sup>Y951fs\*1</sup>) mutado e WT.

Para complementar a caracterização das iPSCs derivadas do P5 foi realizada a análise de ploidia por low-pass whole-genome sequencing tanto dos GRs primário isolados de P5, quanto do clone iPSC.MFP5.2 (*JAK2*<sup>WT</sup>/*ASXL1*<sup>WT</sup>) e do clone iPSC.MFP5.5 (*JAK2*<sup>V617F</sup>/*ASXL1*<sup>Y951fs\*1</sup>). A figura 4.21 confirma a ploidia normal para a iPSC WT (iPSMFP5.2) e mostra a deleção no cromossomo 20 na iPSC mutada (iPSMFP5.5). Esta deleção foi a mesma identificada no GR primário do paciente reprogramado. A deleção foi identificada na iPSMFP5.5 em passagem P15 e em passagem P17, observando o mesmo resultado.

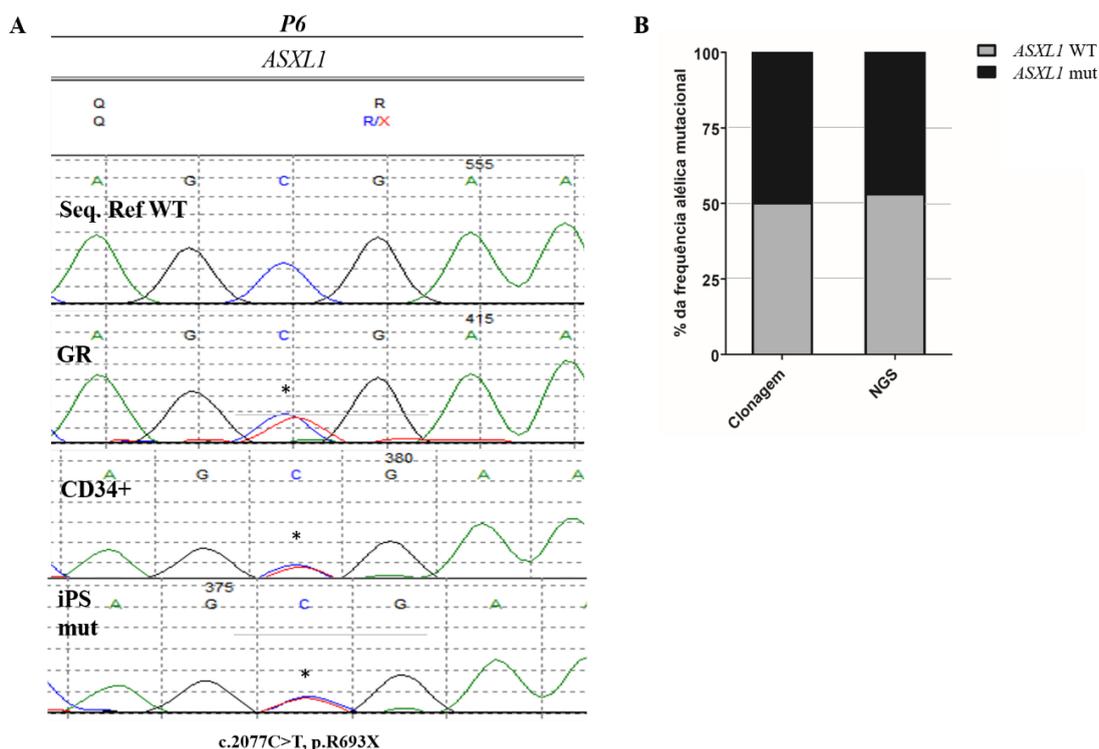
Considerando a frequência alélica mutacional do gene *ASXL1*<sup>Y951fs\*1</sup> dos eritroblastos derivados do paciente P5 foi de 47% e o número reduzido de iPSCs mutadas na reprogramação (2/18), sugere-se que: a mutação no gene *ASXL1*<sup>Y951fs\*1</sup> e/ou a deleção no cromossomo 20q poderiam ter um impacto negativo na reprogramação celular, bem como no estado de pluripotência alcançado pela linhagem. Para esse último caso, se faz necessária a avaliação dos marcadores de pluripotência dessas iPSCs.



**Figura 4.21. Análise de ploidia das iPSCs derivadas do P5.** Imagem da análise do número de cópias (CNV) de cada cromossomo avaliado usando o low-pass whole genome sequencing Snapshot of IGV Ligh Whole Genome. As informações da leitura foram: **iPSMFP5.2/5** MAPD: 0,161, *Read count*: 164713/181133. Total de número de bases: 392 Mb, Número de bases totais (AQ20): 364 Mb, *Mean coverage depth (fold)*: 0,1. MAPD: *median absolute pairwise difference*.

Do mesmo modo que os pacientes anteriores, para o paciente P6 foi confirmada a deleção de 52pb no gene *CALR* nas células tronco/progenitores hematopoiéticos CD34<sup>+</sup> assim como nas iPSCs. A mutação adicional no gene *ASXL1*<sup>R693X</sup> em heterozigose, foi detectada nas células CD34<sup>+</sup> e em 10 clones iPSCs selecionados da placa de reprogramação (Passagem 0) (Figura 4.22A).

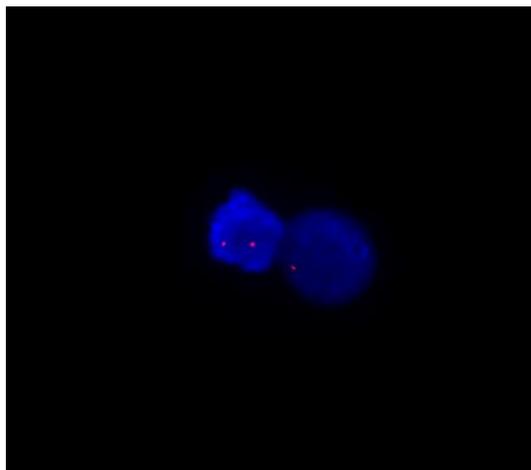
A frequência alélica mutacional do gene *ASXL1*<sup>R693X</sup> das células CD34<sup>+</sup> foi avaliada por NGS e o resultado foi confirmado pela técnica de clonagem e sequenciamento individual de amplicons. Ambos os resultados estão representados na figura 4.22 B. Como observado no gráfico, em ambas as técnicas o valor da frequência alélica resultou em cerca de 50%. Quando realizada a análise de ploidia do clone iPSMFP6.1 não foi identificada nenhuma alteração de número de cópias nos cromossomos (anexo 4). Em todas as iPSCs observamos o genótipo original identificado nas células primárias do paciente, sugerindo que este seja o clone majoritário na LMA pós-MF observada no paciente P6.



**Figura 4.22. Sequenciamento para identificação da mutação no gene *ASXL1* e determinação da frequência alélica da mutação no gene *ASXL1*<sup>R693X</sup> no paciente P6.** A. Em ordem: Acima sequência de referência obtida do *NCBI Data Base* (WT), seguida do sequenciamento dos granulócitos primários do paciente, células tronco/progenitores hematopoiéticos purificados a partir das células mononucleares de sangue periférico do P6, sequenciamento dos clones iPSCs mutados. B. Frequência alélica mutacional no gene *ASXL1*<sup>R693X</sup> por dois métodos diferentes. O primeiro método foi por clonagem do amplicon em plasmídeos e sequenciamento de clones plasmidiais carregando fitas únicas do amplicon para determinação da frequência alélica nas células tronco/progenitores hematopoiéticos CD34<sup>+</sup> purificadas do P6, resultando em 50% dos amplicons foram positivos para a mutação de interesse. A segunda avaliação foi realizada por NGS, que evidenciou 47% de frequência alélica (179 de 384 leituras positivas para a mutação).

#### 4.2.4. Identificação da deleção no cromossomo 20 da iPSMFP5.5.

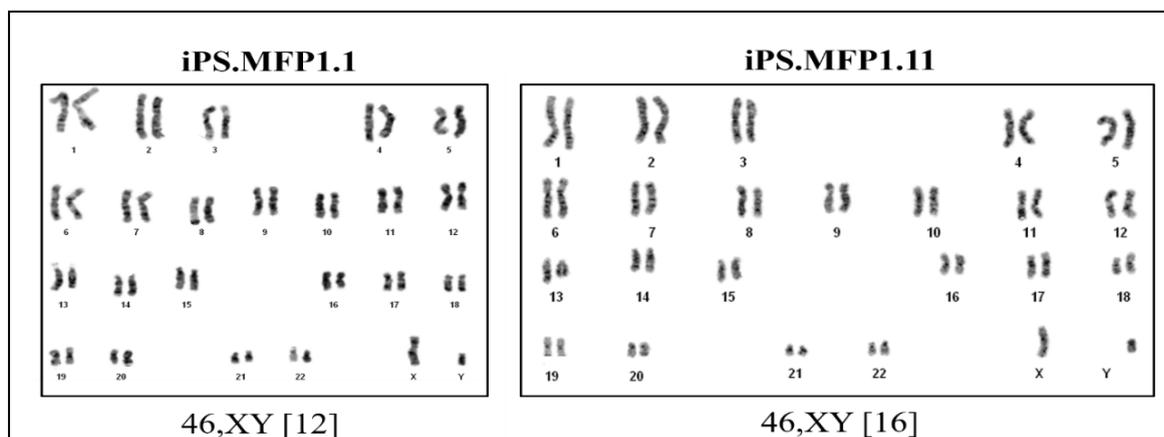
A iPSC derivada do P5 (iPSMFP5.5), cujo genótipo apresenta uma mutação em heterozigose no gene *ASXL1* mutada também foi identificada a deleção no cromossomo 20 utilizando a técnica FISH (Figura 4.23). Os resultado da análise do resultado da iPSMFP5.5 mostrou que a deleção está presente em um 66% das células totais. A sonda utilizada hibridiza na região do gene *ASXL1*.



**Figura 4.23. Análise da deleção do cromossomo 20q identificada no clone 5 iPSC derivado de P5 .** A análise do clone iPS.MF.5.5 foi realizado por FISH. Imagem ilustrativa da identificação da deleção nas células iPSCs clone 5. Na célula da esquerda observamos um genótipo WT para a deleção e na célula da direita observamos uma deleção no cromossomo 20.

#### 4.2.5. Análise do cariótipo dos clones iPSC

O cariótipo dos clones iPSC derivados do P1 (iPSMFP1.1 e iPSMFP1.11) além de ser avaliado por low-pass whole-genome sequencing, também foi confirmado pelo bandejamento G dos cromossomo. Para os clones derivados do P1 foi observado o cariótipo normal (Figura 4.24).



**Figura 4.24. Cariótipo dos clones iPSCs derivados do paciente P1.** O bandejamento G foi utilizado para análise dos Clone iPS.MF.P1.clone1 e clone 11.

Na tabela 4.6 encontra-se o resumo das informações dos genótipos de cada paciente, o número de clones iPSCs caracterizados e seus genótipos.

Em conjunto, em nossos modelos pudemos identificar os diferentes subclones que formam parte da diversidade clonal dos respectivos pacientes. Observamos que, em

diferentes frequências, as iPSCs derivadas de cada paciente apresentavam as mutações originais identificadas nos granulócitos primários dos pacientes em estudo. Uma maior diversidade clonal foi identificada nos pacientes P2, P4 e P5 a partir das iPSCs que apresentaram diferentes genótipos.

Um segundo objetivo foi avaliar se as mutações nos reguladores epigenéticos *TET2* e *ASXL1* ou no gene *TP53* poderiam interferir no processo de reprogramação celular. Desse modo, em todas as reprogramações observamos o surgimento de colônias iPSCs capazes de manter as características morfológicas ao menos até passagem 6 (passagem na qual algumas iPSCs foram congeladas depois de terem sido caracterizadas do ponto de vista molecular). Deste modo, sugere-se que as mutações adicionais nos reguladores epigenéticos, assim como no gene supressor de tumor *TP53*, não impedem a reprogramação celular.

**Tabela 4.6. Caracterização molecular dos clones iPSC. Para cada paciente estão descritos o fenótipo, o genótipo das células primárias (granulócitos) e os diferentes genótipos das iPSC, o número de clones identificados de cada genótipo foi descrito na última coluna. P: Paciente, C: controle.**

Paciente (P)	Fenótipo	Genótipo (paciente)		Genótipo (iPSC)		N° de iPSCs
		Mutação <i>driver</i>	Mutação adicional	Mutação <i>driver</i>	Mutação adicional	
C1	Doador saudável	WT	WT	WT	WT	10
C2	Doador saudável	WT	WT	WT	WT	10
P1	MF	<i>JAK2</i> <sup>V617F/V617F</sup>	-	<i>JAK2</i> <sup>V617F/V617F</sup>	-	3
P2	MF	<i>JAK2</i> <sup>V617F/WT</sup>	<i>TET2</i> <sup>S1586X</sup> <i>IDH1</i> <sup>R132H</sup>	<i>JAK2</i> <sup>V617F/V617F</sup>	-	1
				<i>JAK2</i> <sup>V617F/V617F</sup>	-	3
P3	MF	<i>CALR</i> <sup>ins5</sup>	<i>TP53</i> <sup>W146X</sup>	<i>CALR</i> <sup>ins5</sup>	<i>TP53</i> <sup>W146X</sup>	5
P4	MF	<i>CALR</i> <sup>ins5</sup>	<i>TET2</i> <sup>G898X</sup> <i>ASXL1</i> <sup>G646fs*12</sup>	<i>CALR</i> <sup>ins5</sup>	<i>TET2</i> <sup>WT</sup> <i>ASXL1</i> <sup>WT</sup>	15
					<i>TET2</i> <sup>G898X</sup> <i>ASXL1</i> <sup>WT</sup>	5
					<i>TET2</i> <sup>WT</sup> <i>ASXL1</i> <sup>G646fs*12</sup>	5
					<i>TET2</i> <sup>G898X</sup> <i>ASXL1</i> <sup>G646fs*12</sup>	7
P5	MF	<i>JAK2</i> <sup>V617F/WT</sup>	<i>ASXL1</i> <sup>Y591fs*1</sup>	<i>JAK2</i> <sup>V617F/V617F</sup>	<i>ASXL1</i> <sup>Y591fs*1</sup>	2
				<i>JAK2</i> <sup>WT</sup>	<i>ASXL1</i> <sup>WT</sup>	16
P6	s-LMA	<i>CALR</i> <sup>del52</sup>	<i>ASXL1</i> <sup>R693X</sup>	<i>CALR</i> <sup>del52</sup>	<i>ASXL1</i> <sup>R693X</sup>	10

### 4.3. Caracterização de pluripotência

A caracterização de pluripotência foi dividida em quatro etapas principais, que consistem em: (1) avaliação da expressão do VS nas iPSCs, (2) análise dos marcadores associados à pluripotência, (3) avaliação da capacidade de diferenciação nas três camadas germinativas, e (4) análise dos marcadores correspondentes às células diferenciadas.

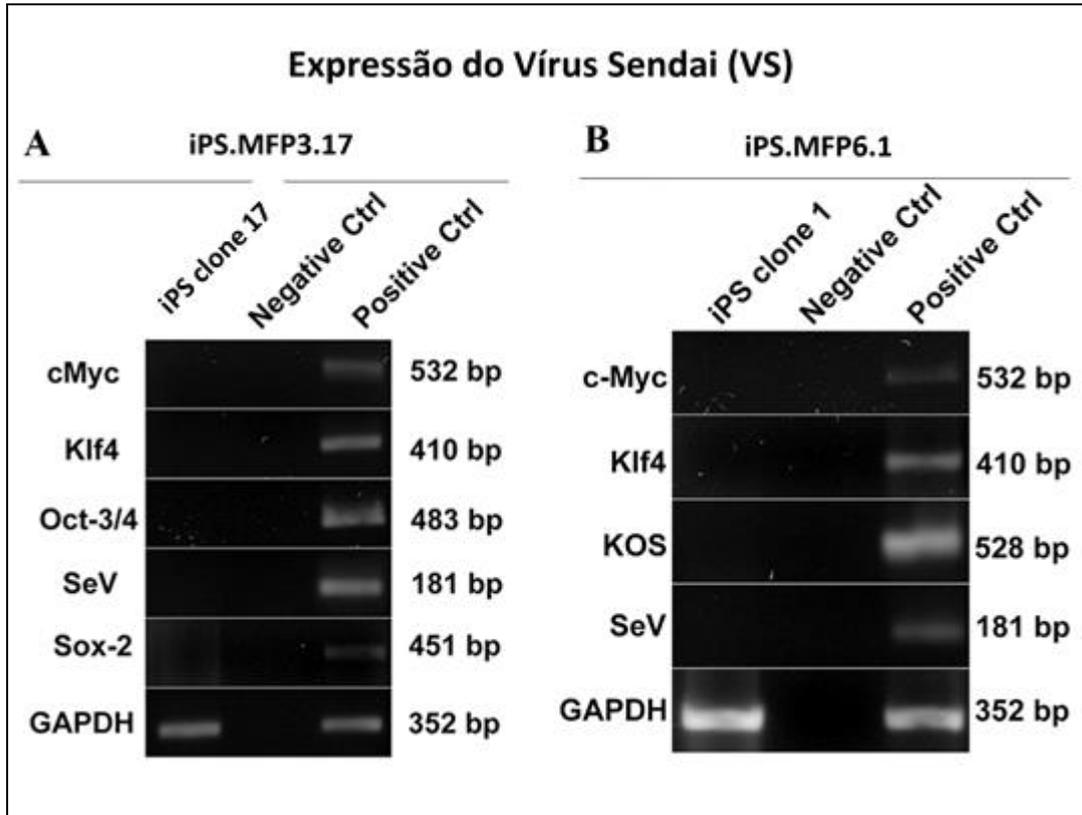
Para cada paciente e controle, ao menos dois clones iPSCs correspondente a cada genótipo, identificado na etapa de caracterização molecular, foram selecionados e expandidos, para avaliar a expressão do VS assim como os marcadores de pluripotência (etapa 1 e 2). Entretanto, a avaliação das restantes etapas (etapa 3 e 4) foi prosseguida unicamente para uma iPSC de cada genótipo, totalizando a caracterização completa de 12 iPSCs.

#### 4.3.1. Avaliação da expressão do Vírus Sendai (VS)

O Sistema Vírus Sendai (VS) utilizado na reprogramação celular é um sistema que não integra no genoma, e expressa de maneira transiente os genes OSKM (Oct-3/4, Sox-2, Klf4 e c-Myc) no citosol. Nessa etapa, o VS induz a expressão de genes de pluripotência exógenos das células após transdução. Consequentemente leva à ativação do estado de pluripotência e autorrenovação pela expressão forçada de genes de pluripotência endógenos cujo estado depende das vias de sinalização autorreguladas positivamente, mediadas por genes associados a *stemness* e proliferação (HAWKINS *et al.*, 2014). Ao passo que as células são repicadas, a expressão dos genes OSKM decresce progressivamente até extinção completa, fato geralmente observado entre as passagens P8 e P15 (Figura 4.25).

Desta forma, se faz necessário, para dar continuidade às próximas etapas da caracterização, confirmar que o estado de pluripotência e autorrenovação das iPSCs seja mantido unicamente pela expressão dos genes endógenos de pluripotência na ausência da expressão dos genes exógenos do VS. Previamente ao início das etapas de caracterização para todas as iPSCs derivadas dos pacientes e controles confirmamos a ausência de micoplasma (anexo 4).

O sistema VS geração 1.0 consta de quatro vírus, em que cada um expressa de maneira independente um dos 4 fatores de Yamanaka. Já no caso do sistema VS 2.0 são utilizados três vírus que expressam c-Myc e Klf-4 individualmente, e um terceiro vetor que expressa os genes Oct-3/4, Sox-2, Klf-4 e c-Myc. A figura 4.34 apresenta o resultado de RT-PCR, em que a iPSC.MFP3.17 (passagem 11) e a iPSC.MFP6.1 (passagem 12) não expressam os genes exógenos de pluripotência do sistema VS acima descritos (para cada versão de VS).



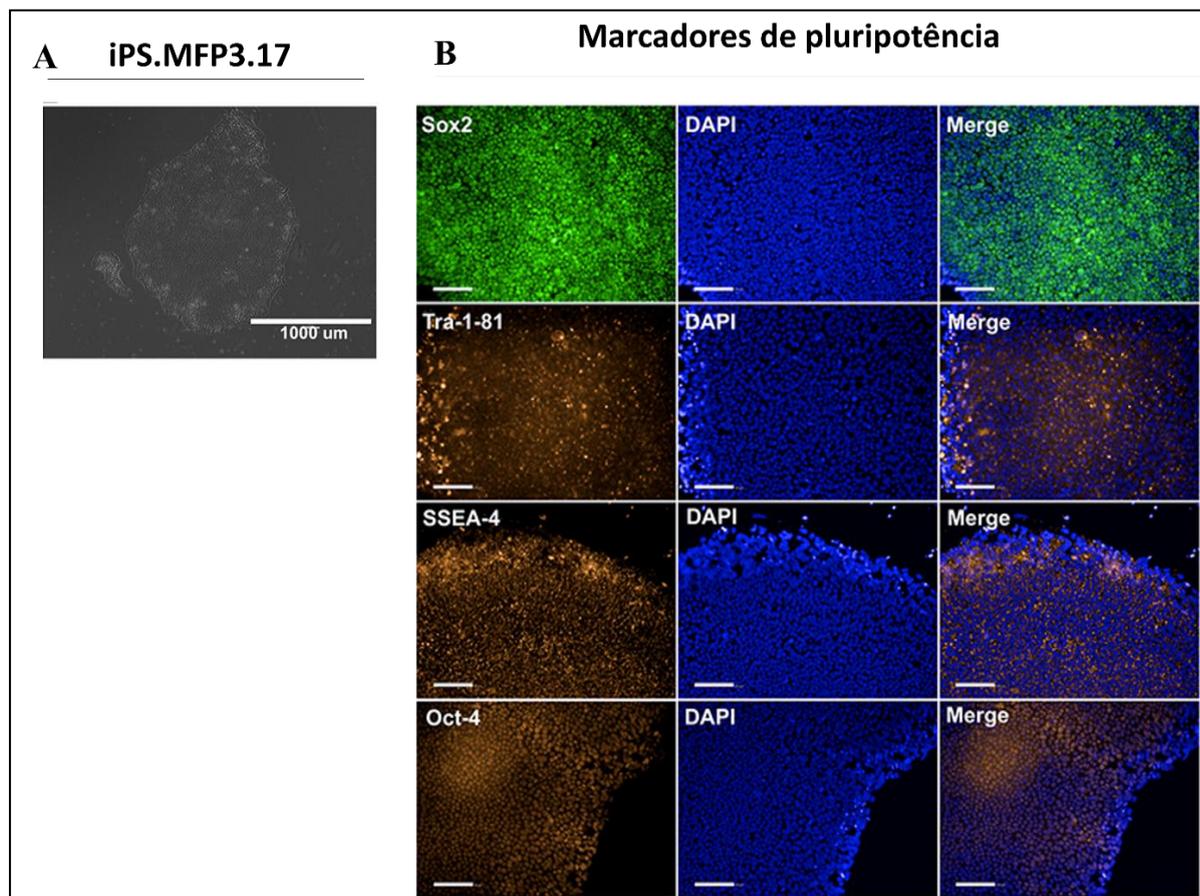
**Figura 4.25. Expressão do vírus Sendai.** Análise da expressão dos genes do vírus Sendai (VS) por RT-PCR dos clones iPSCs derivados dos pacientes P3 e P6 **A.** Expressão dos genes exógenos de pluripotência do Sistema VS 1.0 avaliada na iPS.MFP3.17 - passagem P11 e **B.** na iPS.MFP6.1 - passagem P12. Como controle positivo (C+) foi utilizado um *pool* de iPSCs controle em passagem P3. C-: PCR em ausência de cDNA (DNA complementar).

#### 4.3.2. Avaliação dos marcadores de pluripotência por imunofluorescência

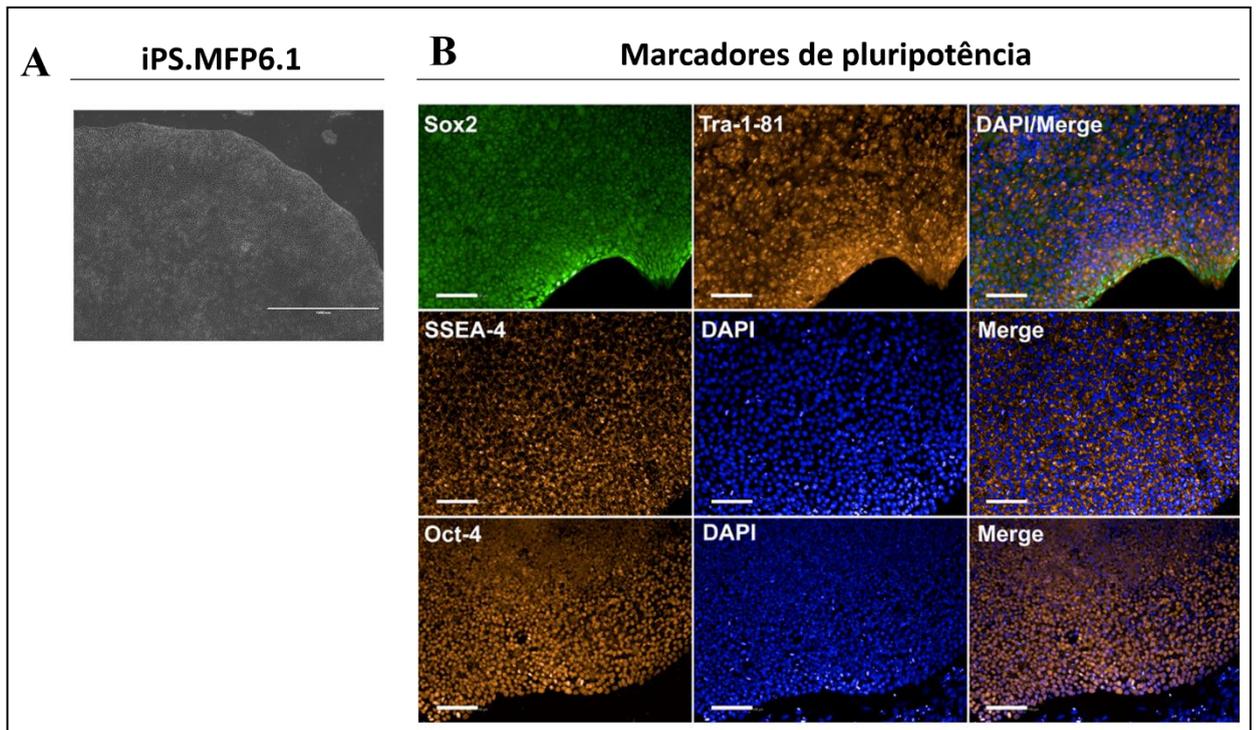
Para confirmar a pluripotência das iPSCs, os marcadores de células tronco embrionárias OCT-3/4, NANOG, SOX-2 (marcadores nucleares), SSEA-4, TRA-1-60 e TRA-1-81 (marcadores de superfície) foram avaliados por imunofluorescência. Nessa etapa, foram caracterizados duas iPSCs por genótipo de cada paciente. No anexo 7 está descrita a lista de 26 iPSCs e os marcadores de pluripotência cuja expressão foi detectada por imunofluorescência, assim como a quantificação dos marcadores de pluripotência.

Pelo fato de terem sido utilizados duas versões do Cyto-Tune®Sendai Virus Reprogramming Kit (1.0. e 2.0), os resultados da caracterização aqui descritos foram representados pelas iPSCs derivadas do paciente P3 e P6 (iPS.MFP3.17 e iPS.MFP6.1), geradas com o sistema VS 1.0 ou 2.0, respectivamente. A figura 4.26 apresenta os resultados da caracterização da pluripotência da iPS.MFP3.17, e na figura 4.27 encontram-se aqueles correspondentes à iPS.MFP6.1.

As figuras 4.26.A e 4.27.A ilustram a morfologia clássica das iPSCs em etapa de expansão. As figuras 4.26.B e 4.27.B confirmam a presença dos marcadores de pluripotência OCT-3/4, SOX-2, TRA-1-80 e SSEA4 em ambas as iPSCs.



**Figura 4.26. Caracterização de pluripotência dos clones iPSCs derivados a partir dos pacientes com MF reprogramados com o sistema VS 1.0. A.** Morfologia da iPS.MFP3.17 que foi selecionada e expandida sobre Matrigel - passagem P13. A imagem foi adquirida usando o Microscópio Evos XL Cell Imaging System, barra: 1.000 µm. **B.** Foram detectados por imunofluorescência os marcadores de pluripotência SSEA-4, OCT-3/4, TRA-1-81 (vermelho) e SOX-2 (verde). O núcleo foi marcado com DAPI (azul), barra 100 µm.



**Figura 4.27. Caracterização de pluripotência dos clones iPSCs derivados a partir dos pacientes com MF reprogramados com o sistema VS 2.0. A.** Morfologia da iPS.MFP6.1 que foi selecionada e expandida sobre Geltrex - passagem P 17. A imagem foi adquirida usando o Microscópio Evos XL Cel Imaging System, barra: 1.000  $\mu\text{m}$ . **B.** Foram detectados por imunofluorescência os marcadores de pluripotência SSEA-4, OCT-3/4, TRA-1-81 (vermelho) e SOX-2 (verde). O núcleo foi marcado com DAPI (azul), barra 100  $\mu\text{m}$ .

A imunexpressão dos marcadores de células tronco embrionárias acima descritos foi quantificada a partir da análise de um total de 35 campos por imagem que correspondem a cada marcador. A tabela 4.7 mostra o número de núcleos marcados com DAPI das células avaliadas. A continuação, na próxima coluna, pode-se observar o número da imunexpressão positiva dos marcadores de pluripotência de cada iPSC e, na última coluna, foi calculada a porcentagem da imunexpressão por núcleo marcado com DAPI.

**Tabela 4.7. Quantificação da imunoposição dos marcadores de pluripotência.** As Imagens foram adquiridas usando o Operetta® High-Content Imaging System, com a objetiva 20X, e *High numerical apertures (NA)* (PerkinElmer, USA). A análise foi realizada usando o Columbus High-Content Screening platform (PerkinElmer, USA).

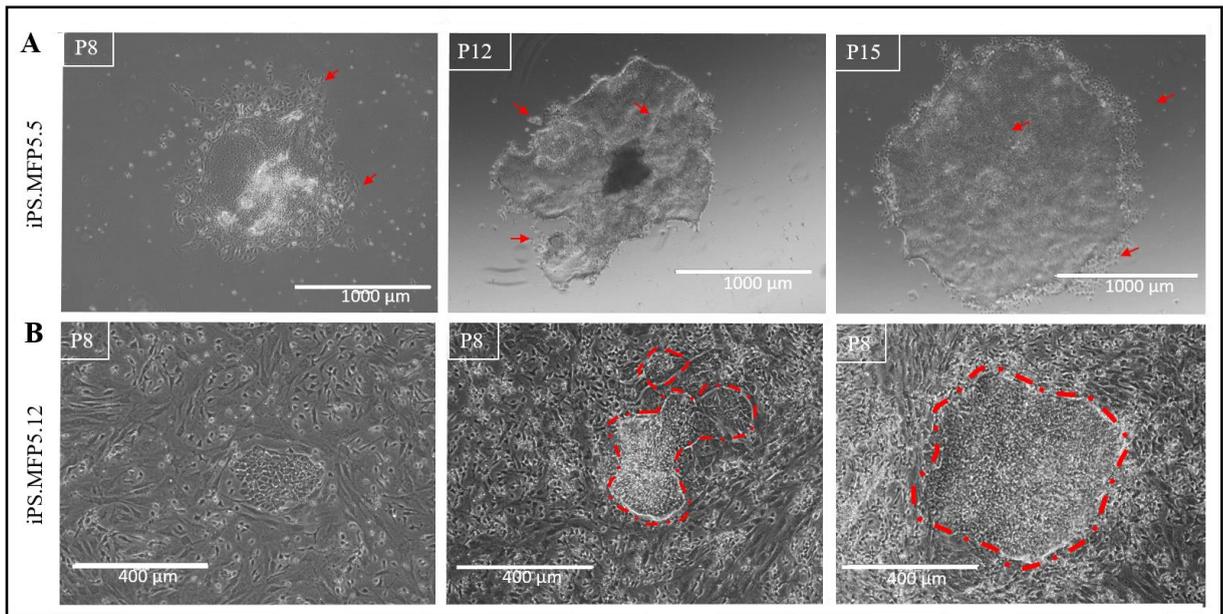
Paciente	iPSC	Marcador de pluripotência	Nº de núcleos (DAPI)	Nº da imunoposição positiva	% da quantificação (imunoposição/núcleos)
P3	Clone 17	Sox-2 (AlexaFluor 488)	21884	20924	95,6
		TRA1-81 (AlexaFluor 594)	21884	20996	95,94
		OCT-3/4 (AlexaFluor 594)	23647	23612	99,98
		SSEA-4 (AlexaFluor 594)	23587	21228	89,98
P6	Clone 1	Sox-2 (AlexaFluor 488)	18570	18488	99,5
		TRA1-81 (AlexaFluor 564)	18570	12598	67,8

A caracterização completa da pluripotência foi realizada em 12 clones iPSC (derivados de pacientes e controles), listados na tabela 4.8.

**Tabela 4.8. Lista das 12 iPSCs que foram selecionadas para caracterização completa da pluripotência.** A confirmação da imunomarcagem positiva para os genes de pluripotência está indicada com o símbolo. , (\*) marcadores não avaliados. (†) os marcadores TRA-1-60 e TRA-1-80 foram parcialmente detectados.

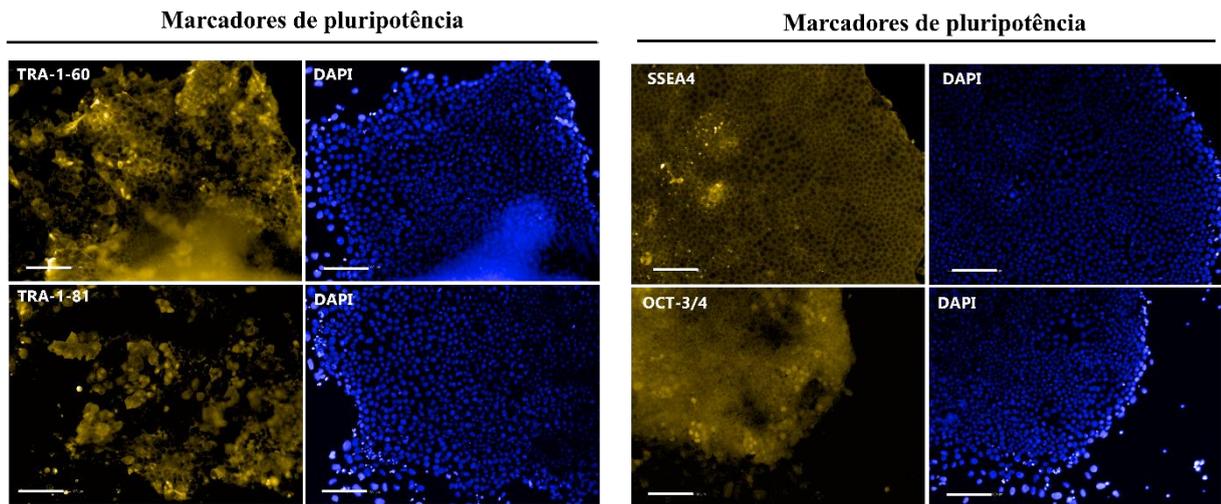
iPSC	Marcadores de pluripotência					
	Oct-3/4	Sox-2	Nanog	SSEA-4	TRA-1-81	TRA-1-60
iPS.MFP1.1	<input checked="" type="checkbox"/>					
iPS.MFP2.18	<input checked="" type="checkbox"/>					
iPS.MFP3.17	<input checked="" type="checkbox"/>					
iPS.MFP4.7	<input checked="" type="checkbox"/>					
iPS.MFP4.24	<input checked="" type="checkbox"/>					
iPS.MFP4.32	<input checked="" type="checkbox"/>					
iPS.MFP4.34	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	*	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	*
iPS.MFP5.2	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	*	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	*
iPS.MFP5.5	<input checked="" type="checkbox"/>	*	*	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	*
iPS.MFP6.1	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	*	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	*
iPS.CNT1.15	<input checked="" type="checkbox"/>					
iPS.CNT2.8	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	*	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	*

Após seleção das colônias iPSCs emergentes da placa de reprogramação e posterior expansão individual de cada clone, observou-se ao microscópio um aumento da diferenciação espontânea das colônias iPSCs portadoras das mutações nos genes *JAK2*<sup>V617F</sup> e *ASXL1*<sup>Y951fs\*1</sup> (clones 5 e 12) (Figura 4.28.). Ambos os clones foram repicados manualmente sobre Geltrex e mantidos em cultura com mTeSR. O clone iPS.MFP5.12 diferenciou-se completamente após a passagem 8, e o clone iPS.MFP5.5 apresentou alteração da morfologia até passagem 15 como ilustrado na figura 4.30.



**Figura 4.28. Morfologia das colônias iPSCs portadoras das mutações nos genes *JAK2*<sup>V617F</sup> e *ASXL1* derivadas do P5. A.** Imagens da morfologia da iPS.MFP5.5, nas passagens P8, P12 e P15 respectivamente. As setas vermelhas indicam as células diferenciadas espontaneamente a partir da iPSC. Barra: 1.000 μm **B.** Imagens da morfologia da iPS.MFP5.12 na passagem P8. As bordas das pequenas colônias foram sinalizadas em vermelho as setas indicativas das células diferenciadas espontaneamente. Barra: 400 μm. Todas as imagens foram adquiridas usando o microscópio invertido Evos XL Cell Imaging System.

No caso da iPS.MFP5.5 observamos que os marcadores de superfície TRA-1-60 e TRA-1-81 se mostraram expressos parcialmente, à diferença dos marcadores OCT-3/4 e SSEA-4, cuja avaliação foi realizada na passagem 15 (Figura 4.29).



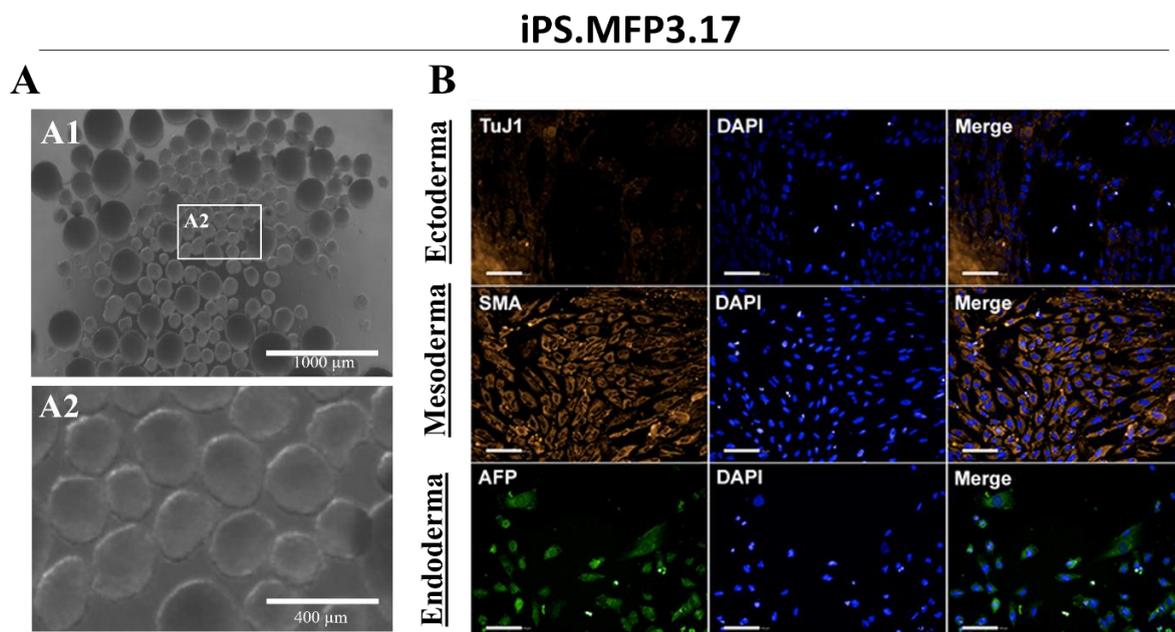
**Figura 4.29. Caracterização de pluripotência de um clone iPSC ( $JAK2^{V617F}/ASXL1^{Y951fs*1}$ ) derivada do P5, reprogramado com o sistema VS 2.0. A.** Foram detectados por imunofluorescência os marcadores de pluripotência SSEA-4, OCT-3/4, TRA-1-60 e TRA-1-81 (vermelho). O núcleo foi marcado com DAPI (azul), barra: 100  $\mu$ m.

Baseados no conceito de pluripotência, além das iPSCs apresentarem morfologia características de células tronco embrionárias, e confirmado a presença dos marcadores de pluripotência, ainda se faz necessário avaliar a capacidade das iPSCs em se diferenciar nas três camadas germinativas. Além disso, essa etapa permitiu inferir se as mutações poderiam influenciar a diferenciação das iPSCs derivadas dos pacientes.

#### 4.3.3. Ensaio de formação de corpos embrioides (EBs) *in vitro*

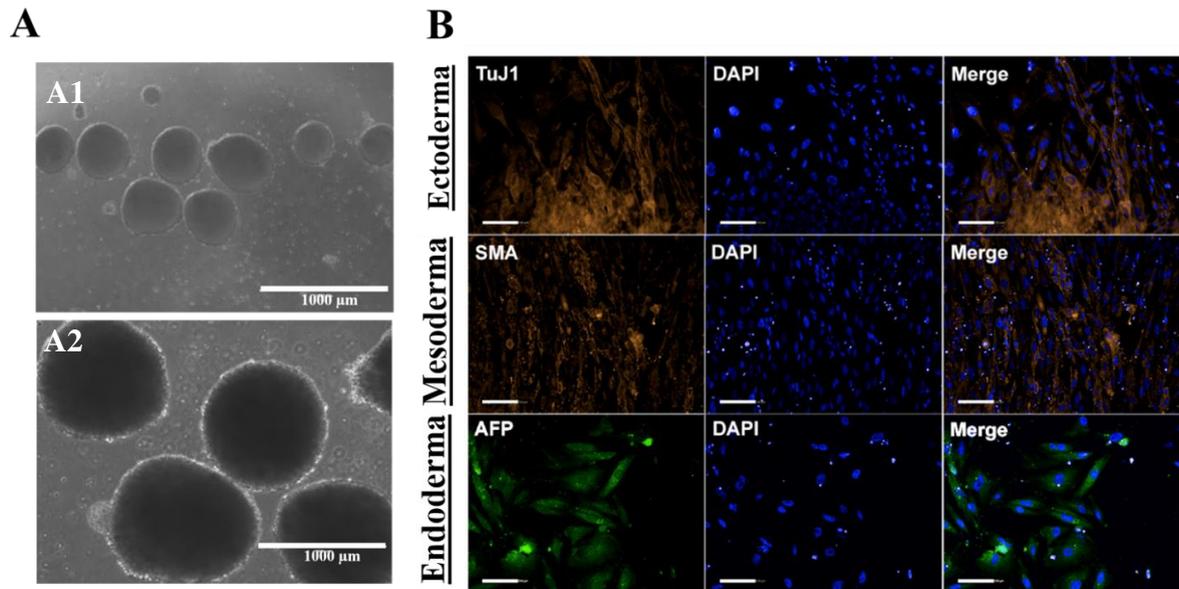
A capacidade das iPSCs de se diferenciar nas três camadas germinativas foi avaliada *in vitro* pela formação de corpos embrioides (EBs). As figuras 4.30. A e 4.31. A, representam a morfologia dos EBs formados para a iPS.MFP3.17 e a iPS.MFP6.1. Após 6 dias em cultura essas estruturas tridimensionais diferenciam-se de maneira organizada, em progenitores das três camadas germinativas. Os EBs foram dissociados e transferidos a uma placa aderente. Posteriormente, os marcadores de diferenciação foram avaliados nas células aderidas através de imunofluorescência e RT-PCR.

Os marcadores analisados por imunofluorescência foram: Tubulina- $\beta$ III, marcador da camada ectodérmica; SMA, correspondente ao mesoderma; e AFP, relativa à camada endodérmica. As figuras 4.30. B e 4.31. B mostram as imunomarcações positivas das células diferenciadas espontaneamente a partir dos EBs.



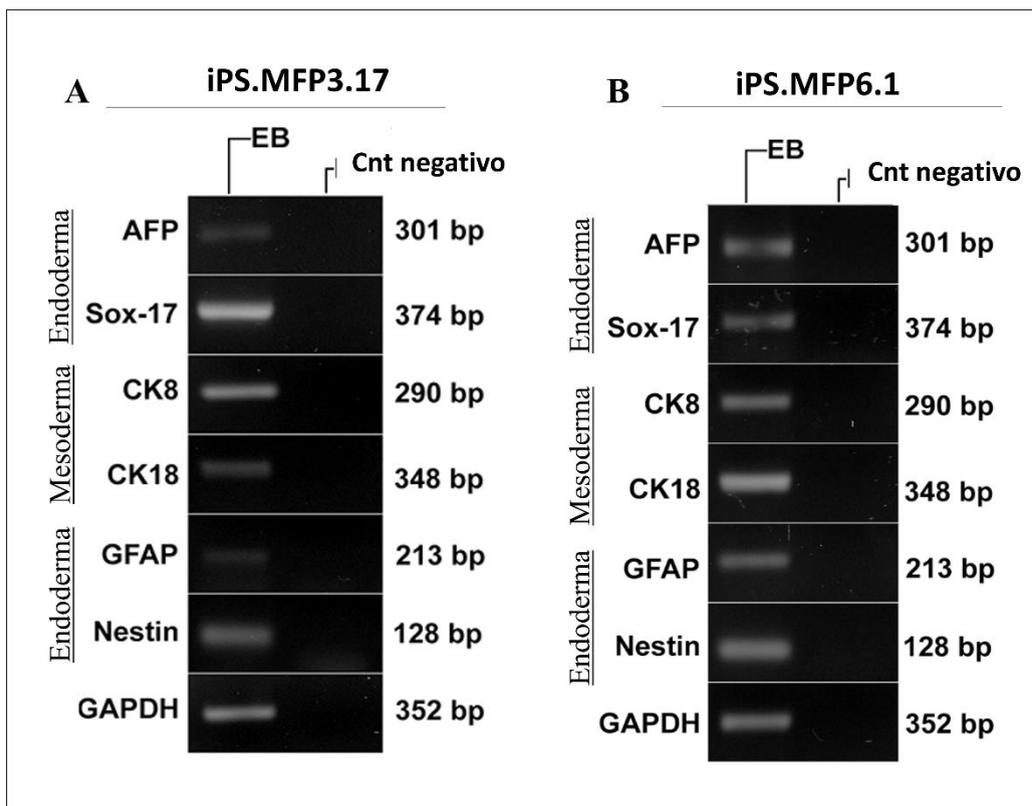
**Figura 4.30. Análise da diferenciação dos corpos embrioides (EB) formados a partir das iPS.MFP3.17.** **A.** Morfologia dos EBs. Imagem adquirida usando o Microscópio Evos XL Cel Imaging System, **A1**, barra: 1.000 µm e **A2**, barra 400 µm. **B.** A detecção dos marcadores específicos para ectoderma: Tubulina- $\beta$ III (vermelho), mesoderma: SMA, Endoderma: AFP (verde) foi realizada por imunofluorescência. DAPI (azul) (Termo Fisher Scientific). Magnificação 20X. Barra de referência 100 µm correspondente à imagem das células diferenciadas dos EBs. Operetta® High-Content imaging System, with 20X. objective, High numerical apertures (NA) Objective (PerkinElmer, USA).

## iPS.MFP6.1



**Figura 4.31. Análise da diferenciação dos corpos embrioides (EB) formados a partir das iPS.MFP6.1.** A. Morfologia dos EB. Imagem adquirida usando o Microscópio Evos XL Cell Imaging System, A1. Barra: 1.000 μm e A2. Barra 400 μm. B. Detecção dos marcadores específicos para ectoderma:  $\beta$ III-Tubulina (vermelho), mesoderma: SMA e Endoderma: AFP (verde). foi realizada por imunofluorescência. O corante DAPI (azul) (Termo Fisher Scientific) . Magnificação 20X. Barra de referência de 100 μm correspondente à imagem dos EBs. Operetta® High-Content imaging System, com objetiva de 20X e High numerical apertures (NA) Objective (PerkinElmer, USA).

Os marcadores avaliados por RT-PCR estão representados nas figuras 4.32 A e B, que corresponde às iPS.MFP3.17 e iPS.MF.P6.1. Para a camada ectodérmica foram avaliados os marcadores Nestina e GFAP, para a camada mesodérmica foram os marcadores CK18 e CK8, e, por fim, para a camada endodérmica os marcadores AFP e Sox-17. Para todos eles foi confirmada a expressão nas células diferenciadas dos EBs. A tabela 4.9. mostra a lista das linhagens de iPSCs derivadas de todos os pacientes que apresentaram marcação positiva para os marcadores das três camadas germinativas avaliadas tanto por imunofluorescência quanto por RT-PCR.



**Figura 4.32. Expressão dos marcadores específicos das três camadas germinativas.** Análise da expressão dos marcadores por RT-PCR das células diferenciadas dos EBs. Os EBs foram gerados a partir dos clones iPSCs derivados dos pacientes P3 e P6. **A.** Expressão dos genes específicos das camadas ectodérmica, mesodérmica e endodérmica avaliada na iPS.MFP3.17. **B.** Avaliação realizada na iPS.MFP6.1 O controle positivo (C-) refere-se ao PCR em ausência de cDNA (DNA complementar).

**Tabela 4.9. Avaliação dos marcadores específicos das três camadas germinativas.** Na primeira coluna foi descrita a lista das linhagens iPSCs derivadas dos pacientes P1-P6 e dos controles C1 e C2. Nas seguintes colunas estão listados os marcadores específicos avaliados para as células derivadas dos EBs associadas às camadas endodérmicas, mesodérmicas e ectodérmicas.

iPSC	Marcadores de diferenciação (EBs)									
	Endoderma		Mesoderma			Ectoderma				
	AFP	Sox-17	SMA	CK8	CK18	BIII-Tubulina	Nestina	GFAP	Nestina	Pax-6
iPS.MFP1.1	✓	*	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	*
iPS.MFP2.18	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
iPS.MF.P3.17	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
iPS.MFP4.7	✓	*	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
iPS.MFP4.24	✓	*	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
iPS.MFP4.32	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
iPS.MFP4.34	✓	*	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
iPS.MFP5.2	✓	*	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	*
iPS.MFP6.1	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	*
iPS.CNT1.15	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
iPS.CNT2.8	✓	*	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓	*

#### 4.4. ETAPA C - Diferenciação Hematopoiética

Diferentes sistemas de diferenciação hematopoiética *in vitro* a partir de ES/iPSC foram estabelecidos para a produção de células progenitoras e maduras. A diferenciação hematopoiética *in vitro feeder-free* a partir de iPSCs tem sido direcionada para terapia celular e possibilita ainda a modelagem de doenças hematológicas a partir da diferenciação de clones iPSCs paciente-específico.

Baseados na diferenciação hematopoiética *in vitro feeder-free*, nesta etapa do projeto, as iPSCs derivadas do paciente P4 e dois controles foram diferenciadas em dois tipos de células: progenitores hematopoiéticos e granulócitos. A escolha desse paciente baseia-se principalmente por termos gerado as iPSCs mutadas e WT de genes reguladores epigenéticos do mesmo paciente, e o nosso interesse em estudar principalmente a influência da mutação identificada no gene *TET2*. Desta forma, induzimos a diferenciação de progenitores hematopoiéticos a partir das iPSCs derivadas do P4. Essa etapa tem como objetivo avaliar a influência da mutação do gene *TET2*, que leva à perda da função, tanto no processo de diferenciação hematopoiética, quanto a partir dos progenitores gerados avaliar o potencial clonogênico dos mesmos.

A abordagem de caracterização do perfil epigenético dessas células maduras foi executada através de granulócitos *in vitro* a partir de iPSCs. Os granulócitos diferenciados *in vitro* a partir de diferentes clones de iPSCs do mesmo paciente carregando diferentes genótipos quanto às mutações, foram comparados entre si, assim como comparados com o perfil epigenético dos granulócitos primários isolados do mesmo paciente.

##### 4.4.1. Diferenciação de progenitores hematopoiéticos a partir de iPSC

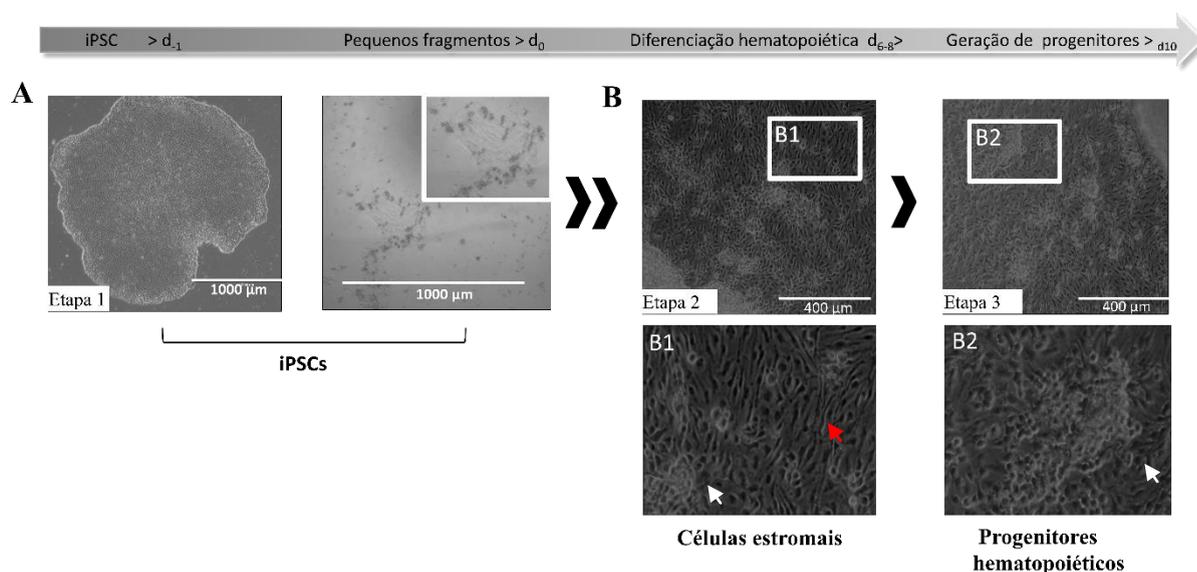
Primeiramente, estudamos o impacto das mutações *driver* e cooperativas na diferenciação hematopoiética gerando progenitores diferenciados das iPSCs derivadas do paciente P4, cujas células são portadoras de mutações nos genes *CALR*<sup>ins5</sup> e *TET2*<sup>G898X</sup>. Assim, promovemos a diferenciação dos progenitores hematopoiéticos a partir dos clones iPS.MFP4.5, iPS.MFP4.7 e iPS.MFP4.34. (*CALR*<sup>ins5</sup>/*TET2*<sup>WT</sup>) e iPS.MFP4.24 e iPS.MFP4.32 (*CALR*<sup>ins5</sup>/*TET2*<sup>G898X</sup>).

As principais etapas da diferenciação hematopoiética estão representadas na figura 4.41. Na primeira etapa, foi efetuado o repique das iPSCs em pequenos fragmentos (d-1) seguido de plaqueamento sobre Geltrex™, uma matriz que contém fibronectina e colágeno

tipo IV entre outras proteínas extracelulares, necessárias para a diferenciação hematopoiética (Figura 4.33.A).

Na segunda etapa, as células iPSCs foram induzidas à diferenciação em presença das citocinas BMP-4, VEGF e FGFb para geração de progenitores mesodérmicos (entre os dias 0 e 3), seguidos dos progenitores hemangioblásticos (células com potencial hemato-endotelial) (dia 4 e 5). Entre os dias 6 e 8, em presença das citocinas EPO, TPO, IL-6, VEGF, SCF e FLT3L, observamos células diferenciadas que apresentavam uma morfologia similar às células estromais, assim como o surgimento de pequenos agrupamentos de células com morfologia arredondada (Figura 4.33.B).

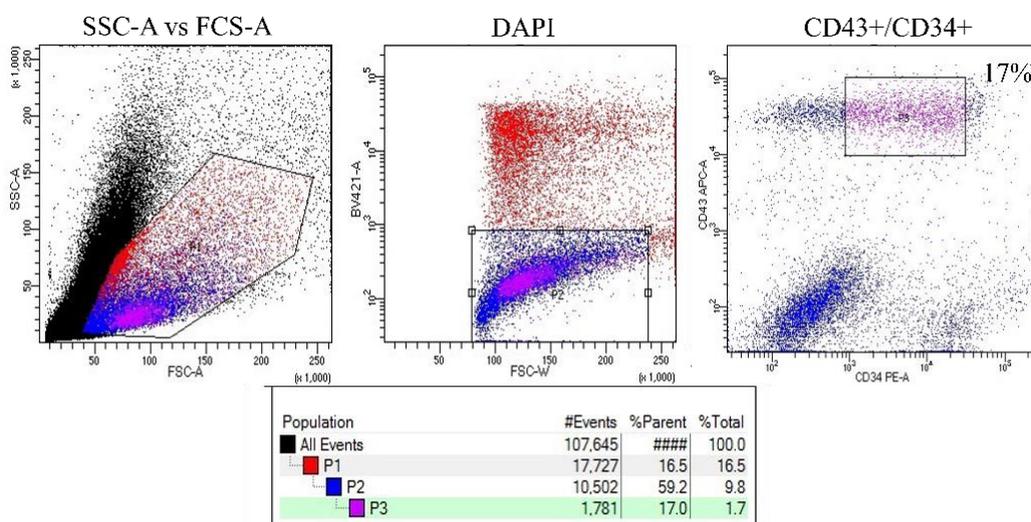
Por fim, na etapa três, entre os dias 8 e 10, os agrupamentos compostos de células com morfologia arredondada aumentaram em celularidade, etapa na qual ainda se observam essas células aderidas às células estromais, como representado na última imagem da figura 4.33.B. A partir do dia 10 as células que compõe os agrupamentos, começam a perder adesão, resultando em um aumento de células em suspensão. Essas células são os progenitores hematopoiéticos imaturos capazes de diferenciar-se principalmente em células eritroides primitivas, megacariócitos e granulócitos-macrófagos.



**Figura 4.33. Representação das diferentes etapas da diferenciação hematopoiética *in vitro* feeder-free.** **A.** Imagem da morfologia das células iPSCs em colônias íntegras (esquerda) e dissociadas em pequenos fragmentos no dia 0 da diferenciação (Etapa 1, à direita). **B.** Imagem das células estromais e dos pequenos grupamentos das células progenitoras hematopoiéticas (seta branca) diferenciadas a partir das iPSC entre os dias 6 e 8 (Etapa 2 da diferenciação, à esquerda) e dia 10 (Etapa 3 da diferenciação, à direita). **B1.** Aumento da imagem correspondente às células estromais (seta vermelha). **B2.** Aumento da imagem da formação dos agrupamentos correspondentes aos progenitores hematopoiéticos. As imagens foram adquiridas no Evos XL Cell Imaging System (Thermo Fischer, USA), escala: 400 ou 1000 µm.

Os progenitores hematopoiéticos que surgiram da diferenciação nos dias 10 e 14 foram separados da cultura por *sorting* pela presença da combinação dos marcadores de superfície CD43 (marcador de progenitores hematopoiéticos imaturos) e CD34 (marcador de epitélio hemogênico e progenitores hematopoiéticos).

A figura 4.34 mostra, de maneira representativa, os resultados do *sorting* do dia 10 da diferenciação hematopoiética a partir de uma iPSC derivada do paciente P4. A análise da população CD43<sup>+</sup>CD34<sup>+</sup> encontra-se dentro do *gate* das células viáveis (separada pela marcação por DAPI). No experimento representado na figura 4.42, 17% das células resultaram positivas para os dois marcadores. Os progenitores hematopoiéticos CD43<sup>+</sup>CD34<sup>+</sup> foram utilizados nos experimentos subsequentes para avaliação em quanto ao seu potencial clonogênico.



**Figura 4.34. Separação por *cell sorting* dos progenitores hematopoiéticos imaturos.** A estratégia de seleção da população de interesse pode ser resumida da seguinte maneira: O *gate* P1 do primeiro *dot-plot* (SSC-A vs FSC-A) corresponde a uma população heterogênea de células diferenciadas no dia 10. A continuação, no segundo *dot-plot* dentro de P1, foi selecionada a população de células viáveis (*gate* P2, células separadas pela marcação por DAPI). No terceiro e último *dot-plot*, a população nomeada P3 encontra-se dentro de P2, e corresponde aos progenitores hematopoiéticos CD43<sup>+</sup>CD34<sup>+</sup>. Esses progenitores foram sorteados no dia 10 e colocados em cultura. A tabela apresenta o resumo das porcentagens das células correspondentes a cada *gate*. Para o *sorting* usamos o BD FACS AriaII *cell sorter* (BD Biosciences).

Para todos os genótipos se observou diferenciação dos progenitores hematopoiéticos a partir das iPSCs derivadas do paciente P4. Desse modo, sugere-se que as mutações carregadas pelas células do paciente P4 não impedem a diferenciação hematopoiética.

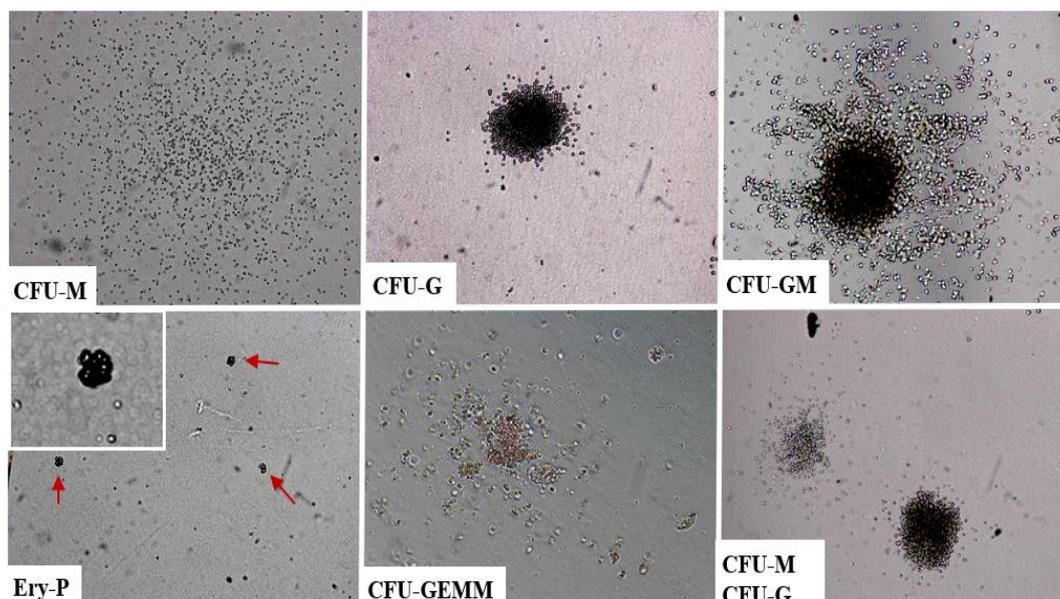
#### **4.4.2. Avaliação do potencial clonogênico dos progenitores hematopoiéticos**

Posteriormente, foi avaliado o potencial clonogênico dos progenitores hematopoiéticos diferenciados *in vitro* a partir das iPSCs. Para isso, dois tipos de ensaios foram realizados: metilcelulose e coágulo plasmático. Ambos têm como objetivo identificar e quantificar o surgimento de colônias mieloides.

##### **4.4.2.1. Avaliação da formação de unidades formadoras de colônias (*Colony-forming Unit*, CFUs) mieloides**

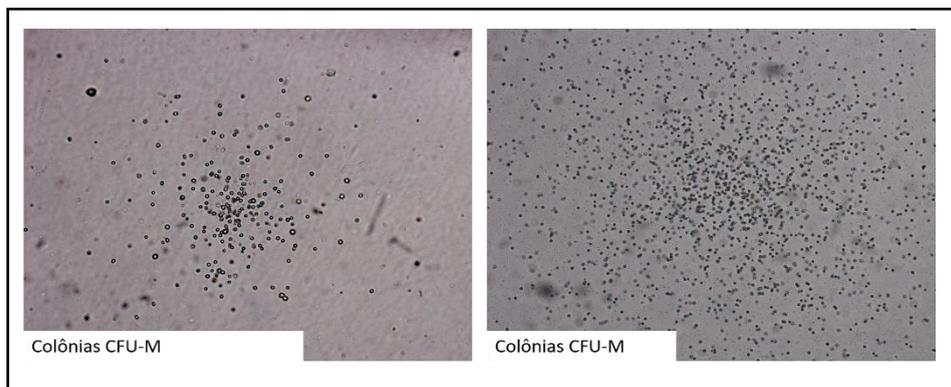
Os progenitores CD43<sup>+</sup>CD34<sup>+</sup> obtidos por *sorting* nos dias 10 e 14 da mesma diferenciação foram plaqueados em meio semissólido metilcelulose suplementado com um coquetel de citocinas hematopoiéticas e fatores de crescimento, para avaliação da capacidade de formação de unidades formadoras de colônias (CFUs) mieloides.

De modo geral, com relação aos tipos de colônias, observamos que todos os clones foram capazes de gerar diferentes tipos de CFUs mieloides: CFU-monocítica (CFU-M), CFU-granulocítica (CFU-G), CFU-granulo-monocítica (CFU-GM), pequenas colônias eritroides (Ery-P) e colônias multilinhagens (GEMM). As imagens ilustrativas dos tipos de colônia encontrados foram representadas na figura 4.35.



**Figura 4.35. Ensaio de metilcelulose a partir dos progenitores hematopoiéticos.** O número e tipo de colônias foi avaliado no dia 12 por microscopia ótica. Magnificação 4X. (Ery-P: pequenas colônias eritroides (cetas vermelhas), colônias eritroides de tamanho maior (ceta branca), M: monócito, G: granulócito, GM: Granulo-monócito, GEMM: colonia multilinhagens). As imagens foram adquiridas no microscópio invertido Nikon Eclipse Ti-U e analisadas com os software AxioVision.

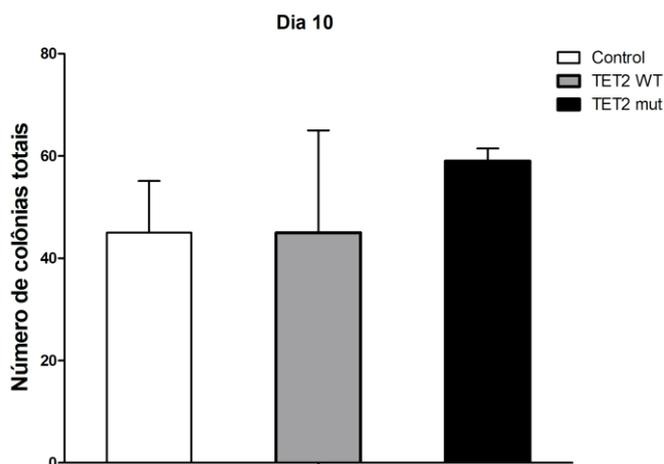
Ainda com relação aos diferentes tipos de CFUs, observou-se que as células  $CD43^+CD34^+$  sortadas no dia 10 e dia 14 geram um perfil diferente de colônias em metilcelulose. No dia 10 a população  $CD43^+CD34^+$  estava enriquecida em progenitores característicos da primeira onda de hematopoiese, ou hematopoiese primitiva, como os que geram colônias eritroides primitivas (Ery-P). As Ery-P apresentam um menor tamanho quando comparadas com as colônias eritroides que surgiram a partir dos progenitores sortados no dia 14, como mostrado na figura 4.35. Por outro lado, pequenas colônias de monócitos também foram observadas nas placas correspondentes aos progenitores primitivos (sortados dia 10) (Figura 4.36 e 4.37). Já as colônias monocíticas derivadas dos progenitores sortados no dia 14, têm tamanhos maiores. Em contraste aos progenitores primitivos, as células  $CD43^+CD34^+$  sortadas no dia 14 de cultura apresentavam mais progenitores de linhagem monocítica.



**Figura 4.36. Perfil das colônias monocíticas diferenciadas a partir dos progenitores  $CD4^{3+}CD3^{4+}$ .** Dois perfis de colônias foram observados na diferenciação dos progenitores  $CD43^+CD34^+$  sorteados no dia 10 e 14 respectivamente (imagens representativa da observação ao microscópio ótico). Magnificação 4X. CFU-M: colônias monocíticas. As imagens foram adquiridas no microscópio invertido Nikon Eclipse Ti-U e analisadas com o software AxioVision.

As figuras 4.38. e 4.39 apresentam os resultados obtidos do crescimento de CFUs mieloides nos dias 10 e 14, respectivamente, a partir dos progenitores derivados dos clones controle ( $CALR^{WT}/TET2^{WT}$ ), e derivados dos clones  $iPS.MFP4\ CALR^{ins5}/TET2^{WT}$  e  $iPS.MFP4\ CALR^{ins5}/TET2^{G898X}$ . Experimentos independentes foram realizados com dois clones iPSCs diferentes para cada genótipo.

Com relação aos progenitores  $CD43^+CD34^+$  sorteados no dia 10, não observamos diferença no número total de colônias geradas em metilcelulose, quando comparados entre as colônias do paciente e controles (Figura 4.37).

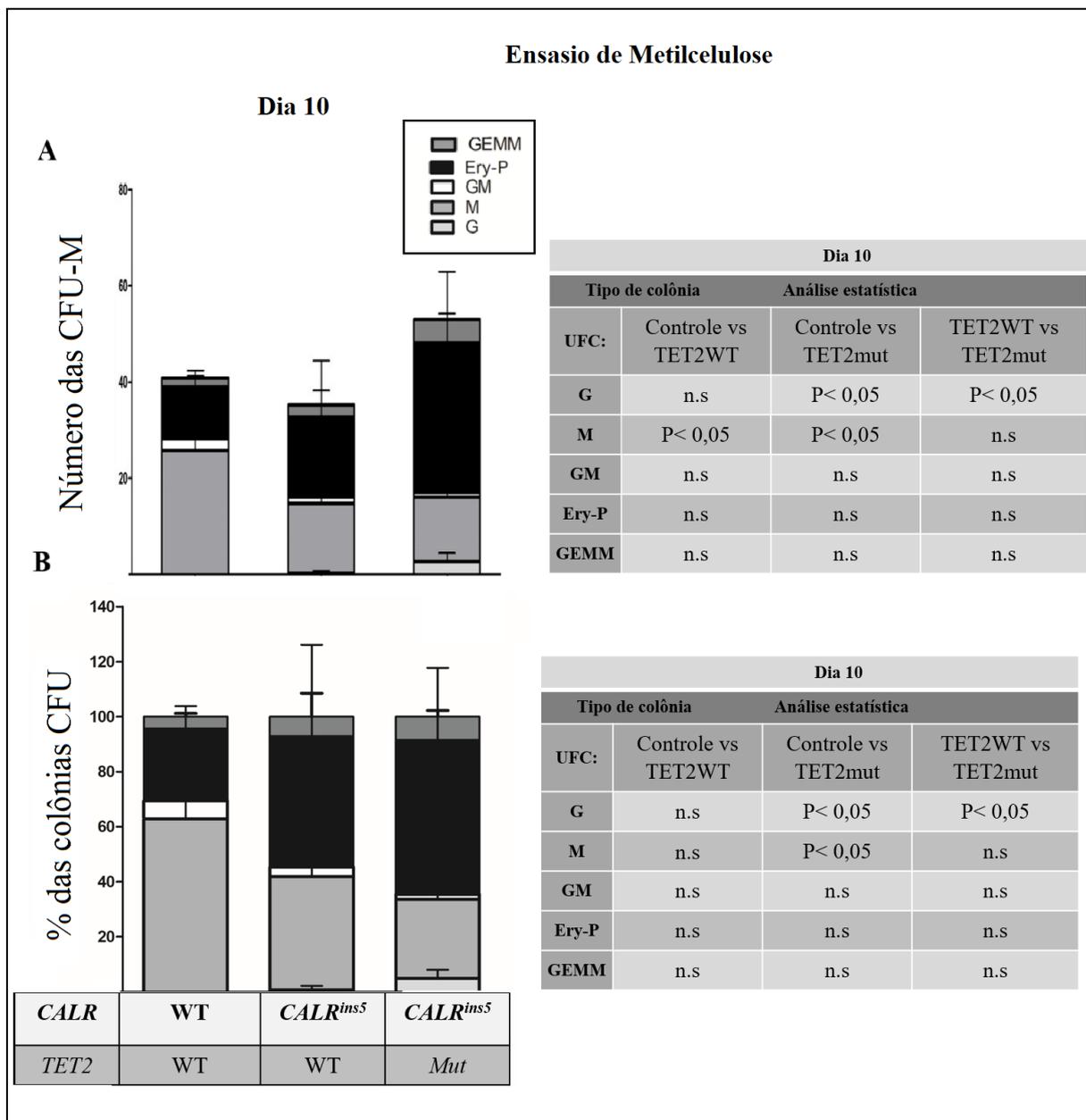


**Figura 4.37. Número total de colônias formadas a partir dos progenitores hematopoiéticos sorteados o dia 10 da diferenciação hematopoiética.** Os progenitores sorteados no dia 10 da diferenciação foram plaqueados em metilcelulose (2.000 células/placa). As CFU totais formadas a partir das iPSCs. MFmut ( $CALR^{ins5}/TET2^{G898X}$ ), iPSC.MFWT ( $CALR^{ins5}/TET2^{WT}$ ) e iPSC.CNTWT ( $CALR^{WT}/TET2^{WT}$ ) foram quantificadas. Os dados estão mostrados como média  $\pm$  desvio padrão (DP) a partir de dois experimentos independentes em duplicata. A análise estatística foi analisada usando o test one-way ANOVA com comparação múltipla de Tukey. O valor-p menor que 0.05 fomos considerado estatisticamente significativo.

Contudo, quando comparamos os diferentes tipos de colônias CFUs mieloides obtidas a partir dos progenitores selecionados no dia 10, observou-se uma diferença significativa no número de colônias CFU-M geradas a partir das células do paciente P4 ( $CALR^{ins5}$ , tanto  $TET2^{G898X}$  quanto  $TET2^{WT}$ ), quando comparadas ao controle, que apresentou um maior número das CFU-M. Em relação às CFU-G, foi observado um aumento significativo no número de colônias obtidas a partir de progenitores portadores de  $TET2^{G898X}$ , quando comparados aos progenitores  $TET2^{WT}$  derivados do mesmo paciente, assim como com as colônias diferenciadas do controle (Figura 4.38.A).

Posteriormente, a partir dos mesmos resultados, analisamos a proporção das diferentes colônias mieloides formadas. A diminuição de colônias CFU-M dos progenitores  $CALR^{ins5}/TET2^{WT}$  derivados das iPSCs dos pacientes comparado com os progenitores derivados da iPS.CNT, não foi observada na análise de proporções de colônias (Figura 4.38.B). Porém, observamos que a diferença da linhagem monocítica foi mantida apenas para os progenitores  $CALR^{ins5}/TET2^{G898X}$  e os controles. Por outro lado, observamos diferença na linhagem granulocítica, encontrada aumentada entre os progenitores  $CALR^{ins5}/TET2^{G898X}$  e os controles, assim como quando comparada com os progenitores  $CALR^{ins5}/TET2^{WT}$ . Desta forma, tanto na análise de número de colônias quanto na análise de proporções de colônias

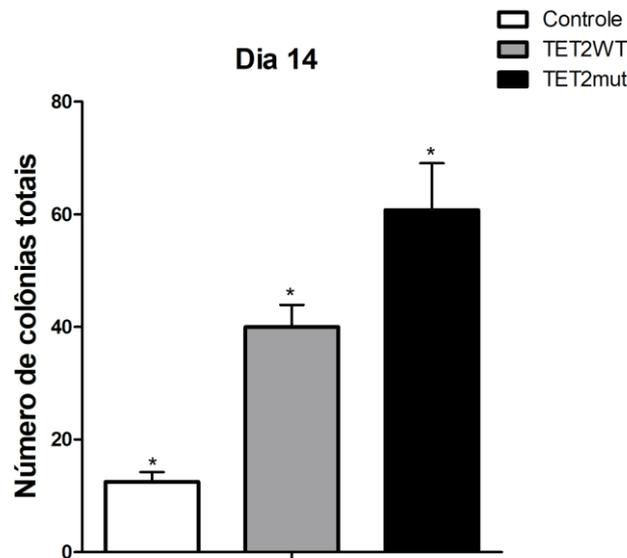
observamos que a mutação no gene *TET2* poderia estar influenciando os progenitores primitivos na formação de colônias granulocíticas.



**Figura 4.38. Potencial clonogênico dos progenitores CD43<sup>+</sup>CD34<sup>+</sup> sorteados o dia 10.** Os progenitores foram plaqueados em metilcelulose (2.000 células/placa). (A). O total de CFU mieloides formadas a partir dos progenitores sorteados o dia 10, derivados do paciente P4: *CALR<sup>ins5</sup>/TET2<sup>WT</sup>*, *CALR<sup>ins5</sup>/TET2<sup>G898X</sup>* (*Mut*) e os controles (*CALR<sup>WT</sup>/TET2<sup>WT</sup>*), foram quantificadas e identificado o tipo de colônia e subsequentemente, comparadas entre si (B). A proporção das colônias foi calculada como a porcentagem do número de cada tipo de colônia em relação ao total das colônias quantificadas correspondente às diferenciações de cada progenitor. Os dados estão mostrados com média ± desvio padrão (DP) a partir de dois experimentos independentes em duplicata. A análise estatística foi analisada usando o test one-way ANOVA com comparação múltipla de Tukey. O valor-p menor que 0.05 foi considerado estatisticamente significativo. n.s. valor não significativo.

A posteriori, analisamos o número total de CFUs geradas a partir de progenitores sorteados no dia 14, e observamos diferença significativa entre os três grupos. Desse modo, a

partir da iPS.MFP4  $CALR^{ins5}/TET2^{G898X}$  os progenitores derivados formaram um maior número de colônias do que os progenitores de iPS.MFP4  $CALR^{ins5}/TET2^{WT}$  e iPS.CNT  $CALR^{WT}/TET2^{WT}$ . Portanto, diferente do que foi observado na análise dos progenitores primitivos, os progenitores TET2 mutados sorteados o dia 14 resultam em um aumento no número total de colônias obtido (Figura 4.39).

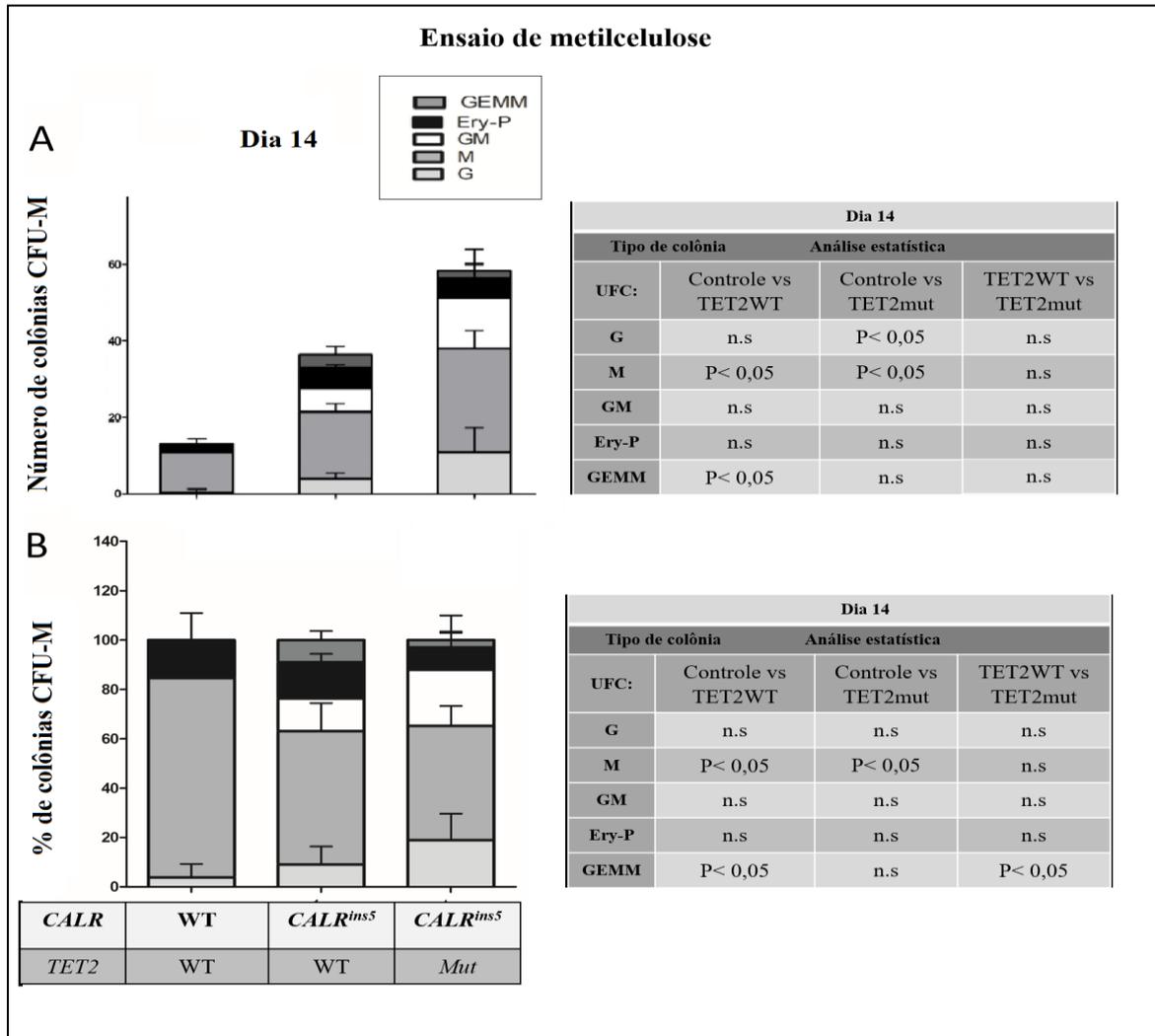


**Figura 4.39. Número total de colônias formadas a partir dos progenitores hematopoiéticos sorteados o dia 14 da diferenciação hematopoiética.** Os progenitores sorteados o dia 10 da diferenciação foram plaqueados em metilcelulose (2.000 células/placa). As CFU formadas a partir das iPSC.MFmut ( $CALR^{ins5}/TET2^{G898X}$ ), iPSC.MFWT ( $CALR^{ins5}/TET2^{WT}$ ) e iPSC.CNTWT ( $CALR^{WT}/TET2^{WT}$ ) foram quantificadas. Os dados estão mostrados como média  $\pm$  desvio padrão (DP) a partir de dois experimentos independentes em duplicata. A análise estatística foi analisada usando o test one-way ANOVA com comparação múltipla de Tukey. O valor-p menor que 0.05 foi considerado estatisticamente significativo. (\*) diferença significativa observada entre os três grupos de progenitores.

Quando analisado o número total de colônias CFU-G, observamos diferença significativa apenas entre os progenitores portadores de  $TET2^{G898X}$  e o controle. Portanto, observamos que a diferenças no número total das colônias granulocíticas foram identificadas tanto nos progenitores primitivos (dia 10), quanto nos progenitores sorteados o dia 14 (Figura 4.38.A e 4.39.A). Porém, não foi observada essa diferença na análise de proporção entre as colônias granulocíticas (Figura 4.38B, 4.40.B).

Observamos também um aumento significativo da formação de colônias multilinhagem (GEMM) entre os progenitores  $CALR^{ins5}/TET2^{WT}$  e o controle, tanto no número total de colônias quanto no cálculo das proporções de cada colônia. Já no caso dos progenitores  $CALR^{ins5}/TET2^{G898X}$ , unicamente na análise de proporção de colônias foi

identificado um aumento da formação das GEMM quando comparadas estas colônias com a população derivada dos progenitores  $CALR^{ins5}/TET2^{WT}$  (Figura 4.3 8A e 4.40B).



**Figura 4.40. Potencial clonogênico dos progenitores  $CD43^+CD34^+$  sorteados o dia 14.** Os progenitores (2.000 células/placa) foram plaqueados em metilcelulose. (A). O total de CFU mieloide formadas a partir dos progenitores sorteados o dia 14, derivados do paciente P4:  $CALR^{ins5}/TET2^{WT}$ ,  $CALR^{ins5}/TET2^{G898X}$  (*Mut*) e os controles ( $CALR^{WT}/TET2^{WT}$ ), foram quantificadas e identificado o tipo de colônia e subsequentemente, comparadas entre si (B). A proporção das colônias foi calculada como a porcentagem do número de cada tipo de colônia em relação ao total das colônias quantificadas correspondente às diferenciações de cada progenitor. Os dados estão mostrados com média  $\pm$  desvio padrão (DP) a partir de dois experimentos independentes em duplicata. A análise estatística foi analisada usando o 108 esto ne-way ANOVA com comparação múltipla de Tukey. O valor-p menor que 0.05 foi considerado estatisticamente significativo. N.s. valor não significativo.

Por outro lado, quando analisamos o total das colônias CFU-M diferenciadas dos progenitores  $CALR^{ins5}/TET2^{G898X}$  e dos progenitores  $CALR^{ins5}/TET2^{WT}$ , observamos, em ambos os casos, um aumento dessas colônias quando comparados ao controle. Observamos ainda a mesma diferença na análise das proporções das colônias (Figura 4.38A e 4.40B).

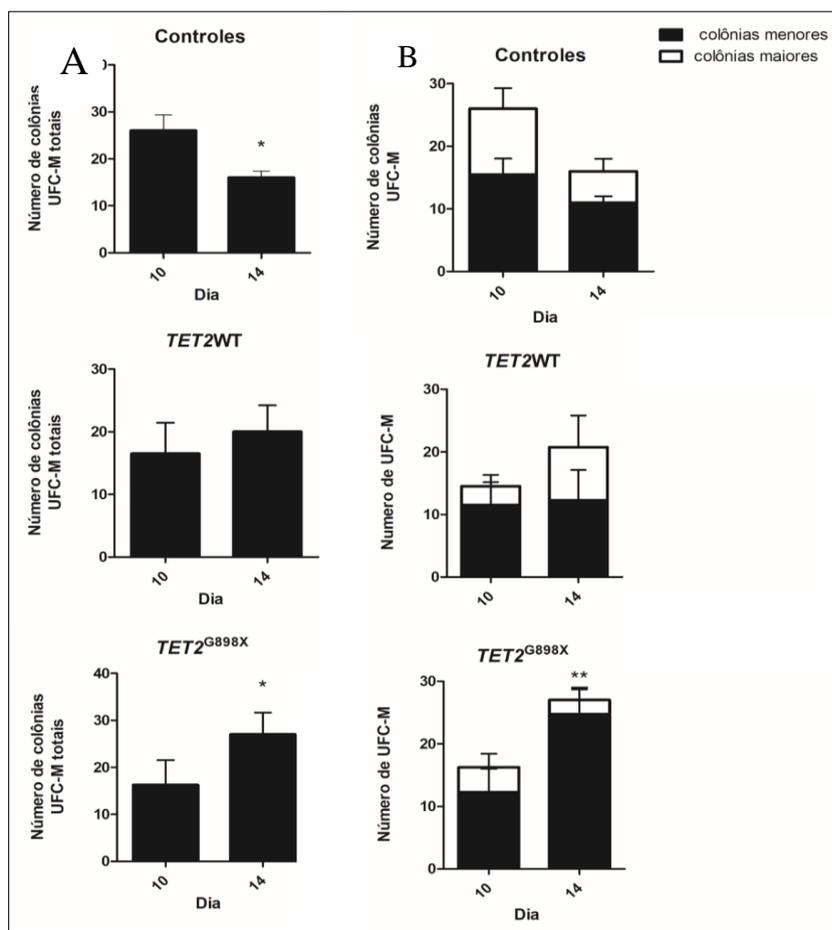
A partir dos mesmos resultados, uma nova análise estatística foi realizada visando entender se a mutação em  $TET2^{G898X}$  poderia influenciar tanto no número de formação de colônias CFU-M, quanto no tamanho das mesmas na cinética da diferenciação. Desse modo, foram comparados os resultados observados das colônias derivadas dos progenitores sorteados no dia 10 e 14.

A figura 4.41 mostra, na primeira coluna, a comparação do número total de colônias CFU-M formadas a partir dos progenitores sorteados no dia 10 e 14. Os progenitores controles diferenciados no dia 14 apresentaram uma diminuição do número de colônias CFU-M quando comparados com os progenitores primitivos. Já no caso dos progenitores  $CALR^{ins5}/TET2^{WT}$  não houve diferença significativa entre os progenitores dos diferentes dias. Por fim, nos progenitores portadores da mutação  $TET2^{G898X}$  observamos um aumento significativo do número de colônias CFU-M entre os progenitores do dia 10 e 14.

Desse modo, observamos que os progenitores controles com o tempo diminuem o número de colônias, fato que poderia estar associado à diminuição da autorrenovação dos mesmos. Conforme o tempo que o progenitor permanece em cultura e pela presença de citocinas, o mesmo diferencia em uma das linhagens mieloides. Porém, no caso dos progenitores  $TET2$  mutado observou-se um aumento do número das colônias CFU-M totais, sugerindo que  $TET2$  poderia dar uma vantagem no estado de autorrenovação dos progenitores sorteados no dia 14.

Nesse cenário, os resultados do número total de colônias CFU-M geradas nos diferentes dias foram discriminados entre os tamanhos menores ou maiores das colônias (figura 4.36). Tanto para os progenitores do controle e os derivados do paciente  $CALR^{ins5}/TET2^{WT}$ , quando analisados quanto aos tamanhos das colônias, observamos que não apresentavam diferença significativa entre os dias 10 e 14. Em contraste, pudemos verificar que, no caso dos progenitores  $TET2^{G898X}$ , houve um aumento das colônias menores comparando os progenitores sorteados os dias 10 e 14 (Figura 4.41, segunda coluna). Apesar de observar um aumento no número de colônias, não observamos aumento do tamanho das mesmas. Desse modo, poderíamos associar o tamanho das colônias com o potencial de proliferação desses progenitores. Portanto, no caso do  $TET2$  poderíamos sugerir que a mutação estaria influenciando no número de progenitores (aumento do número de colônias) porém não o potencial de proliferação (tamanhos menores das colônias).

Sugerimos assim que outros experimentos, como o repique de colônias CFU-M em múltiplas passagens, devem ser realizados para entender se  $TET2^{G898X}$  poderia estar influenciando no balanço entre a autorrenovação, a proliferação dos progenitores e a diferenciação daqueles progenitores na cinética de diferenciação.

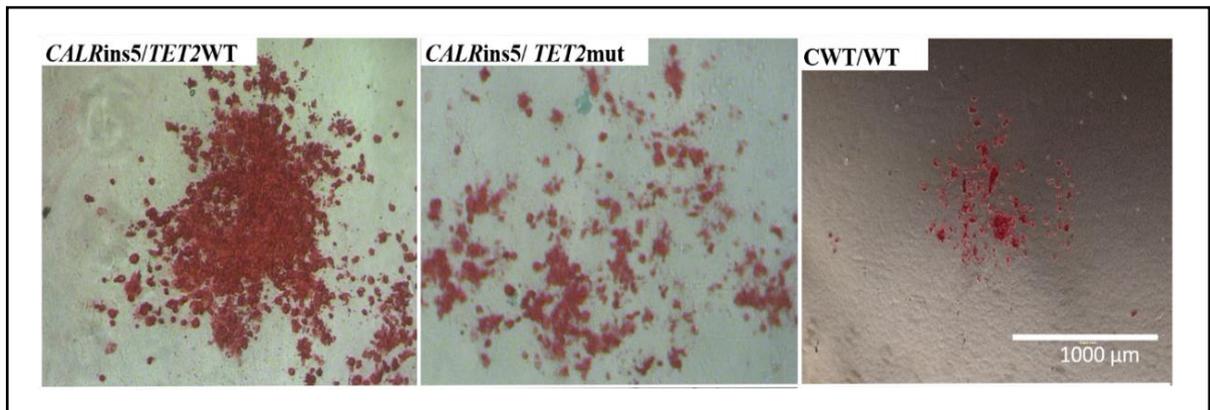


**Figura 4.41. Quantificação do número de colônias CFU-M derivadas dos progenitores CD43<sup>+</sup>CD34<sup>+</sup>.** Análise do número de colônias CFU-M totais diferenciadas a partir dos progenitores derivados do: controle, ou do paciente P4:  $CALR^{ins5}/TET2^{WT}$ ,  $CALR^{ins5}/TET2^{G898X}$  (primeira coluna, A). Análise das colônias CFU-M classificadas segundo o tamanho observado como colônias maiores ou menores (segunda coluna, B). A análise estatística foi realizada usando o test one-way ANOVA com comparação múltipla de Tukey. O p valor menor que 0.05 foi considerado estatisticamente significativo. n.s. valor não significativo, utilizando o software Prisma v5.0

#### 4.4.2.2. Avaliação da formação de CFU megacariocítica (CFU-MK)

Considerando que as alterações da linhagem megacariocítica são centrais na fisiopatologia da mielofibrose e que as mutações em *CALR* levam à ativação constitutiva de MPL, acreditamos ser de grande relevância o estudo do impacto da mutação  $CALR^{ins5}$  na capacidade de formação de colônias CFU-MK.

Em paralelo aos ensaios em metilcelulose, os progenitores CD43<sup>+</sup>CD34<sup>+</sup> sorteados nos dias 10 e dia 14 da diferenciação hematopoiética foram também plaqueados em meio semissólido enriquecido com fibrinogênio para avaliação do potencial CFU-MK. Imagens representativas das colônias CFU-MK encontradas estão apresentadas na figura 4.42.

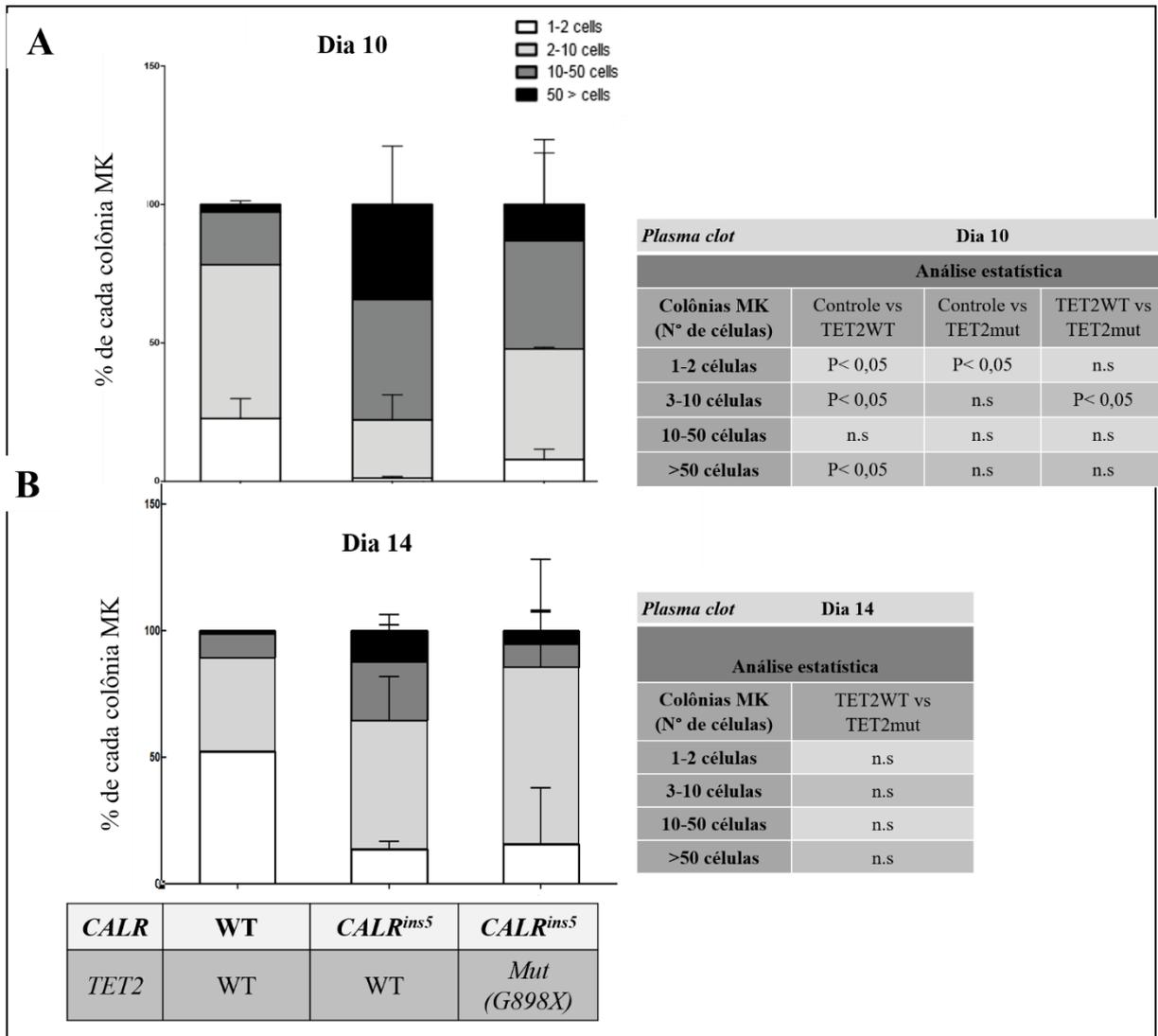


**Figura 4.42. Ensaio de coágulo de plasma a partir dos progenitores hematopoiéticos.** As unidades formadoras de colônia (CFU-MK) megacariocíticas foram imunomarcadas com o anticorpo anti-CD41a e identificadas pelo método colorimétrico com fosfatase alcalina (AP). As colônias CFU-MK que cresceram a partir dos progenitores foram quantificadas 9 dias após o plaqueamento. A imagem é representativa de colônias diferenciadas a partir de progenitores portadores de mutação  $CALR^{ins5}$ ,  $TET2^{G89X}$ ,  $CALR^{ins5}/TET2^{WT}$  e controle  $CALR^{WT}/TET2^{WT}$ , respectivamente. Todas as imagens foram adquiridas usando o microscópio invertido Evos XL Cell Imaging System. Barra: 1.000  $\mu\text{m}$ .

As figuras 4.43. A e B mostram os resultados obtidos da quantificação das colônias CFU-MKs a partir de progenitores  $CD43^+CD34^+$  sorteados nos dias 10 e 14 respectivamente. Para cada genótipo, foram efetuados experimentos independentes realizados cada um com dois clones diferentes, em duplicata. Com relação ao número total de CFU-MKs obtidas, não observamos diferença no total das colônias formadas quando comparados entre os três grupos de progenitores.

No caso dos progenitores  $CALR^{ins5}/TET2^{WT}$ , quando comparado com os controles estes apresentaram uma menor proporção dos agrupamentos de 3-10 células, porém verificou-se um aumento na proporção de colônias compostas por mais de 50 células. Essa diferença foi também observada quando comparamos os progenitores  $CALR^{ins5}/TET2^{WT}$  e  $CALR^{ins5}/TET2^{G898X}$ . Desse modo, a presença de  $TET2^{G898X}$  co-ocorrendo com  $CALR^{ins5}$  poderia não estar influenciando diretamente na diferenciação megacariocítica, que se mostrou incrementada nos progenitores portadores unicamente de mutações no gene  $CALR$ . Quando comparados os progenitores  $CALR^{ins5}/TET2^{G898X}$  e o controle não observamos diferença nas diferentes proporções de colônias.

Já no dia 14, não observamos diferença significativa no perfil de colônias MK geradas a partir de  $CALR^{ins5}/TET2^{WT}$  e  $CALR^{ins5}/TET2^{G898X}$ .



**Figure 4.43. Avaliação do potencial clonogênico dos progenitores CD43+CD34+.** Os progenitores CD43+CD34+ foram sorteados nos dias 10 e 14 e plaqueados em meio semissólido pela técnica de coágulo plasmático (A, B) para quantificação das colônias CFU-MK. As colônias foram marcadas usando anticorpo anti-CD14a e coradas com fosfatase alcalina. O número de colônias foi avaliado por microscopia no dia 9 após plaqueamento. Os dados estão apresentados com média  $\pm$  Desvio padrão a partir de dois experimentos independentes em duplicata. A análise estatística foi realizada pelo test one-way ANOVA com comparação múltipla de Tukey. O p valor menor que 0.05 foi considerado estatisticamente significativo. n.s. valor não significativo, utilizando o software Prisma v5.0.

#### 4.4.3. Diferenciação granulocítica a partir da iPSCs

No presente projeto, foi proposto como um dos objetivos avaliar as alterações epigenéticas e de expressão gênica dos granulócitos primários isolados dos pacientes e comparar com os granulócitos diferenciados *in vitro* a partir das iPSCs derivadas dos

pacientes. Desse modo, utilizamos o mesmo sistema de diferenciação *in vitro* feeder free para gerar granulócitos a partir de iPSC em três etapas.

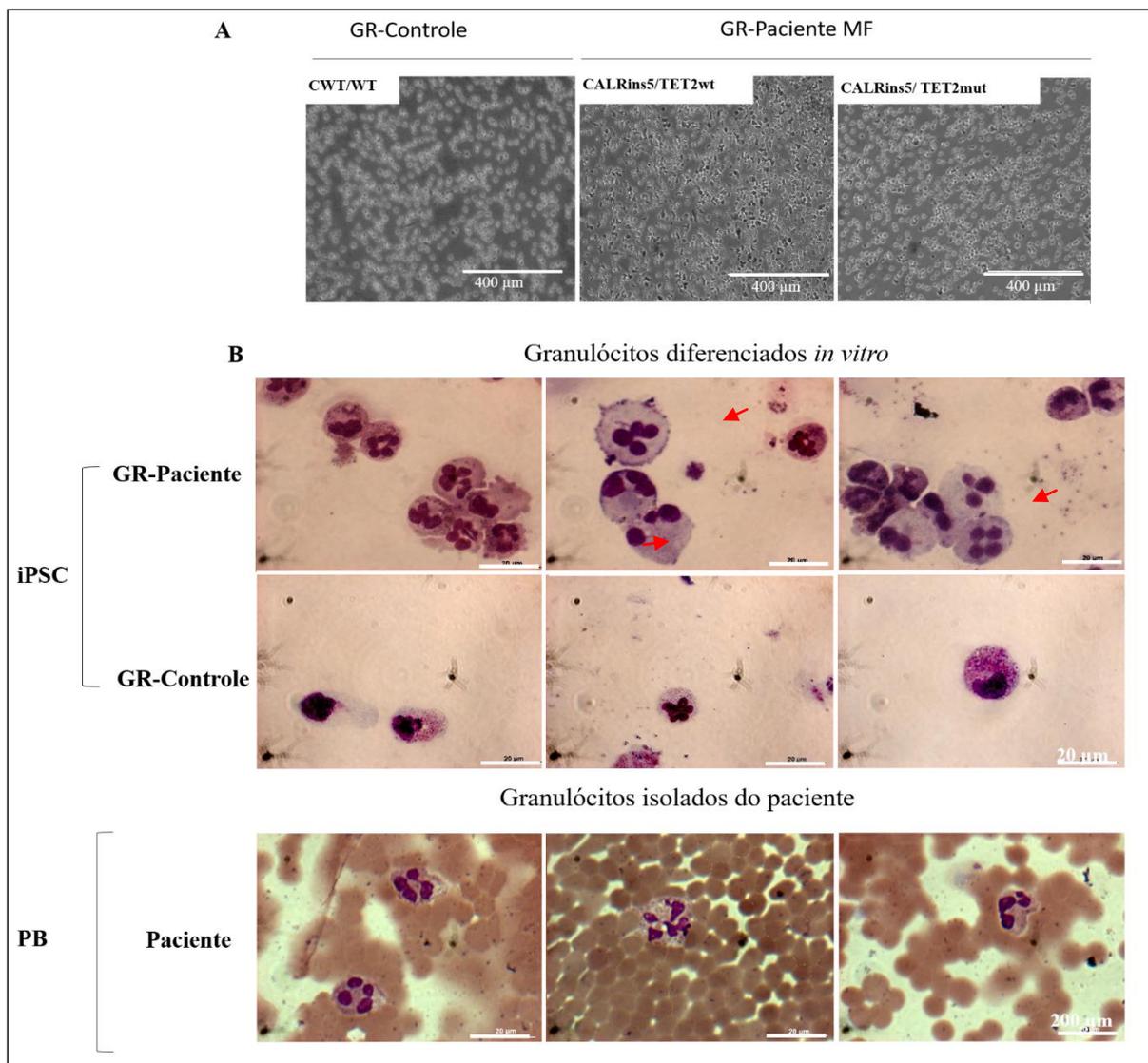
A etapa (1) consiste da diferenciação das iPSCs para geração dos progenitores hematopoiéticos, como descrito anteriormente.

No dia 10 começa a etapa (2), que corresponde à indução da diferenciação desses progenitores para a linhagem granulocítica, seguido de uma curta expansão dos granulócitos. O processo é acompanhado até o dia 15 em presença das citocinas IL-3, SCF e G-CSF.

Por fim, na etapa (3), as células em suspensão são colhidas do poço original e transferidas para um novo poço. Nessa etapa as células são induzidas à diferenciação definitiva para estágios mais maduros.

Com relação à cinética da granulopoiese, observamos uma heterogeneidade das células obtidas, incluindo as células maduras: neutrófilos, eosinófilos e basófilos. A Figura 4.44 A é ilustrativa dos granulócitos gerados *in vitro*, entre os dias 20 e 25, diferenciados a partir dos progenitores  $CALR^{ins5}/TET2^{G898X}$ ,  $CALR^{ins5}/TET2^{WT}$ , assim como os controles  $CALR^{WT}/TET2^{WT}$ .

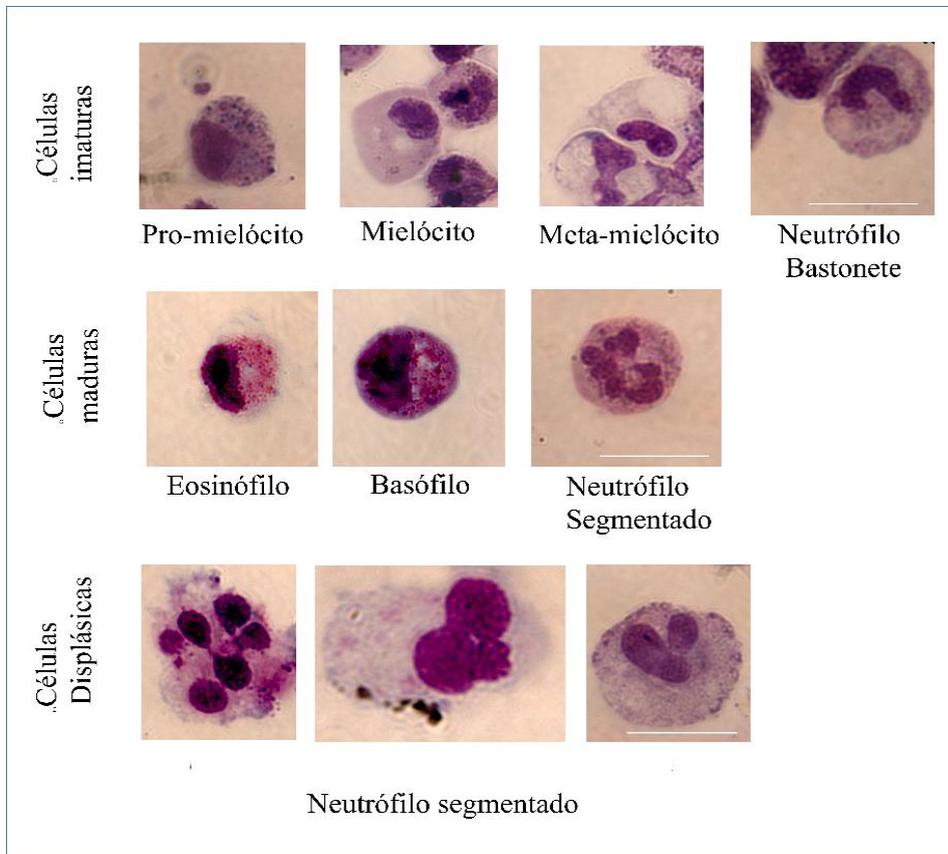
Observou-se um tamanho maior dos granulócitos derivados dos progenitores  $CALR^{ins5}/TET2^{G898X}$  e  $CALR^{ins5}/TET2^{WT}$ , quando comparados com o controle. Comparando-se a morfologia desses granulócitos diferenciados *in vitro* (Figura 4.44 B) pudemos observar que os granulócitos derivados do paciente P4 apresentaram um fenótipo com características displásicas (setas vermelhas) quando comparados aos granulócitos derivados dos progenitores controle. A mesma alteração morfológica pode ser observada em granulócitos primários coletados a partir do sangue periférico de um paciente com MF (selecionado de maneira aleatória entre os pacientes da coorte, como explicado anteriormente).



**Figura 4.44. Diferenciação *in vitro* de granulócitos.** A. Granulócitos diferenciados a partir das linhagens iPSC derivadas do paciente P4 em meio suplementado com G-CSF, IL-3 e SCF. B. Granulócitos derivados das iPSCMF.P4 mantidos em cultura até o dia 30 da diferenciação (acima). Granulócitos isolados de pacientes com MF e do controle (abaixo). Morfologia avaliada pelo método de coloração de May-Grünwald-Giemsa. As imagens foram adquiridas usando o microscópio Axioakop 40 (Carl Zeiss Microscopy, LLC, DA) e analisadas com o AxioVision LE 4.8.1 Microscopy Software. A barra corresponde a 20 µm.

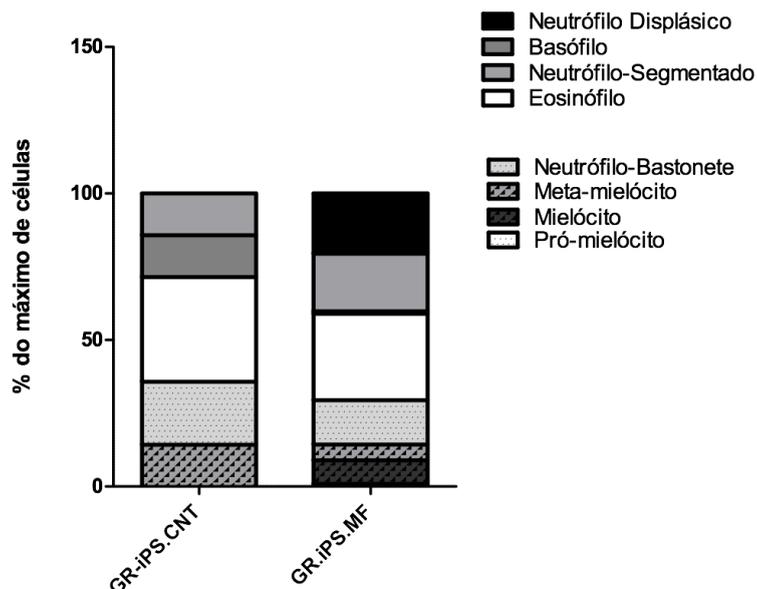
Nesse contexto, com o objetivo de analisar a população heterogênea das células granulocíticas e quantificá-las, foram analisadas 30 imagens e identificados os tipos de granulócitos nos diferentes estágios da diferenciação granulocítica. A cinética de diferenciação inclui estágios mais primitivos correspondentes aos observados na embriogênese. Os tipos de células observadas foram divididos em dois grupos: as que pertencem aos estágios mais imaturos, como os prómielócitos, mielócitos, metamielócitos e neutrófilos bastonetes e aquelas do segundo grupo, correspondente às células em estágios mais maduros, como neutrófilos segmentados, eosinófilos e basófilos. A população heterogênea dos granulócitos encontra-se representada na Figura 4.45 Um terceiro grupo de

células foi identificado unicamente nos granulócitos derivados do paciente P4, células cujas características morfológicas são similares às de pacientes com mielodisplasia. Na análise das imagens observamos principalmente a alteração na linhagem neutrofilica.



**Figura 4.45. Morfologia dos granulócitos diferenciados *in vitro* nos diferentes estágios da granulopoiese.** Imagens representativas dos granulócitos nos estágios precoces e mais avançados da diferenciação *in vitro* a partir das iPSC derivadas do paciente e de um controle. As imagens das células displásicas correspondem unicamente aos granulócitos derivados das iPS.PMF4. Após citospin, as células foram coradas pelo método de May-Grünwald-Giemsa para análise da morfologia. As imagens foram adquiridas usando o microscópio Axioakop 40 (Carl Zeiss Microscopy, LLC, DA) e analisadas com o AxioVision LE 4.8.1 Microscopy Software. A barra corresponde a 20 µm.

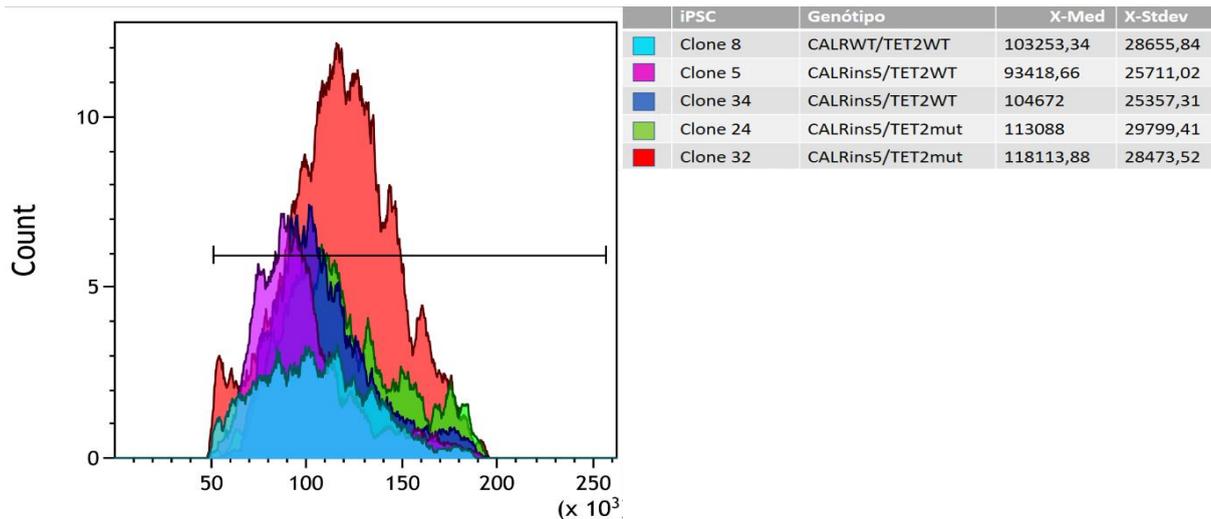
Além disso, os diferentes tipos de células identificados na população heterogênea dos granulócitos foram quantificados, comparando-se aqueles derivados dos progenitores do paciente e do controle. As proporções das diferentes células que compõe os granulócitos estão representadas na figura 4.46.



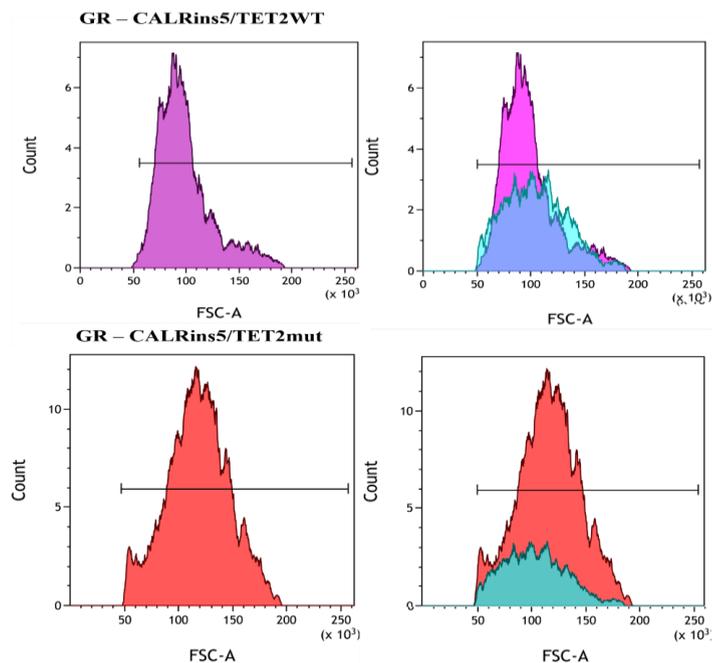
**Figura 4.46. Quantificação das células que pertencem à população de granulócitos diferenciados *in vitro* a partir dos progenitores derivados das diferentes iPSCs.** Baseados nas características morfológicas correspondentes a cada tipo celular, as células foram quantificadas utilizando o método de coloração May-Grünwald-Giemsa para análise da morfologia. A porcentagem foi calculada a partir do número de cada tipo de célula em função do número total da população analisada. Nesse experimento 35 imagens foram quantificadas tanto nas células derivadas do controle quanto do paciente. As imagens foram adquiridas e contadas usando o microscópio Axioskop 40 (Calr Ziezz Microscopy, LLC, DA) e analisadas com o AxioVision LE 4.8.1 Microscopy Software.

Para complementar a caracterização, a imunofenotipagem de todos os granulócitos foi realizada por citometria de fluxo e dois tipos de análises foram realizados. Considerando a população displásica identificada morfológicamente, comparamos os tamanhos das células (FSC-A) na população de granulócitos CD14<sup>+</sup>/CD15<sup>+</sup>, nomeada população GR (Figura 4.50).

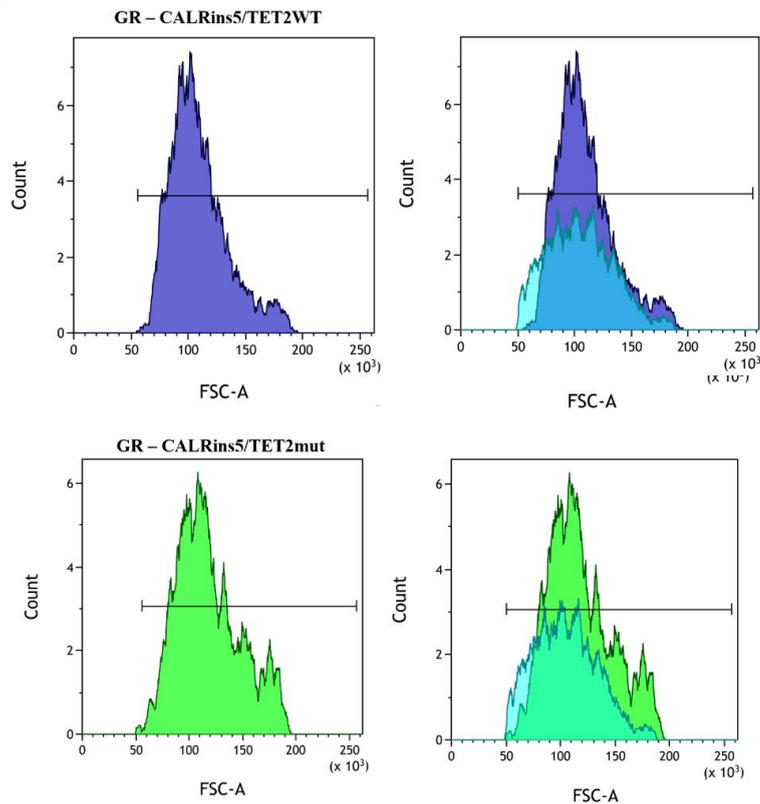
Para uma melhor compreensão, na figura 4.47 foram comparados os tamanhos de todos os GRs derivados das iPSC do paciente P4. Considerando que avaliamos um par que corresponde aos genótipos  $CALR^{ins5}/TET2^{WT}$  e outro que corresponde aos GRs cujo genótipo é  $CALR^{ins5}/TET2^{G898X}$ . Em conjunto comparamos os GR derivados de uma iPSC controle. Além disso, na figura 4.48 e 4.49 comparamos individualmente um grupo de granulócitos (acima GR (CALR<sup>ins5</sup>/TET2<sup>WT</sup>) e embaixo GR (CALR<sup>ins5</sup>/TET2<sup>WT</sup>)).



**Figure 4.47. A. Comparação do tamanho dos granulócitos (GR) diferenciados *in vitro* correspondentes a cada genótipo das iPSCs derivadas dos pacientes com MF e um controle.** Todas as citometrias de fluxo foram analisadas dentro da população CD14<sup>+</sup>/CD15<sup>+</sup>. Duas populações de granulócitos derivadas das iP.S.MFP4 *CALR*<sup>ins5</sup> e iP.S.MFP4 *CALR*<sup>ins5</sup> /*TET2*<sup>G898X</sup> foram comparadas entre si baseadas no FSC-A. Nessa comparação foram incluídos os granulócitos derivados do controle. Do lado direito encontra-se descrita a legenda correspondente aos genótipos dos granulócitos e os valores estatísticos relativos à média e desvio padrão (DP). As análises foram realizadas usando o citômetro de fluxo CANTO XI BD Bioscience e os dados analisados com o software Kaluza v 5.1.



**Figure 4.48. A. Comparação do tamanho do primeiro grupo de granulócitos diferenciados *in vitro* a partir dos clones iPSCs 5 e 32 derivados do paciente P4.** Todas as citometrias foram analisadas dentro da população CD14<sup>+</sup>/CD15<sup>+</sup>. Os granulócitos derivados do clone 5 (*CALR*<sup>ins5</sup>/*TET2*<sup>WT</sup>) (acima) e clone 32 (*CALR*<sup>ins5</sup>/*TET2*<sup>G898X</sup>) (abaixo) foram comparados entre si baseados no FSC-A. Nessa comparação foram adicionados os granulócitos derivados do controle. As citometrias foram realizadas usando o citômetro de fluxo CANTO XI BD Bioscience e os dados analisados com o software Kaluza v 5.1.



**Figure 4.49. A.** Comparação do tamanho do primeiro grupo de granulócitos diferenciados *in vitro* a partir dos clones iPSCs 34 e 24 derivados do paciente P4. Todas as análises por citometria foram analisadas dentro da população CD14<sup>+</sup>/CD15<sup>+</sup>. Os granulócitos derivados do clone 34 ( $CALR^{ins5}/TET2^{WT}$ ) (em cima) e clone 24 ( $CALR^{ins5}/TET2^{G898X}$ ) (embaixo) foram comparados entre si baseados no FSC-A. Nessa comparação foram adicionados os granulócitos derivados do controle. As citometrias de fluxo foram realizadas usando o citômetro de fluxo CANTO XI BD Bioscience e os dados analisados com o software Kaluza v 5.1.

Após a análise estatística não observamos diferença significativa entre as populações dos granulócitos derivados das iPSC do paciente P4, assim como do controle.

Dando continuidade à caracterização dos granulócitos diferenciados *in vitro*, a segunda análise realizada foi a imunofenotipagem dos mesmos utilizando os marcadores de superfície específicos para tal população. Entre esses marcadores foram selecionados CD15 e CD11b (granulócitos). O marcador CD14 foi utilizado primeiramente com o intuito de discriminar entre a população monocítica e granulocítica, porém, esse marcador está presente nas células primárias neutrofílicas, assim como nos granulócitos diferenciados *in vitro* a partir de iPSCs. O marcador CD43 é utilizado para identificar as células maduras da linhagem hematopoiética diferenciada *in vitro*. Outro marcador de interesse foi o CD45, expresso granulócitos maduros, porém não facilmente identificado em células diferenciadas *in vitro*.

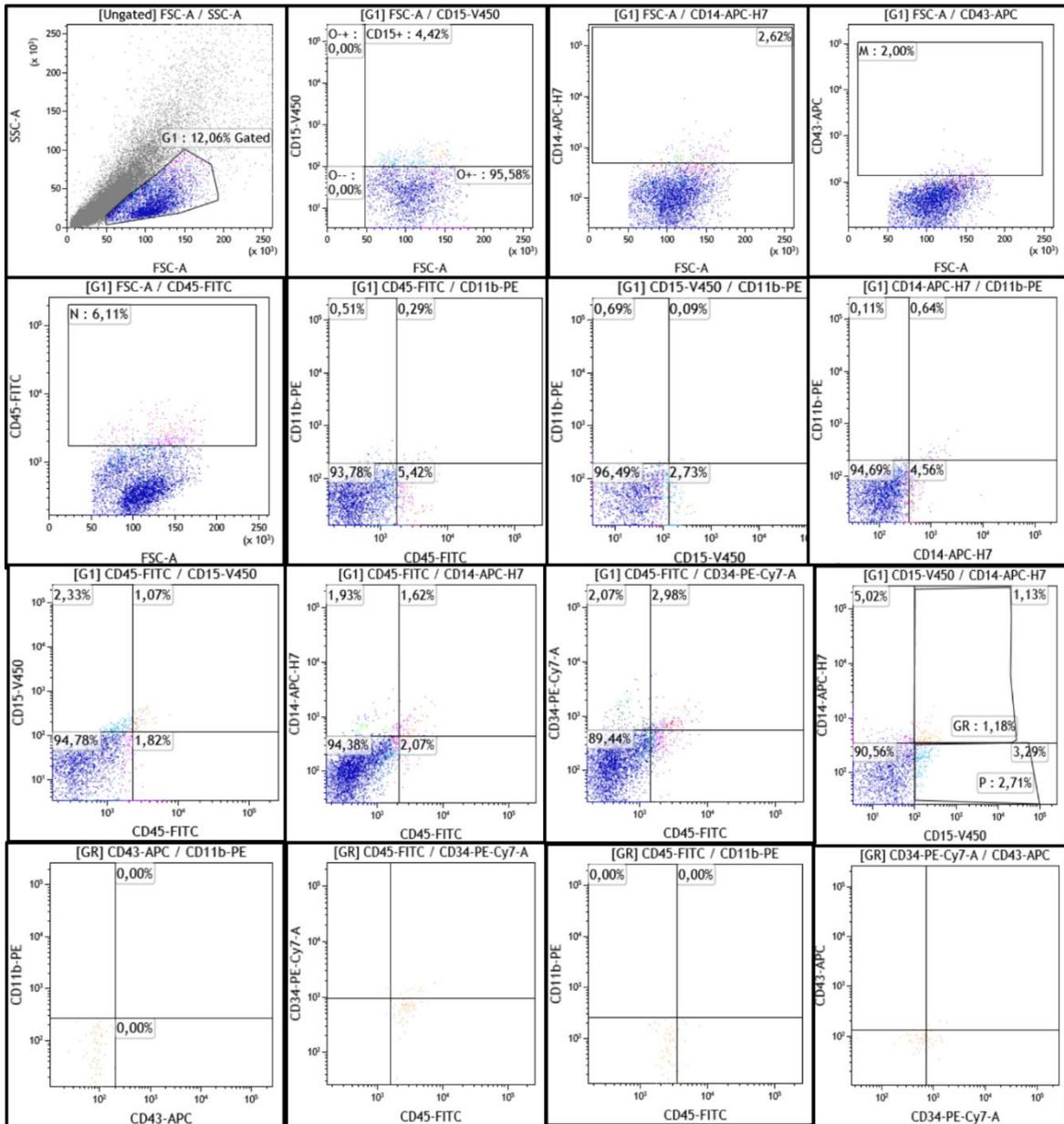
Nas figuras 4.50 e 4.53 estão representados os resultados das análises por citometria de fluxo. Na primeira figura encontra-se a análise do controle negativo (sem marcação, com anticorpo) de marcação para todos os marcadores seguido da análise correspondente aos

granulócitos diferenciados *in vitro* da iPSC controle. Por fim, as duas últimas análises correspondem aos granulócitos derivados das iPSC.MFP4  $CALR^{ins5}/TET2^{WT}$  e iPSC.MFP4  $CALR^{ins5}/TET2^{G898X}$ . No anexo 8 encontra-se a análise das citometrias dos granulócitos correspondentes ao clone 24 ( $CALR^{ins5}/TET2^{G898X}$ ) e clone 34 ( $CALR^{ins5}/TET2^{WT}$ ).

As análises foram organizadas da seguinte maneira: em primeiro lugar foram colocadas as marcações únicas (single), na ordem: CD15, CD14, CD43 e CD45. Posteriormente, analisamos as duplas marcações dos antígenos de superfície: CD11b/CD45, CD11b/CD15, CD11b/CD14 e CD14/CD15. Após estas análises, a partir da população positiva para a dupla marcação CD14/CD15 (nomeada GR), foram analisadas as duplas marcações CD11b/CD43 e CD11b/CD45.

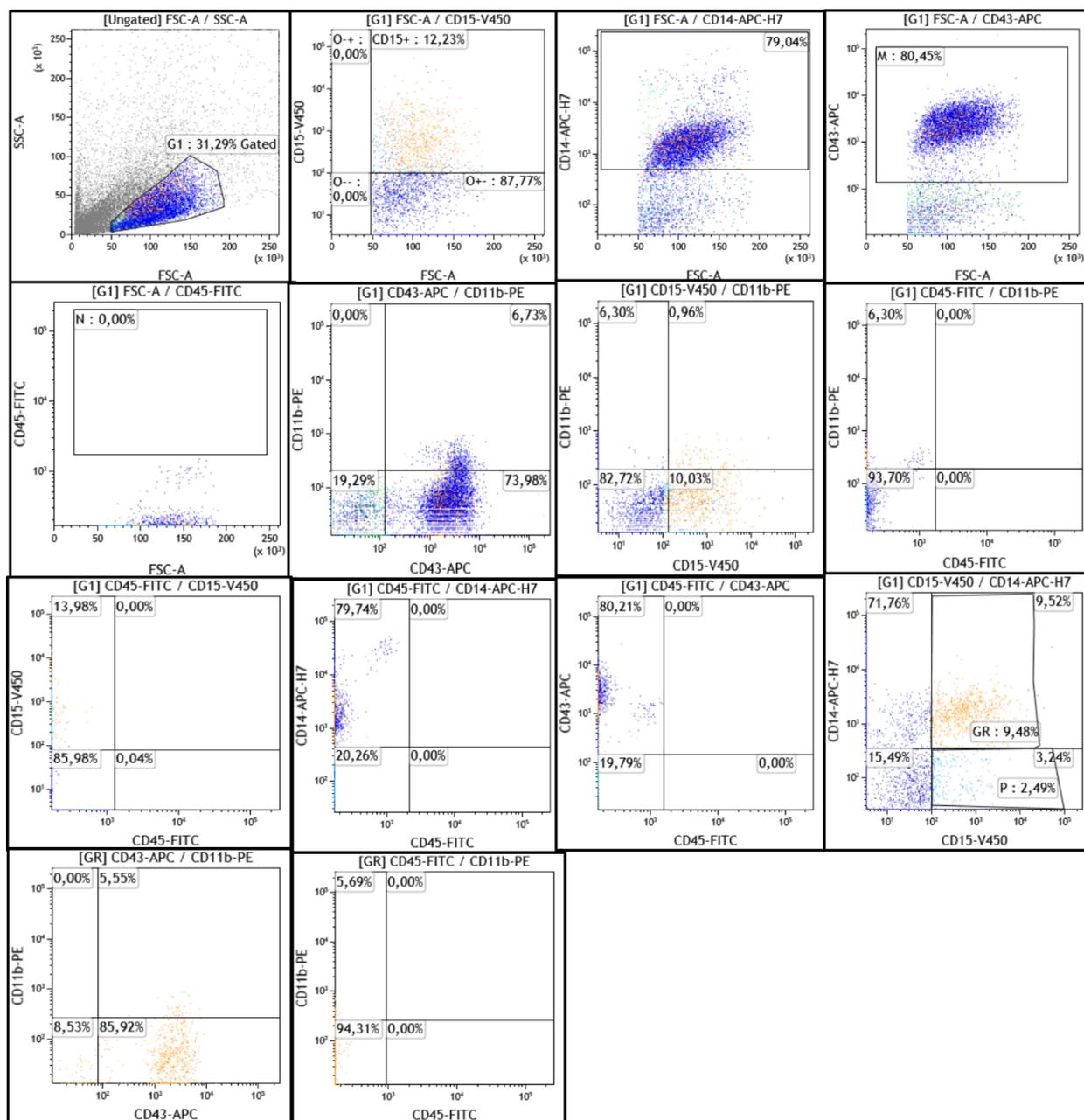
Em todos os casos as células foram positivas para a marcação single de CD15, CD11b, CD14 e CD43, identificadas em diferentes porcentagens nas diferentes amostras. Não observamos marcação para CD45 e CD34. Em todos os granulócitos derivados do paciente identificamos a dupla marcação CD14/CD15. A população GR também foi identificada no controle, porém, menos prevalente. As avaliações foram feitas entre os dias 25 e 30 da diferenciação dos granulócitos.

Negative control

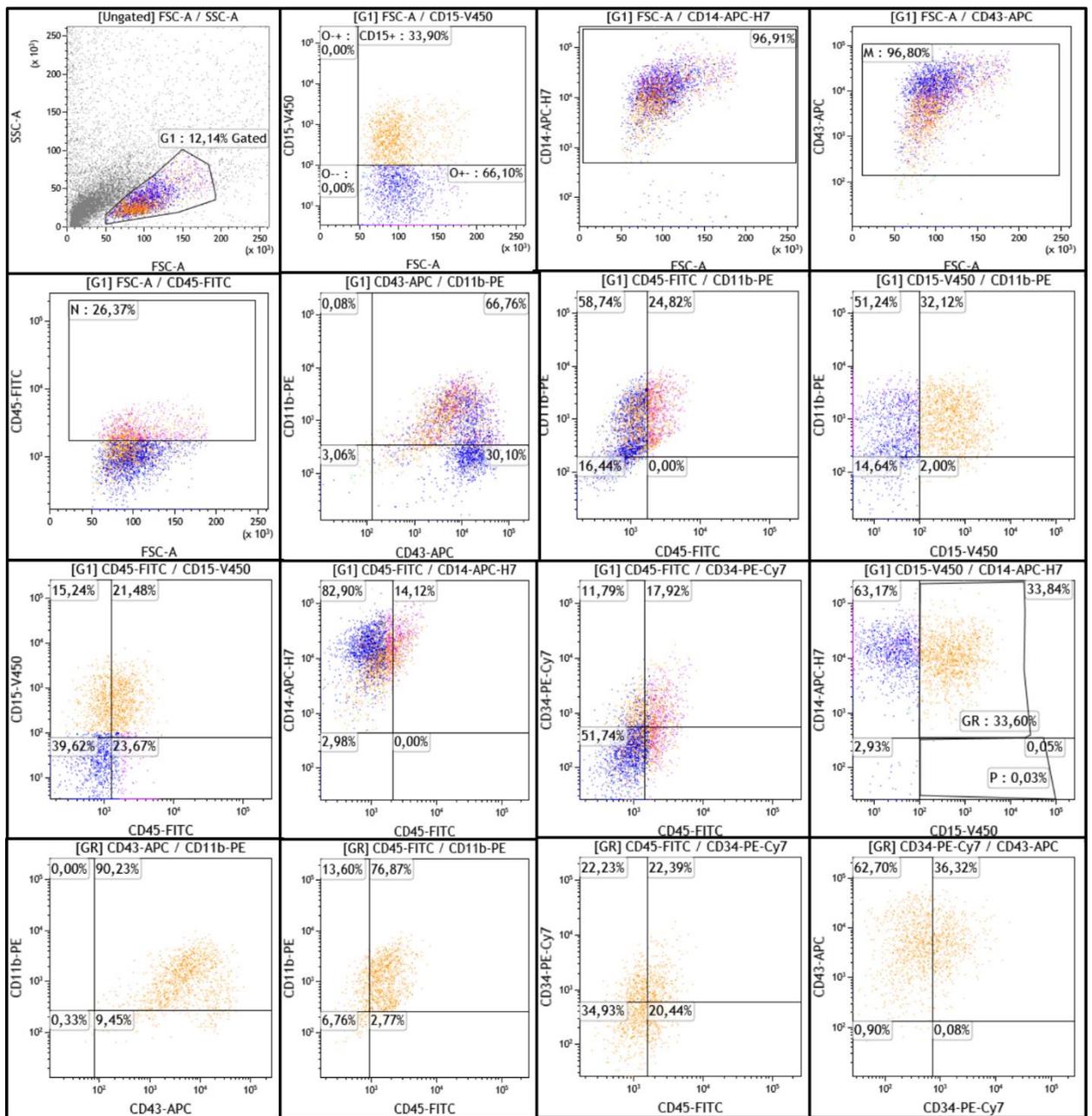


**Figure 4.50. Imunofenotipagem dos granulócitos diferenciados *in vitro*- Controle negativo.** A análise das marcações foi dividida na marcação single (CD15, CD14, CD43, CD45), seguido da análise da dupla marcação (CD15/CD45, CD14/CD45, CD34/CD45). Após a análise da dupla marcação CD14+/CD15+ foram marcadas as células com: CD11/CD43, CD34/CD45, CD11b, CD45, CD43/CD34). As análises por citometria foram realizadas no citômetro de fluxo CANTO XI BD Bioscience e os dados analisados com o software Kaluza v 5.1.

GR - iPS.Control Clone 8 (CALRWT/TET2WT)

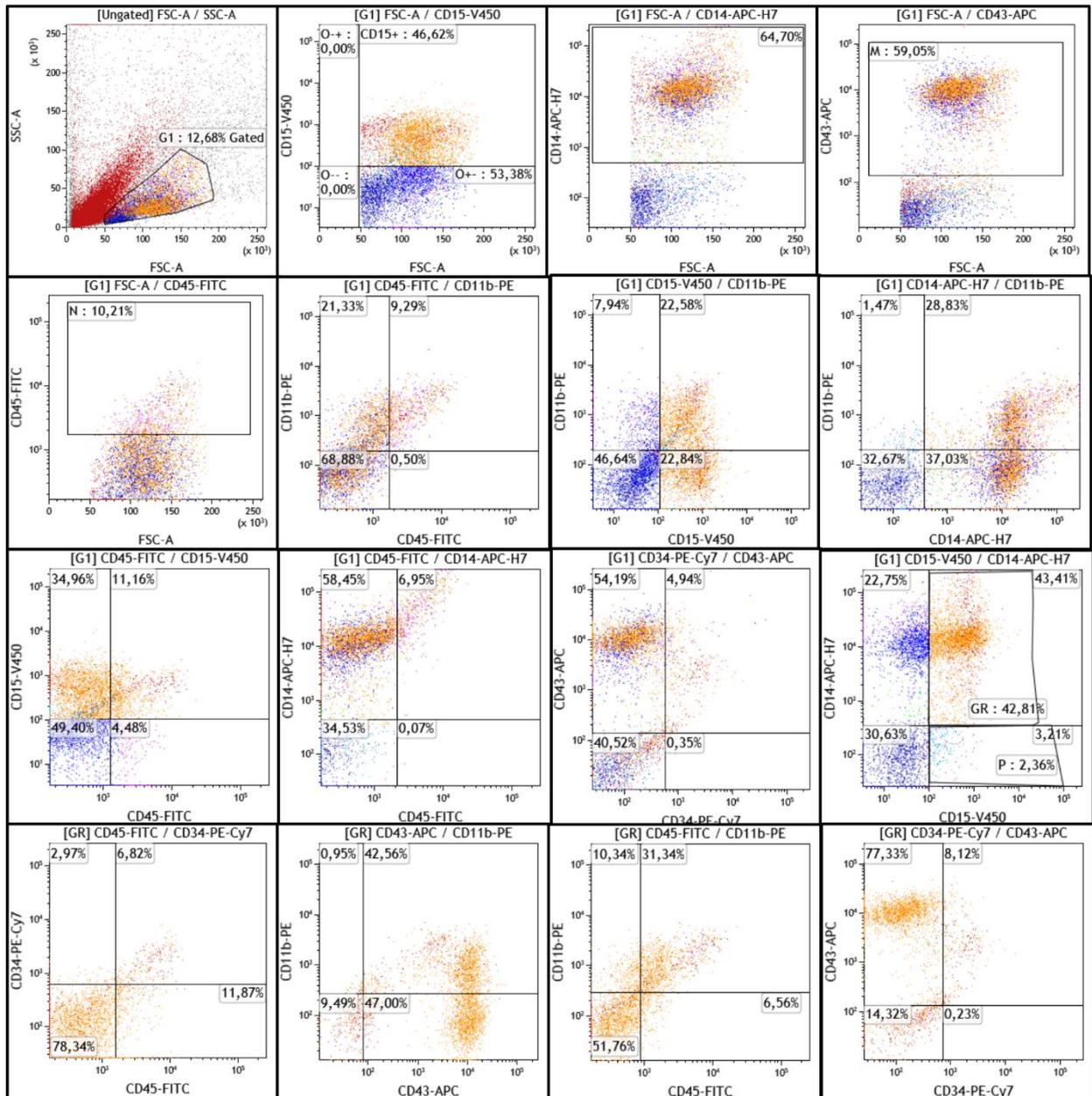


**Figura 4.51. Imunofenotipagem dos granulócitos (GR) diferenciados *in vitro***-dos progenitores derivados do controle (*CALR<sup>WT</sup>/TET2<sup>WT</sup>*). A análise das marcações foi dividida na marcação *single* (CD15, CD14, CD43, CD45), seguida da análise de dupla marcação (CD11/CD43, CD11b/CD15, CD11b/CD45, CD15/CD45, CD14/CD45, CD43/CD45, CD14/CD15). Dentro da população CD14+/CD15+ foram analisadas as populações positivas para CD11/CD43, CD11b/CD15, CD11b/CD43, CD11b/CD45). As análises por citometria foram realizadas no citômetro de fluxo CANTO XI BD Bioscience e os dados analisados com o software Kaluza v 5.1.



**Figure 4.52. Imunofenotipagem dos granulócitos (GR) diferenciados *in vitro* dos progenitores derivados do paciente P4 ( $CALR^{ins5}/TET2^{WT}$ ). A análise das marcações foi dividida na marcação *single* (CD15, CD14, CD43, CD45), seguida da análise de dupla marcação (CD11/CD43, CD11b/CD15, CD11b/CD45, CD15/CD45, CD14/CD45, CD43/CD45, CD14/CD15). Dentro da população CD14<sup>+</sup>/CD15<sup>+</sup> foram analisadas as populações positivas para CD11/CD43, CD11b/CD15, CD11b/CD43, CD11b/CD45). As análises por citometria foram realizadas no citômetro de fluxo CANTO XI BD Bioscience e os dados analisados com o software Kaluza v 5.1.**

GR - iPS.PMF. Clone 32 (CALRins5/TET2mut)



**Figure 4.53. Imunofenotipagem dos granulócitos (GR) diferenciados in vitro-dos progenitores derivados do paciente P4 ( $CALR^{ins5}/TET2^{G898X}$ ).** A análise das marcações foi dividida na marcação single (CD15, CD14, CD43, CD45), seguida da análise de dupla marcação (CD11/CD43, CD11b/CD15, CD11b/CD45, CD15/CD45, CD14/CD45, CD43/CD45, CD14/CD15). Dentro da população CD14+/CD15+ foram analisadas as populações positivas para CD11/CD43, CD11b/CD15, CD11b/CD43, CD11b/CD45). As análises por citometria foram realizadas no citômetro de fluxo CANTO XI BD Bioscience e os dados analisados com o software Kaluza v 5.1.

A tabela 4.11 resume o perfil da imunexpressão dos marcadores selecionados para a avaliação do fenótipo dos granulócitos, cuja análise foi apresentada nas figuras 4.52-4.56. A presente tabela contém as informações dos genótipos de cada um dos granulócitos derivadas das iPSCs do paciente. Na quarta coluna estão apresentados os valores SSC vs FSC (também nomeada população G1). Nas últimas colunas estão descritos os valores relativos às duplas marcações que foram analisadas dentro da população dupla positiva CD14<sup>+</sup>/CD15<sup>+</sup> (GR).

**Tabela 4.10. Imunofenotipagem da população de GR diferenciados *in vitro* a partir do P4.** As células foram analisadas por citometria de fluxo usando os anticorpos CD14, CD15, CD11b and CD43.

Granulócitos derivados <i>in vitro</i>	Fenótipo	Genótipo	População (%)	Marcadores específicos			
				SSC vs FSC	Gate dentro G1	Gate dentro G1	Gate dentro de CD14 <sup>+</sup> /CD15 <sup>+</sup> População GR
			% da população G1	CD15+ (%)	CD14 <sup>+</sup> /CD15 <sup>+</sup> (%)	CD11b <sup>+</sup> /CD43 <sup>+</sup> (%)	CD11b <sup>+</sup> /CD45 <sup>+</sup> (%)
<i>GR-iPS.clone 5</i>	MF	<i>CALR<sup>ins5</sup>/TET2<sup>WT</sup></i>	11,13	32,98	34,17	90,02	76,07
<i>GR-iPS.clone34</i>	MF	<i>CALR<sup>ins5</sup>/TET2<sup>WT</sup></i>	26	50,67	54,03	88,31	64,77
<i>GR-iPS.clone24</i>	MF	<i>CALR<sup>ins5</sup>/TET2<sup>mut</sup></i>	16,17	56,73	59,50	87,25	80,52
<i>GR-iPS.clone32</i>	MF	<i>CALR<sup>ins5</sup>/TET2<sup>mut</sup></i>	9,22	55,23	53,19	43,63	31,65
<i>GR-iPS.clone8</i>	Doador	<i>CALR<sup>WT</sup>/TET2<sup>WT</sup></i>	31,2	12,23	9,48	85	0

Uma vez confirmado que geramos granulócitos a partir das iPSCs vamos investigar o impacto da mutação em *TET2<sup>G898X</sup>* no perfil epigenético dos GR-iPS.MF WT usado em todos os experimentos como um controle interno das células dos pacientes, junto com os GR derivados das iPS controles e os GR primários isolados do paciente P4.

## 5. DISCUSSÃO

As neoplasias mieloproliferativas BCR-ABL negativas compartilham características clínicas e moleculares em comum, porém cada uma delas, TE, PV e MF apresenta fenótipos característicos. A MF, dentro do grupo das neoplasias mieloproliferativas clássicas, é apontada como mais agressiva, sendo dividida nas fases pré-fibrótica e fibrótica. A MF está envolvida primariamente com o aumento da linhagem megacariocítica, granulocítica e, em estágios mais avançados, se observa aumento da fibrose medular (CAMPOS *et al.*, 2016). Tanto PV quanto TE podem evoluir para MF secundária (Pós-PV/ET MF) e, por sua vez, 20% dos pacientes com MF podem transformar para leucemia mieloide aguda (LMA) (CERVANTES *et al.*, 2009).

Essas doenças são de natureza clonal, originadas a partir de células tronco-hematopoiéticas, que carregam mutações *driver* nos genes *JAK2*, *CALR* e *MPL*, sendo estas em geral mutuamente exclusivas e subjacentes ao fenótipo mieloproliferativo (RUMI *et al.*, 2014, TEFFERI *et al.*, 2015). Além desses genes, a paisagem genética na MF é caracterizada pela presença, em grande parte dos pacientes, de mutações adicionais, em genes reguladores epigenéticos, de *splicing*, fatores de transcrição, entre outros. Nesse grupo de mutações adicionais estão aquelas que acometem os genes reguladores epigenéticos *IDH1/2*, *TET2*, *ASXL1*, *DNMT3A*, *EZH2* e o gene supressor tumoral *TP53*.

O presente projeto teve como objetivo explorar essa diversidade clonal da MF e, usando a tecnologia das iPSC, criar modelos *in vitro* para o estudo do papel dessas mutações somáticas, tanto no processo de reprogramação quanto na hematopoiese.

Na primeira etapa do trabalho, foram selecionados para reprogramação celular 6 pacientes com MF, portadores de mutações somáticas de interesse. A seleção foi baseada em dados prévios obtidos do perfil mutacional de uma coorte de 37 pacientes com MF. As mutações encontradas por NGS nos pacientes escolhidos foram revalidadas usando o método de sequenciamento de Sanger. Desse modo, observamos que os pacientes P1, P2 e P5 são portadores da mutação *driver* *JAK2*<sup>V617F</sup> (c.1849 G>T, p.V617F). Já os pacientes P3 e P4 carregam uma inserção de 5pb no gene *CALR* (c.1154\_1155insTTGTC, k385fs\*47). Por fim, o paciente P6 apresenta uma deleção de 52 pb no gene da *CALR*<sup>del52</sup> (c.1092\_1143del; L367fs\*46). Em todos os casos, com exceção do paciente P1, foram identificadas mutações somáticas adicionais em genes reguladores epigenéticos como *IDH1*, *TET2*, *ASXL1* ou associados à transformação leucêmica como o gene *TP53*.

Para caracterização molecular foram usadas amostras de granulócitos primários desses pacientes, células que podem se originar de uma célula tronco hematopoiética mutada ou normal. Desse modo, a heterogeneidade genética identificada nos granulócitos de um paciente

com MF reflete uma mistura de populações que incluem as células normais (WT), o clone NMP dominante e/ou subclones selecionados ao longo evolução clonal da doença. Em função dessa diversidade de populações, a carga alélica das mutações pode variar, sendo experimentalmente medida pelo número de vezes que o alelo mutado é quantificado relativo ao número total de cópias sequenciadas (Figura 5.1).

Quando analisados os diferentes valores da carga alélica da mutação  $JAK2^{V617F}$  nos pacientes P1, P2 e P5, observamos valores em torno de 100% para P1 e cerca de 50% para P2 e P5. Considerando que cada célula seja portadora de dois alelos, quando a carga alélica é maior do que 50% infere-se que a mutação esteja presente em homozigose, ao menos em parte das células. Embora  $JAK2^{V617F}$  tenha sido apontada como uma mutação *driver*, não é obrigatoriamente um evento inicial, e eventos prévios, como a aquisição de mutações em genes reguladores epigenéticos, têm sido relatados.

Lunderberg e colegas caracterizaram uma coorte de 197 pacientes com NMPs por NGS para traçar o panorama genômico dessas amostras, cujas mutações foram posteriormente revalidadas por sequenciamento clássico de Sanger. Em paralelo, foram realizados ensaios de formação de colônias hematopoiéticas a partir de PBMC de 33 pacientes e *screening* das mutações por PCR alelo específico e sequenciamento de Sanger. Em alguns casos foram analisadas mais de uma amostra por paciente. Assim, os autores puderam identificar combinações de mutações presentes em um mesmo clone e com isso determinará a ordem de aquisição das mutações, traçando uma possível arquitetura clonal de cada paciente.

A arquitetura clonal de 8 pacientes foi estudada em função desses resultados. Em alguns pacientes observou-se a coexistência de subclones pré- $JAK2$  portadores de mutações em genes reguladores epigenéticos como *TET2*. Em outros pacientes, que carregam mutações em *CALR*, foram identificadas mutações posteriores à aquisição da mutação *driver*. Por outro lado, em alguns casos foi sugerido que os pacientes poderiam apresentar uma estrutura biclonal onde um clone poderia ter sido originário de uma mutação em um regulador epigenético e outro portador de uma mutação *driver* no gene *JAK2*. Portanto, os pacientes analisados mostraram diferentes arquiteturas clonais baseadas na identificação da ordem das mutações e na identificação dos clones *driver* expandidos nos diferentes estágios da doença (LUNDBERG *et al.*, 2014).

Nesse sentido, um trabalho recente estudou o impacto da arquitetura clonal na biologia das células tronco/ progenitoras  $CD34^+$  sejam na proliferação dos progenitores, como nos fenótipos observados na formação das colônias hematopoiéticas derivadas desses progenitores. Nesses ensaios, foram comparadas células obtidas de pacientes com NMP clássicas duplamente mutadas *TET2/JAK2*, com duas diferentes arquiteturas: aquelas em que

mutações no gene de *TET2* ocorreram primeiro e aquelas em que a mutação no gene *JAK2* ocorreu primeiro. Este estudo demonstrou que, além da biologia dos progenitores, certas características clínicas e a resposta a tratamento como o ruxolitinib poderiam ser influenciadas pela ordem de aquisição dessas mutações (ORTMANN *et al.*, 2015). Para os clones que adquiriram uma mutação em *JAK2* antes que uma mutação em *TET2* se observaram alguns eventos cardíacos. Já no caso onde primeiro foi adquirida uma mutação no gene *TET2* se observou um paciente com trombose venosa profunda.

Considerando que a heterogeneidade mutacional na NMP pode ser decorrente de diferentes arquiteturas clonais, com impacto na biologia e clínica dessas doenças, as iPSCs paciente-específicas representam um modelo interessante para estudo *in vitro* destas doenças hematológicas, abrindo um novo caminho para contribuir com o entendimento da natureza clonal/subclonal da MF.

Visto que uma única célula dá origem a cada clone iPSC, essa técnica permite identificar a diversidade clonal dos pacientes, e inferir a arquitetura clonal dos mesmos. À diferença de granulócitos do paciente, a geração das iPSCs oferece o estudo em uma escala clonal, desse modo, podemos estudar as mutações segundo o *status* mutacional de cada clone, podendo identificar se uma mutação está presente em heterozigose, ou homozigose, assim como mecanismos envolvidos como deleções ou amplificações em cromossomos e ocorrência de mutações

Assim, nosso primeiro objetivo específico foi explorar a diversidade clonal das MF usando a tecnologia das iPSC. Após a reprogramação das células dos pacientes (P1-P6 e controles), realizamos a caracterização molecular dos clones iPSCs derivados de cada paciente e analisamos estes dados à luz dos resultados obtidos do perfil mutacional dos granulócitos.

Para o paciente P1, que havia apresentado carga alélica de 98% nos granulócitos, observou-se que os três clones iPSC obtidos eram homozigotos para *JAK2*<sup>V617F</sup> e devem representar o clone dominante nesse paciente. Por outro lado, no caso do paciente P2, com carga alélica de 42% nos granulócitos, observamos uma bi-clonalidade quando caracterizados os clones iPSC: 3 clones apresentaram *JAK2*<sup>V617F</sup> em heterozigose e 1 clone, em homozigose. Esse resultado permite inferir a evolução clonal desse paciente, o qual mostra que o primeiro evento ocorrido no paciente foi a mutação de *JAK2* em um dos alelos e posteriormente a perda do segundo alelo mutado por LOH. levou à expansão do clone *JAK2* em homozigose, como já descrito em diversos trabalhos. Desse modo, podemos inferir que dentro da população de granulócitos poderíamos ter um clone duplo mutado (KRALOVICS *et al.*,

2005). No caso de  $JAK2^{V617F}$  homozigose como um segundo evento os trabalhos apontam que poderia levar a expansão do clone dominante, fato observado com o aumento da carga alélica identificada nas amostras primárias do paciente ao longo do tempo (PASSAMONTI *et al.*, 2009).

O *status* das mutações *driver* (em homo ou heterozigose) poderia influenciar no fenótipo da doença, uma vez que a proliferação e diferenciação hematopoiética são reguladas pela ativação constitutiva de vias de sinalização. Um dos exemplos amplamente estudados é o *status* da mutação e carga alélica de  $JAK2$ , que regula as vias JAK-STAT. Os estudos têm observado que a baixa carga alélica é encontrada frequentemente em pacientes com ET e uma alta carga alélica é prevalente em pacientes com PV e MF. Essas diferenças no *status* mutacional poderiam explicar em parte porque uma mesma mutação poderia levar a fenótipos diferentes nesses pacientes (VANNUCCHI *et al.*, 2005, ALSHEMMARI *et al.*, 2014).

Em modelos iPSCs derivados de diferentes pacientes com PV foi correlacionado o *status* mutacional de  $JAK2^{V617F}$  com o fenótipo resultante após diferenciação. O clone iPSC derivado de um dos pacientes carregava a mutação em  $JAK2^{V617F}$  em homozigose, e após diferenciação *in vitro* dos progenitores para análise de formação de colônias mieloides, observou-se crescimento das linhagens eritroide e megacariocítica, independente das citocinas EPO e TPO, respectivamente. Por outro lado, no clone iPSC portador de mutação  $JAK2^{V617F}$  em heterozigose, identificou-se crescimento de colônias megacariocíticas independentes de TPO, porém não foi observada diferenciação espontânea dos progenitores hematopoiéticos para formação de colônias eritroides na ausência de EPO (SALIBA *et al.*, 2013). Em nosso trabalho, a partir de células primárias do paciente P2 pudemos gerar clones iPSCs portadores de  $JAK2^{V617F}$  em heterozigose e em homozigose e, à diferença de outros modelos, em função de seu *background* isogênico se tornam um valioso modelo de estudo.

A partir das células do paciente P3 também foram geradas iPSCs e caracterizadas quanto ao seu perfil mutacional. Primeiramente, nos granulócitos primários do paciente P3 identificou-se uma alta frequência alélica mutacional (80%) no gene supressor de tumor  $TP53^{W146X}$  (c.437 G>A, p.Trp146Ter). De acordo com o IARC TP53database (Versão R18, última atualização Abril de 2016), a mutação  $TP53^{W146X}$  foi encontrada em 20 tumores, sendo mais frequentemente recorrente em câncer de pulmão e ovário.

A mutação W146X *nonsense* está no éxon 5 do gene, na região do domínio central de ligação ao DNA sequência-específica (região com atividade transcricional) que resulta no truncamento da proteína e leva à perda da função. Aproximadamente de 2 a 4% dos

pacientes com MF apresentam mutações pontuais *missense* no gene *TP53* situadas entre os éxons 5 e 9, sendo essas mutações o tipo mais frequentemente encontrado nas NMPs (de MOURA-GALLO *et al.*, 2002).

Após reprogramação, observamos que o total de iPSCs (5 clones) eram homocigotos para a mutação W146X, além de serem portadores da mutação em *CARL*<sup>ins5</sup>, sugerindo-se que esse genótipo poderia corresponder ao clone dominante de P3. O gene *TP53* é apontado como um gene supressor de tumor e mutações somáticas em combinação com a perda do segundo alelo como um evento secundário poderia levar à transformação leucêmica nos pacientes com NMPs, incluindo casos de pacientes com MF (RAMPAL *et al.*, 2014).

Baseados no estudo de 4 pacientes com NMP crônica, nos estágios iniciais da doença, apresentaram mutações somáticas no gene *TP53* em baixa carga alélica, permanecendo na mesma frequência durante anos. Nos casos onde se observou perda de heterocigosidade (por recombinação mitótica ou deleção), os clones portadores das mutações em hemi ou homocigose expandiram rapidamente resultando em transformação leucêmica para 3 pacientes, assim como se observou uma menor sobrevivência (LUNDERBERG *et al.*, 2014).

No mesmo ano, Rampal e colegas mostraram que em pacientes com LMA pós-NMP o clone dominante carregava as mutações de *TP53* e *JAK2*<sup>V617F</sup> em homocigose e este não havia sido identificado na fase crônica das NMPs nos pacientes desse estudo. A carga alélica das mutações em *TP53* nesses pacientes foi analisada por NGS, e os autores observaram uma diferença de 7% (fase crônica) versus 57% (fase LMA pós-MNP) (RAMPAL *et al.*, 2014).

Posteriormente, em um trabalho realizado com um grupo de pacientes com MF foram detectados *ASXL1*, *TP53* e *EZH2*, tanto na fase blástica, quanto na transformação leucêmica (LMA-s). Nessa última, identificou-se um aumento nas frequências alélicas em torno de 25%, 23% e 22%, respectivamente (BRECQUEVILLE *et al.*, 2014), sugerindo-se que esses genes poderiam ter um papel na transformação leucêmica.

Zhao e colegas estudaram o *status* mutacional de *JAK2* e *TP53* nas linhagens HEL (eritroleucemia humana) e SET-1 (leucemia megacariocítica transformada) e identificaram a mutação *JAK2*<sup>V617F</sup> além de uma mutação em *TP53*. Em ambas as linhagens as mutações são em homocigose e diferentes (SET-2: M133K e HEL: R248W) porém levam à perda da função em ambas as linhagens. Desse modo, sugeriram que ambas as mutações poderiam coexistir como um clone dominante no processo de transformação leucêmico. (ZHAO *et al.*, 2012).

De acordo com o resultado obtido no sequenciamento por low-pass whole-genome no presente projeto, não foi identificada nenhuma deleção nos cromossomos do paciente P3 quando caracterizada a iPSC derivada do paciente P3, incluindo o cromossomo 17, onde o gene *TP53* está localizado, porém os dados obtidos por sequenciamento pelo método de Sanger mostrou que a mutação nos clones iPSCs encontra-se em homozigose. De fato, um ano após o diagnóstico de MF o paciente P3 progrediu para transformação leucêmica (s-LMA) e posteriormente foi a óbito.

Apesar desses diversos trabalhos que investigaram o papel das mutações em *TP53* na transformação leucêmica de células *JAK2*<sup>V617F</sup> pouco ainda se sabe sobre como as mutações em *TP53* poderiam cooperar com *CALR* mutado e nesse sentido as iPSCs derivadas dos pacientes P3 poderiam ser um valioso modelo *in vitro*.

Com relação ao paciente P4, observou-se uma maior diversidade clonal. Nas células primárias do paciente P4 além da mutação *driver* em *CALR*<sup>ins5</sup>, detectou-se *TET2*<sup>G898G</sup> em uma frequência alélica de 80% e a mutação *ASXL1*<sup>G646fs\*12</sup>. Quanto aos clones iPSCs, observamos que todos carregavam a mutação em *CALR*<sup>ins5</sup>. Como mostrado em diversos trabalhos os clones *CALR* mutados são suficientes para iniciar a doença, assim como, para ter uma vantagem na mieloproliferação das células tronco hematopoiéticas (NANGALIA *et al.*, 2013 e KLAMPFL *et al.*, 2013, LUNDBERG *et al.*, 2014). A frequência da carga alélica do gene *CALR* mutado é identificado no intervalo de 25% a 70%. A carga alélica de *CALR* mutado tem sido utilizada para acompanhar a progressão da ET para MFS (LI *et al.*, 2015) assim como a resposta a tratamentos (CORDUA *et al.*, 2016).

No caso do gene *TET2*, a mutação pontual *nonsense* (c.2692G>T) está localizada no éxon 3, antes da região catalítica, e resultaria em um truncamento da enzima e concomitante perda da função e foi identificada no paciente P4. Em todos os clones em que foi encontrada a mutação, estava em homozigose. O resultado sequenciamento pelo low-pass para os clones 5, 7, 24, 32 e 34 não indicam perdas cromossômicas, incluindo o cromossomo 4. Considerando que a sensibilidade da técnica permitiria detectar deleções maiores do que 10 Mpb, inferimos que a mutação em *TET2* poderia estar em homozigose.

Dados na literatura mostraram que as mutações em *TET2* estão presentes em pacientes com MF (14%), com LMA com citogenética normal, ou ainda, com risco intermediário (METZELER *et al.*, 2011, CHOU *et al.*, 2011). Nesse cenário, estudos em modelo animal e com células de pacientes mostraram que tanto os reguladores epigenéticos *TET2*, como *DNMT3A*, poderiam cooperar na MF como um clone dominante em estágios iniciais da doença, ou ainda, promover a transformação leucêmica (CHALLEN *et al.*, 2011). Quanto aos genes reguladores epigenéticos *ASXL1* e *IDH1/2*, um estudo caracterizou uma corte de

483 pacientes e observaram que o gene *ASXL1* poderia ser utilizado como biomarcador de sobrevida dos pacientes com NMP. Nesse estudo identificaram que o gene *ASXL1* e *IDH1/2* poderiam influenciar na progressão da doença (VANNUCCHI *et al.*, 2013).

*TET2* ou *DNMT3A* foram correlacionadas como pior prognóstico nos pacientes com MF. O aumento da frequência alélica mutacional por perda de heterozigossidade desses genes foi identificado como um evento “pré-leucêmico” Tal fato os tornou foco de numerosos trabalhos que visam entender o papel das mutações desses genes no estudo da s-LMA (LUNDERGERGN *et al.*, 2014 e RAMPAL *et al.*, 2014).

Em termos de aquisição de mutações, os estudos têm mostrado que mutações em *TET2* ocorrem mais frequentemente em pacientes com *JAK2*<sup>V617F</sup> (11%) que em pacientes com *CALR* mutado (4,5%). As mutações no gene da *CALR* têm uma maior predominância clonal do que as mutações em *JAK2*. As mutações *drivers* em *CALR* são suficientes para iniciar a doença e mutações adicionais resultam como um evento secundário em fases tardias dos pacientes (LAU *et al.*, 2015). No entanto, no caso dos pacientes *JAK2*<sup>V617F</sup> têm sido detectadas mutações em *TET2*, *DNMT3A* e *ASXL1*, cuja aquisição em alguns pacientes precede da mutação em *JAK2*<sup>V617F</sup>, já em outros pacientes surge como um evento posterior. Relatos na literatura têm mostrado que mutações nos genes *TET2* podem ser mais frequentes de acontecer antes da aquisição de mutações em *JAK2* ou e outros reguladores epigenéticos como DNMT3a (LUNDERGERGN *et al.*, 2014, ORTMANN *et al.*, 2015).

Dois principais trabalhos estudaram em modelos animais o efeito da combinação e ordem de aquisição das mutações nos genes *TET2* e *JAK2* (CHEN *et al.*, 2015, KAMEDA *et al.*, 2014). Dentre os eventos pré-*JAK2*<sup>V617F</sup> evidenciados estão alterações cromossômicas como deleções no 20q e trissomia do cromossomo 8 ou 9, assim como, mutações em reguladores epigenéticos como *TET2*. Esses eventos poderiam ser prévios à aquisição da mutação *JAK2*<sup>V617F</sup> e, em combinação, levar à transformação maligna (VANNUCCHI *et al.*, 2011). Kameda e colegas utilizaram dois modelos de camundongos transgênicos, o primeiro apresentava unicamente a mutação em *JAK2*<sup>V617F</sup> e o segundo carregava a combinação do gene mutado *JAK2*<sup>V617F</sup> e *TET2*<sup>+/-</sup>. Ambos os camundongos desenvolveram características fenotípicas mieloproliferativas com algumas diferenças. As células progenitoras extraídas da medula óssea foram transplantadas para outros camundongos e posteriormente analisadas.

Os resultados mostraram uma diminuição da razão entre *leukemic stem cells* (LSC) e progenitores no modelo com *JAK2*<sup>V617F</sup>, quando comparado com o modelo duplo mutante. Em combinação com ensaios de formação de colônia, após sucessivas passagens dos progenitores, os autores mostraram que *TET2* mutado coopera com *JAK2*<sup>V617F</sup> para o

aumento da capacidade de autorrenovação e manutenção das LSC (KAMEDA *et al.*, 2014, VAINCHENKER e PLO *et al.*, 2015).

Por outro lado, os pacientes que carregam mutações em *TET2* em combinação com *CALR* mutado ainda foram pouco estudados. Considerando que nos modelos de iPSCs gerados no presente estudo, os diferentes genótipos identificados permitem utilizar como um controle isogênico interno as iPSCs que são WT para os genes candidatos.

Outro gene regulador epigenético mutado no paciente P4 foi *ASXL1* com uma mutação *frameshift* (c.1934insG) em heterozigose no éxon 12, na posição 646 (p.G646fs\*12). A mutação ocorre com a inserção de uma G depois de 8 nucleotídeos de guanidina. Alterações genéticas, mutações *nonsense*, ou indels, que levam a *frameshift* são frequentemente identificadas no gene *ASXL1* na posição c.1934. (CARBUCCIA *et al.*, 2009, CARBUCCIA *et al.*, 2010, BOULTWOOD *et al.*, 2010).

Diversos dados na literatura têm identificado a mutação p.G646fs\*12 em células mieloides de pacientes como a mais frequente no gene *ASXL1*, estando ausente nas células linfoides CD3<sup>+</sup>, porém, ainda não foi esclarecido seu significado funcional (PRATCORONA *et al.*, 2012).

Alguns autores sugerem que *ASXL1* poderia ser um gene supressor de tumor e que sua inativação poderia ter um importante papel na patogênese e malignidade de algumas neoplasias mieloides (BOULTWOOD *et al.*, 2010, CHOU *et al.*, 2010). Contudo, os trabalhos têm se mostrado controversos em relação a se p.G646fs\*12 é uma mutação somática ou artefato metodológico, uma vez que a mesma mutação foi também identificada em amostras de tecido normal dos pacientes com *ASXL1* mutada em mais de 25% das amostras de pacientes livres de doenças hematológicas (ABDEL-WAHAB *et al.*, 2010, CARBUCCIA *et al.*, 2009, CARBUCCIA *et al.*, 2010). O consenso nesses últimos anos é de considerar a alteração em p.G646fs\*12 como uma mutação (ABDEL-WAHAB *et al.*, 2013).

Em nosso modelo iPSCs, encontramos a mutação associada ou não a *TET2* mutado. Em termos de arquitetura clonal do paciente P4, consideramos que como a mutação em *TET2* está presente em homozigose (2 eventos), provavelmente precedeu a mutação em *ASXL1*.

Outro paciente também portador de mutação em *ASXL1* foi o paciente P5. Nesse paciente, portador da mutação no gene *JAK2*<sup>V617F</sup>, foi identificada, no gene *ASXL1*, a mutação *frameshift* em homozigose (c.1771\_1772insA) no éxon 12 na posição 591 (p.Y591fs\*1). Os trabalhos têm sugerido que as mutações *frameshift* no gene *ASXL1* poderiam levar à interrupção do domínio PHD do gene (domínio que tem como função

modificar a cromatina) resultando no truncamento da proteína (CARBUCCIA *et al.*, 2010, CHOU *et al.*, 2010). A partir desses dados em combinação com os resultados obtidos do NGS e o low-pass whole genome para análise dos cromossomos, sugerimos uma possível ordem de aquisição das mutações e arquitetura clonal desse paciente.

Nos granulócitos primários observamos 43% da carga alélica mutacional no gene de  $JAK2^{V617F}$  e 47% da carga alélica foi observada para a mutação em  $ASXLI^{Y591fs*1}$ . Quando analisados os resultados do sequenciamento por low-pass whole genome sequencing identificamos a deleção em no cromossomo 20q nas células primárias. A sensibilidade dessa técnica permite identificar deleções a partir de 10 Mpb, e deleção que estejam pelo menos a partir de 50 % no *pool* de células avaliadas.

Após reprogramação celular observamos 18 clones iPSCs derivados do paciente P5. Dessas, duas colônias iPSC eram portadoras de mutações somática que foram originárias das células primárias de P5.

Estudos na literatura tem mostrado que quanto à ordem de aquisição de mutações adquiridas nas células do paciente, a deleção 20q foi descrita como uma das alterações mais comuns nos pacientes com NMP. Eles observaram que em pacientes com TE e PV a mutação em  $JAK2^{V617F}$  poderia ter sido adquirida no *background* de um clone pré-existente 20q (KRALOVICS *et al.*, 2006). Porém, outros trabalhos têm observado que a deleção do 20q poderia também ser um evento pós- $JAK2^{V617F}$ . Por outro lado, após adquirir a mutação no gene  $ASXLI$ , a perda da heterozigose pela deleção do cromossomo 20q poderia ter sido um evento secundário no mesmo clone.

Devido a que observamos que 66% das células apresentavam a deleção 20 na célula iPSC derivada do clone 5. Baseados nos resultados de caracterização molecular, temos considerado a possibilidade de que o clone iPS.MF.clone5 derivada de P5 esteja fusionado com um clone iPSC WT.

Cerca de 35% dos pacientes com MF apresentam deleções nos cromossomos, sendo as mais frequentes 13q, 17q e 20q. Nesse último caso, os pacientes são associados com risco intermediário-2 e frequentemente identificados em fase blástica nas MF (TAM *et al.*, 2009). Os pacientes com deleções no 13q ou 20q apresentaram uma sobrevida média de 46 meses (ABRUZZO *et al.*, 2009). Nessa região localizam-se genes associados à transformação leucêmica, reguladores epigenéticos e genes envolvidos com vias de sinalização. Como exemplo, foi identificado o gene  $ASXLI$ . A perda de heterozigose do segundo alelo como um evento secundário foi descrito em diversos trabalhos apontando o gene  $ASXLI$  como um gene supressor de tumor nas NMP.

Além disso, outros genes chaves associados à diferenciação hematopoiética foram detectados na região do cromossomo 20 deletada tanto nos GR primários e na iPSCs clone 5 após realizado o low-pass genome-sequencing. Entre os genes identificados encontram-se: o gene *L3MBTL1*, associado à regulação da eritropoiese, o gene *SGK2* que participa da regulação da megacariopoiese, assim como os genes *PTPN1* e *PRPRT* associados com regulação de vias de sinalização. A perda desses genes poderia influenciar na aquisição de um fenótipo mais agressivo nos pacientes com MF e s-LMA (VOGELSTEIN *et al.*, 2013). A geração de células iPSCs a partir de células de pacientes com NMP têm aumentado nesses últimos anos. Hosoi e colegas geraram uma iPSC derivada de um paciente com SMF e outro que carregava a mutação de *JAK2* em homozigose e uma deleção no cromossomo 13 (del 13q). (Nesse trabalho, os progenitores hematopoiéticos diferenciados *in vitro* foram induzidos para gerar megacariócitos HOSOI *et al.*, 2013). Apesar de não ter observado diferenças morfológicas entre as iPSC derivadas do paciente e as células geradas a partir das iPSCs de doadores saudáveis, eles identificaram um aumento da expressão da citocina IL8, cuja função biológica é estimular os fibroblastos a produzir colágeno. Esses resultados foram associados com as alterações observadas na medula óssea dos pacientes, onde é observado um aumento da inflamação e fibrose medular.

Por fim, no paciente P6 foi identificada uma mutação *driver* em *CALR*<sup>del52</sup> e uma mutação pontual adicional *nonsense* no gene *ASXL1* em heterozigose na posição 693 (R693X). Foi sugerido que essa mutação poderia levar à perda da função da *ASXL1* (CARBUCCIA *et al.*, 2009; EL-SHARKAWI *et al.*, 2014; CHOU *et al.*, 2010; STEIN *et al.*, 2011). Um estudo recente tem mostrado que a mutação R693X em combinação com *JAK2*<sup>V617F</sup> poderia levar a transformação leucêmica em pacientes com MF (MARTIN-FERREIRA *et al.*, 2016).

Entre 20 e 40 % dos pacientes com MF foram caracterizados com mutações no gene *ASXL1*, associando esse perfil genético a uma menor sobrevida (GELSI-BOYER *et al.*, 2012, STEIN *et al.*, 2011). Desse modo, as mutações poderiam ter um importante papel na progressão da doença. Diversos trabalhos têm estudado a sobrevida dos pacientes com MF que carregam mutações no gene *ASXL1* e *CALR*. Os resultados demonstraram menor sobrevida global para os pacientes portadores das duas mutações, quando comparados com aqueles com *CALR* como único gene alterado ou com *ASXL1* mutado (TEFFERI *et al.*, 2014).

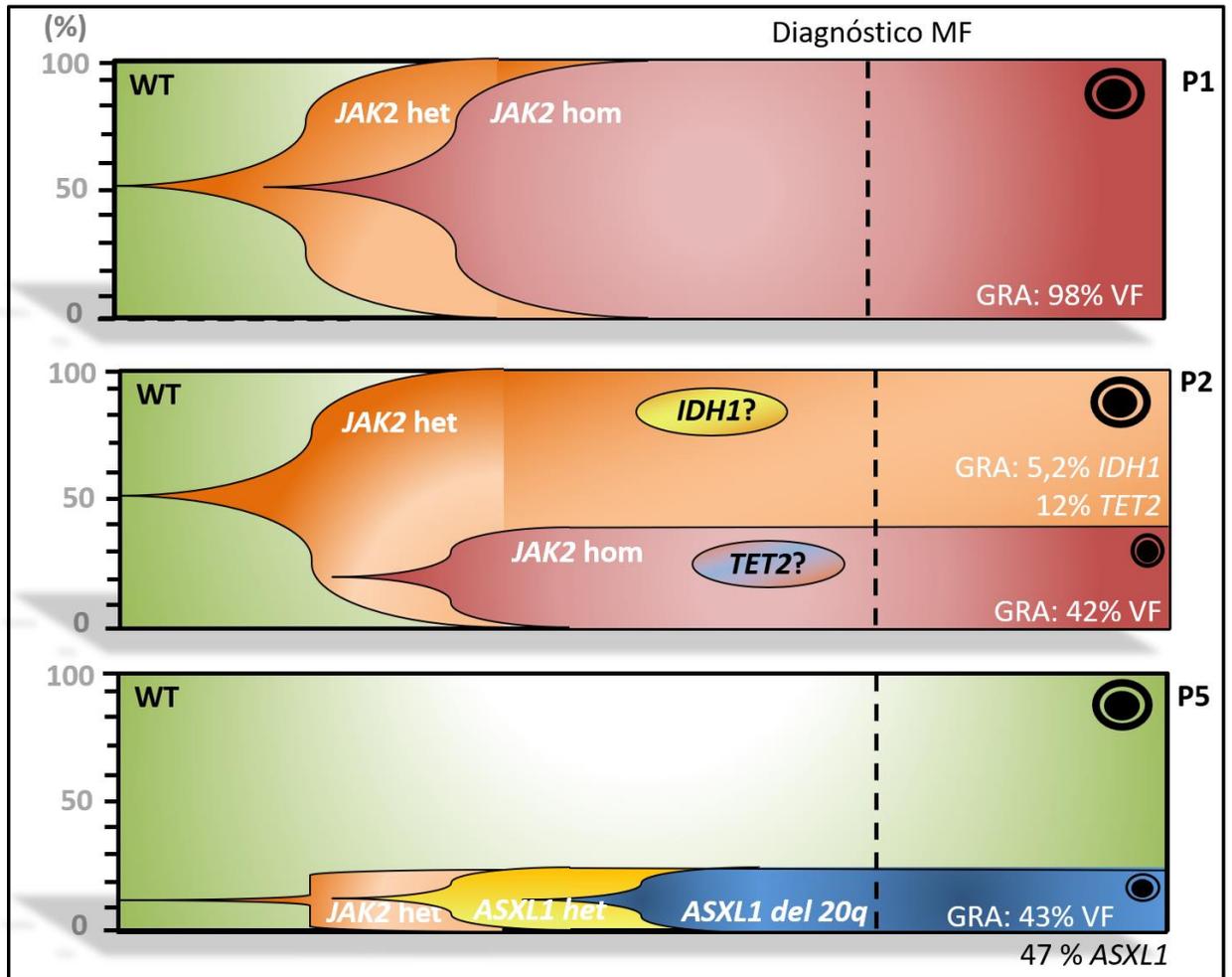
De modo geral, nossos resultados mostram que os clones ipscs derivados eram portadores das mutações somáticas encontradas originalmente nas células primárias dos pacientes com MF. Em alguns casos, foi possível identificar diferentes subclones derivados de um mesmo paciente e inferir a possível arquitetura clonal e ordem das mutações.

Por outro lado, em um recente estudo, a partir de duas amostras de diferentes pacientes com LMA iPSCs foram geradas para o estudo da variação clonal nesses pacientes, entre outros objetivos. Em ambos os casos, todos os clones apresentaram o rearranjo MLL originário da amostra do paciente e uma mutação no gene K-RASG130D. No caso do primeiro paciente, eles identificaram que todos os clones iPSCs mantinham as mesmas mutações identificadas nas células primárias, com exceção de um clone iPSC que era WT para o gene K-RASG130D, desse modo os autores sugeriram que o paciente teria ao menos uma biclonalidade.

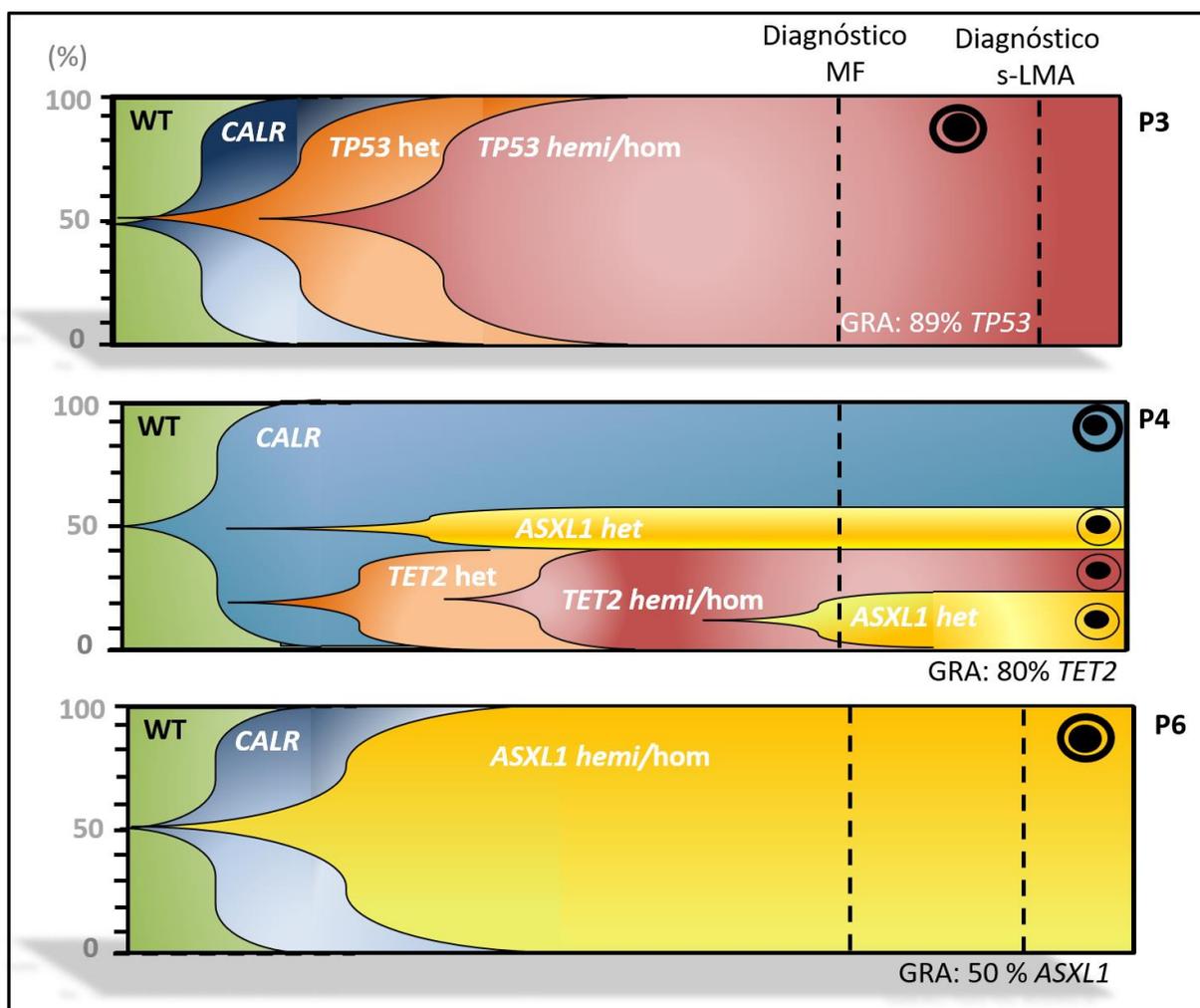
Recentemente, células de 16 pacientes com AML transformadas, que carrega mutações gene MLL foi induzida a reprogramação celular. Esses pacientes apresentam uma alta diversidade genética anormalidades gênicas específicas. A maioria das células do paciente não teve sucesso na reprogramação, porém foi possível reprogramar uma das células e gerar um modelo de iPSC derivado de um paciente que sofreu transformação leucêmica. Quando induzida a diferenciação hematopoiética foi observado um bloqueio da diferenciação. O modelo poderá ser usado para testar terapias utilizando inibidores que modulam o perfil epigenético. Assim como para entender a relação que existe entre os produtos fusionados do gene MLL e o processo de reprogramação celular (LEE *et al.*, 2018).

No caso do segundo paciente, todas as iPSCs apresentaram as mutações originárias do paciente com exceção da mutação em WT1T390fs, resultando então na obtenção de iPSCs correspondentes a um único subclone do paciente. Portanto, nesse trabalho, as iPSC derivadas dos pacientes com LMA foram principalmente geradas a partir de um clone dominante da doença. Quando comparado com os nossos resultados, observamos que o modelo das iPSCs gerado a partir dos pacientes com MF torna-se um valioso modelo de estudo visto que pudemos obter clones iPSCs correspondentes não unicamente aos clones dominantes, mas também aos subclones selecionados conforme a evolução clonal do paciente (CHAO *et al.*, 2016).

Os modelos de iPSC derivados a partir de MF nesse trabalho serão uma ferramenta valiosa para investigar o impacto biológico e mecanismos moleculares ainda não descritos no contexto das NMPs.



**Figura 5.1. Esquema hipotético da arquitetura clonal e ordem de aquisição das mutações dos pacientes com MF.** O perfil mutacional dos pacientes selecionados para reprogramação celular foi estabelecido por NGS e revalidado por sequenciamento pelo método de Sanger (dado mostrado na parte inferior de cada esquema). As linhas de ponto referem-se ao genótipo observado em cada paciente após diagnóstico. O eixo-y refere-se à porcentagem de colônias iPSCs derivadas de cada paciente geradas na reprogramação celular. Os pontos com círculos pretos representam os genótipos observados em cada iPSCs. A aquisição da ordem das mutações mostradas em cada esquema relativo aos pacientes é uma possível evolução clonal dos pacientes hipotetizada a partir dos resultados observados tanto nos dados do NGS quanto na reprogramação celular.



**Figura 5.1. Esquema hipotético da arquitetura clonal e ordem de aquisição das mutações dos pacientes com MF (continuação). Descrição da evolução clonal dos pacientes P1, P2, P5, P3, P4 e P6 correspondentemente.** O perfil mutacional dos pacientes selecionados para reprogramação celular foi estabelecido por NGS e revalidado por sequenciamento pelo método de Sanger (dado mostrado na parte inferior de cada esquema). As linhas de ponto referem-se ao genótipo observado em cada paciente após diagnóstico. O eixo-y refere-se à porcentagem de colônias iPSCs derivadas de cada paciente geradas na reprogramação celular. Os pontos com círculos pretos representam os genótipos observados em cada iPSCs. A aquisição da ordem das mutações mostradas em cada esquema relativo aos pacientes é uma possível evolução clonal dos pacientes hipotetizada a partir dos resultados observados tanto nos dados do NGS quanto na reprogramação celular.

O segundo objetivo específico desse trabalho foi de avaliar o impacto das mutações somáticas das NMPs no processo de reprogramação celular. As reprogramações foram realizadas em três experimentos: o primeiro incluiu P1, P2 e C1, o segundo grupo contendo o P3 e o terceiro grupo incluindo P4, P5, P6 e C2. Para cada grupo, as reprogramações foram realizadas nas mesmas condições e em paralelo com os respectivos controles, com exceção do controle usado no grupo 2, no qual tivemos insucesso na reprogramação. Para cada caso, a eficiência de reprogramação foi calculada como número de colônias

obtidas/número de células transfectadas com Sendai. Em nossos experimentos, a taxa de eficiência variou entre 0,013 e 0,14%. Diversos fatores podem influenciar na taxa de reprogramação, como idade dos pacientes/doadores (SCHLAEGER *et al.*, 2014), tipo de célula submetida à reprogramação (SCHLAEGER *et al.*, 2014), taxa de proliferação celular das células destinadas à reprogramação (SCHLAEGER *et al.*, 2014), assim como o *background* genético e epigenético das células.

Em relação às mutações que os pacientes carregam e a influência na eficiência de reprogramação, mutações *drivers* como  $JAK2^{V617F}$  favorecem a proliferação celular e, portanto, poderiam influenciar positivamente no processo de reprogramação, pelo aumento de acessibilidade ao DNA (TURINETTO *et al.*, 2017). De fato, durante a expansão eritróide pré-reprogramação, observamos que as células dos pacientes P1, P2 e P5, portadores da mutação *driver*  $JAK2^{V617F}$  proliferaram em uma maior proporção, quando comparadas tanto com os pacientes P3 e P4, portadores da mutação *driver*  $CALR^{ins5}$ , como com os controles C1 e C2. No entanto, em nosso trabalho, essa vantagem proliferativa não se traduziu em um aumento significativo no número de colônias obtidas (Figura 5.1.).

Além das mutações *driver*, em nosso trabalho nos interessamos especialmente em estudar o papel das mutações em genes reguladores epigenéticos *TET2* e *ASXL1* na reprogramação celular.

Nas últimas décadas, numerosos estudos têm sido dirigidos ao entendimento do processo da reprogramação celular e diferenciação *in vitro* (YENER *et al.*, 2018, YING *et al.*, 2018). Os mecanismos pelos quais a reprogramação ocorre ainda não foram totalmente compreendidos. Há, no entanto, evidências que mostram que as células somáticas sofrem hipometilação global no processo de reprogramação perdendo, em grande parte, as marcas epigenéticas associadas à diferenciação terminal e, conseqüentemente, adquirindo um perfil epigenético similar com as células tronco embrionárias (JONES *et al.*, 2010).

No contexto das células primárias dos pacientes, a reprogramação celular poderia reverter as alterações epigenéticas, porém mantendo as mutações genéticas nas iPSCs. As modificações epigenéticas no processo de reprogramação podem regular a expressão de fatores de transcrição associados à pluripotência em genes como *NANOG*, *OCT-3/4*, *SOX-2*, entre outros. Esses genes têm um papel importante na aquisição e manutenção do estado de pluripotência das células iPSCs (PAPP *et al.*, 2013). Portanto, os genes que têm um papel na modulação epigenética, seja pela indução global da acetilação de histonas ou hipometilação do DNA, poderiam impactar no processo de reprogramação (TAKAHASHI *et al.*, 2006, 2007).

Neste estudo, o paciente P4 era portador da mutação em *TET2*<sup>G898X</sup>, detectada tanto nos granulócitos primários quanto nos eritroblastos que foram usados para a reprogramação. Nossos dados de sequenciamento direto e NGS mostraram que os eritroblastos diferenciados *in vitro* a partir dos progenitores CD34<sup>+</sup> apresentaram uma carga alélica de *TET2*<sup>G898X</sup> menor do que os granulócitos primários do paciente. Uma possível explicação da seria que a mutação em *TET2* representaria uma vantagem proliferativa à série granulocítica, à custa da linhagem eritroide (PRONIER *et al.*, 2010) e, desse modo, a diferenciação *in vitro* dos eritroblastos poderia ter selecionado negativamente a mutação. Outra possibilidade poderia ser que a carga alélica fosse menor já nas células tronco/progenitoras CD34<sup>+</sup> usadas para diferenciação *in vitro*, mas função do número limitado de células não foi possível aferir o estado mutacional nesta amostra.

Comparando a carga alélica na amostra de eritroblastos (pré-reprogramação), cerca de 30%, com a proporção de células iPSC portadoras da mutação (pós-reprogramação), 37,5%, foi possível observar que o processo de reprogramação celular não selecionou negativamente os clones mutados. Ainda, quantificamos a expressão de *TET2* nas iPSCs: *TET2*<sup>G898X</sup>, *TET2*WT e as iPSCs derivadas do controle e observamos uma diminuição da expressão de *TET2*, quando comparadas com as iPSCs WT.

O papel de *TET2* na reprogramação celular e pluripotência foram abordados em alguns estudos. *TET2* participa na regulação direta da expressão de *NANOG* e *OCT-3/4* e indireta de *SOX2* pela modulação do *status* de metilação das regiões promotoras desses genes (KHO *et al.*, 2011). Doege e colegas têm mostrado que Tet2 poderia interagir como Parp1, favorecendo a abertura da cromatina e permitindo o acesso aos fatores de transcrição. Dentre dos genes que eles poderiam estar modulando a expressão encontra-se *Nanog* e *Esrrb* (DOEGE *et al.*, 2012,). Desse modo, os estudos sugerem que *TET2* teria um papel importante na manutenção da pluripotência e autorrenovação (DOEGE *et al.*, 2012, KHO *et al.*, 2011).

Costa e colegas mostram que tet2 e *Nanog* ocupam a mesma região gênica, associada tanto à manutenção da pluripotência, ao aumento da eficiência de reprogramação quanto às linhagens embrionárias (COSTA *et al.*, 2013). Já Langolis e colegas, mostraram em ES que *TET2* interage diretamente com a região promotora de *NANOG* modulando de maneira negativa a expressão do mesmo em células ES. Os autores observaram que o silenciamento de *TET2* levaria à diferenciação da camada germinativa ectoderma e diminuição da camada mesoderma e endoderma, avaliadas por expressão de genes específicos de cada camada (LANGOLIS *et al.*, 2014).

Hu e colegas estudaram o papel das enzimas tet na reprogramação, usando como modelo fibroblastos embrionários de camundongo. Quando deletada individualmente cada proteína tet (tet1/2/3), observou-se mostraram que células deletadas para os genes Tet1, Tet2 e Tet3, e posteriormente reprogramadas, não são capazes de gerar iPSCs. Porém, nas células de camundongo duplo deletadas, em todas as combinações possíveis, houve uma diminuição da eficiência de reprogramação, sendo menores as taxas de obtenção de iPSCs quando comparadas com as combinações que incluíam Tet2 deletada.

Esses resultados sugerem que Tet2 poderia ter um papel na reprogramação celular e manutenção devido a que a deleção unicamente de Tet2 levaria a diminuição da eficiência de reprogramação das pluripotência. Em seguida, nos modelos de camundongo com uma única deleção correspondente a cada Tet, observou-se um aumento da eficiência de reprogramação comparado com as populações duplo deletadas. Desse modo, foi sugerido que, no caso da Tet2 deletada, Tet1 e Tet3 poderiam compensar a atividade de Tet2 (HU et al., 2014). Pesar de envolver células murina, as evidências observadas por Hu de que a deleção de tet2 diminui a eficiência de reprogramação contrastam com nossos resultados, em que células do mesmo paciente, mutadas ou não para TET2, foram igualmente capazes de gerar ipscs.

Isso nos levou a questionar se a expressão de TET1 e/ou TET3 poderia estar compensando a falta de expressão de *TET2*. Na análise de expressão gênica de *TET1* e *TET3* não observamos diferença entre os três grupos. Seria interessante também poder avaliar se haveria ou não um aumento da atividade enzimática de TET1 e TET3. Uma possível explicação seria de que mecanismos independentes da atividade catalítica de TET2 contribuam para a reprogramação celular.

Uma segunda explicação possível é de que outros mecanismos de desmetilação ativa independentes das TETs poderiam estar modulando o processo de reprogramação celular. Bhutani e colegas reprogramaram células de fibroblastos humanos fusionando-os com células ES (formação de heterocarions). Nesse modelo, eles mostraram que outro mecanismo de desmetilação independente de TETs poderia estar participando na desmetilação ativa. O mecanismo de desmetilação já tinha sido identificado no Zebrafish e é dependente de AID (activation-induced cytidine deaminase, APOBEC1, 2 e 3) que trabalha em conjunto com as enzimas de reparo (BER). No mesmo trabalho sugeriram que a enzima AID poderia estar modulando a expressão de *OCT-4* e *NANOG* no processo de reprogramação (BHUTANI *et al.*, 2010). Apesar desses mecanismos de desmetilação ter sido descrito por outros grupos, ainda se sabe pouco sobre como esses mecanismos podem participar no processo de reprogramação (NABEL *et al.*, 2012).

Futuramente temos interesse em quantificar o nível de 5hmC e a expressão dos genes de pluripotência nas iPSCs TET2mut e as iPSCs WT visando identificar se as alterações em TET2 teriam impacto na regulação da expressão de genes responsáveis pela manutenção da pluripotência.

Além das iPSC portadoras de mutação em TET2, nesse trabalho obtivemos linhagens portadoras de diferentes mutações em *ASXL1*, outro regulador epigenético. O paciente P5 é portador da mutação e *ASXL1*<sup>Y591fs\*1</sup> e identificou-se uma deleção acima de 30 Mb no cromossomo 20 (del20q). Após reprogramação dos eritroblastos e caracterização das iPSCs observamos dois genótipos que corresponderam às mutações originais. Dessa forma, sugerimos que as mutações identificadas no paciente não impediram a reprogramação celular. Porém, ainda é necessário estudar a associação de *ASXL1* no processo de reprogramação celular, ainda pouco explorado.

Após a caracterização molecular dos clones ipscs, os autores não identificaram genótipos com a del20q, porém, foram observadas duas ipscs com a mesma mutação em *ASXL1*. Sendo assim, nossos resultados se mostram consistentes, uma vez que as mutações em *ASXL1* não impediram a reprogramação das células CD34<sup>+</sup> derivadas dos pacientes com PV.

Apesar de observar que as iPSCs mantiveram as mutações originais identificadas nas células do paciente, detectamos que dois clones iPSCs (clone 5 e clone 12) portadores das mutações em *JAK2*<sup>V617F</sup> e *ASXL1*, ambas em heterozigose, com del20q no clone 5, apresentaram morfologias alteradas das colônias, e aumento da diferenciação espontânea, de tal modo que o clone 12 na passagem 10 diferenciou-se completamente em cultura.

No caso do clone 5, fizemos a caracterização dos marcadores de pluripotência por imunofluorescência na passagem P15. Dessa forma, observamos uma parcial imunoexpressão de TRA-1-81 e TRA-1-60. Chan e colegas visando identificar marcadores precoces de pluripotência reprogramaram células de fibroblastos humanas com retrovírus. Identificaram três marcadores: TRA-1-60, DNMT3B e REX1. Porém os marcadores clássicos como NANOG, SSEA-4 não foram estáveis para utilizar como marcador de pluripotência. Por outro lado, o método da fosfatase alcalina, ainda é utilizado para discriminar entre uma iPSCs reprogramada e parcialmente reprogramada (CHAN et al., 2009).

A dificuldade de manter as iPSC.MF.P5.5 e PS.MF.P5.12 em cultura em estado de pluripotência, pode ser derivada da influência de algum gene, ou grupo de genes, envolvidos na regulação da pluripotência que integram o fragmento deletado 20q.

Kang e colegas, usando células NTERA-2 (células pluripotentes de carcinoma embrionário humano) fizeram *knockdown* ou superexpressão de SOX-2 e observaram que, no primeiro caso, a expressão de *ASXL1* estava diminuída, enquanto no segundo caso identificou-se aumentada. Desse modo, sugeriram que *ASXL1* poderia ser regulado por SOX2. Em seguida, a partir da construção da região promotora de *ASXL1* e um plasmídeo *reporter luciferase*, confirmaram que, em presença de SOX2, o promotor de *ASXL1* aumentava a atividade luciferase em células HEK293, sugerindo assim que SOX2 poderia regular de maneira direta a expressão de *ASXL1*.

Por último, usando células embrionárias de camundongo (E14TG2a) identificaram que, quando silenciada a expressão de *Asxl1*, resultou diminuída a expressão de *Sox2* e *Oct-3/4*, mas não de *Nanog* (KANG et al., 2012). Um trabalho mais recente identificou *Asxl1* como potencial regulador da expressão de *Oct-3/4* e *Nanog* em células estromais de medula óssea de camundongo *Asxl1*<sup>-/-</sup> (ZHANG et al., 2016).

Já o paciente P6 apresentou uma mutação no gene *ASXL1*<sup>R693X</sup> em heterozigose que levou a perda de função, fato que não interferiu na reprogramação celular. Os marcadores de pluripotência foram confirmados em uma das iPSCs geradas a partir das células do paciente. Posteriormente, caracterizados quanto a sua capacidade de formação de EB e diferenciação espontânea, todos os marcadores avaliados das três camadas germinativas foram confirmados. Os resultados sugerem que a mutação *ASXL1*<sup>R693X</sup> em heterozigose não interfere na diferenciação dos progenitores envolvidos nas camadas ectodérmica, mesodérmica e endodérmica.

Kang e colegas, ao contrário de nossos resultados, mostraram que, quando *Asxl1* se encontra deletado nos corpos embrioides derivados das células E14TG2a, estas estruturas diminuam de tamanho e apresentaram morte celular no dia 3 da formação. Tais resultados também foram observados nas condições com deficiência em *Sox2*. Desse modo, os autores sugeriram que as deleções em *Asxl1* ou em *Sox2* estariam envolvidas na diferenciação dos três folhetos germinativos (KANG et al., 2010). Estudos visando entender os mecanismos que regulam *ASXL1* e *SOX2*, e o *status* mutacional de *ASXL1* são necessários para elucidar como esses genes trabalham em conjunto no estado de pluripotência e no processo de embriogênese.

Além dos mecanismos epigenéticos envolvidos na reprogramação, diversos estudos têm apontado que a reprogramação celular compartilha características em comum com o processo de tumorigênese. De maneira geral, os genes utilizados para induzir a reprogramação celular em células somáticas também são encontrados em diversos tipos de

câncer, principalmente nas *cancer stem cells*, entre eles, c-Myc, OCT-4 e SOX2 (TAKAHASHI *et al.*, 2006, 2007). A presença de mutações no gene supressor de tumor TP53 é um dos mecanismos clássicos envolvidos na tumorigênese, tornando-se foco de inúmeros estudos. Mais recentemente, o papel desse gene no contexto da reprogramação celular e estado de pluripotência vem sendo explorado.

Em nosso estudo, o paciente P3 era portador de  $TP53^{W146X}$ , mutação de tipo nonsense. A partir de células primárias desse paciente foi possível estabelecer iPSC portadoras desta mutação em homozigose. De fato, trabalhos importantes mostraram que p53 representa uma importante barreira à reprogramação e a deleção ou inibição do gene aumenta significativamente a eficiência de reprogramação.

Alguns trabalhos têm mostrado que a ativação de TP53 em células ES, devido, por exemplo, ao dano no DNA (MARIÓN *et al.*, 2009), poderia levar à diminuição de expressão do fator de transcrição NANOG e conseqüentemente promover a diferenciação das células ES (LIN *et al.*, 2005). Estudos mostram que TP53 é capaz de influenciar na eficiência de reprogramação (KAWAMURA *et al.*, 2009, HONG *et al.*, 2009, KRIZHANOVSKY *et al.*, 2009)

Corroborando esses resultados, Ungerwittter e Scoble, mostraram que uma isoforma da proteína p53,  $\Delta 40p53$ , com deficiência no domínio de transativação é expressa especificamente em células tronco embrionárias e tem um papel na manutenção da pluripotência. Experimentalmente, os autores mostraram que quando  $\Delta 40p53$  é expressa parcialmente, leva à perda de pluripotência, promovendo a diferenciação espontânea das células ES murinas. Inversamente, a expressão aumentada de  $\Delta 40p53$  fez com que as ESC mantivessem o estado de pluripotência, sem aparente diferenciação.

Os autores sugeriram que o mecanismo de ação dessa isoforma passaria pela inibição do efeito de p53 íntegro como fator supressor da expressão de genes alvo como Nanog, e o receptor de IGF-1. Esse receptor foi identificado por ser expresso nas células ES em processo de diferenciação (UNGERWITTER E SCRABLE *ET al.*, 2010). Ainda não tem sido publicado modelos iPSC com TP53 mutado.

Além de avaliar a eficiência de reprogramação, ainda nesta etapa do projeto, efetuamos a caracterização de pluripotência das iPSCs obtidas, com o objetivo de confirmar que são *Bona fide* iPSCs. A caracterização consistiu na confirmação da ausência da expressão do VS, análise dos marcadores de pluripotência, avaliação da capacidade das iPSCs de diferenciar-se em células das três camadas germinativas a partir do ensaio de formação de EBs, assim como análise de marcadores específicos dessas células

diferenciadas espontaneamente derivadas dos EBs. A avaliação dos marcadores de pluripotência foi efetuada em duas iPSCs por cada genótipo identificado na caracterização molecular das mesmas. Contudo, a avaliação completa de pluripotência foi confirmada para uma iPSCs por cada genótipo identificado de cada paciente. Assim, tendo demonstrado que as iPSCs obtidas portadoras de mutações em *TET2*, *ASXL1* ou *TP53* são *bona fide* iPSC e que foi possível manter essas linhagens em cultura por diversas passagens sem aparente diferenciação, concluímos que estas mutações não impediram a reprogramação celular/manutenção de pluripotência.

Em condições fisiológicas, a diferenciação mieloide é regulada por citocinas hematopoiéticas que se ligam aos receptores na superfície celular e ativam vias de sinalização. Receptores homodiméricos como o receptor de eritropoietina (EPOR), receptor de trombopoietina (TPOR/MPL) e o receptor de granulócitos (G-CSFR) sinalizam via JAK/STAT. As mesmas vias são ativadas constitutivamente pela presença de mutações somáticas *driver*, principalmente nos genes *JAK2*, *CALR* e *MPL*. A ativação da via JAK/STAT tem influência no fenótipo mieloproliferativo observado nos pacientes com NMPs. A utilização de modelos de estudo são necessários para o melhor entendimento da fisiopatologia dessas doenças.

As iPSCs têm sido amplamente utilizadas como modelo de estudo *in vitro* em diversas doenças hematológicas como anemia falciforme, NMPs, leucemia juvenil crônica, leucemia mieloide crônica e aguda, dentre outras. Baseados nas características fenotípicas daquelas doenças, a diferenciação hematopoiética a partir de iPSCs tem sido crucial para recapitular *in vitro* os fenótipos observados nesses pacientes.

A diferenciação hematopoiética *in vitro feeder free* a partir das iPSCs tanto em sistemas 2D (células em monocamada), quanto 3D (formação de EBs), tem surgido como uma alternativa para a utilização das iPSCs tanto na terapia celular quanto na modelagem de doenças. No entanto, o sistema 2D é um sistema mais simples quando comparado com o 3D, uma vez que não precisa da etapa intermediária de formação de EBs, independizando-se das variáveis associadas a tal processo de formação.

Na diferenciação hematopoiética *in vitro feeder free* em 2D é utilizada uma matriz extracelular humana como colágenos tipo IV, Matrigel™ ou Geltrex™ (NIWA *et al.*, 2011, NS *et al.*, 2008). Dados na literatura têm mostrado que a diferenciação hematopoiética é suportada por fibronectina, colágeno tipo IV e outras proteínas que formam parte da composição de Matrigel™ ou Geltrex™. Ambos os componentes têm influência na diferenciação de progenitores mesodérmicos e hemato-endoteliais (NISHIKAWA *et al.*,

1998, GEORGE et al., 1993). Neste projeto utilizamos o sistema em 2D para induzir a diferenciação hematopoiética.

Consistente com o modelo de embriogênese, a diferenciação hemato-endotelial a partir de células pluripotentes ES/iPSC é observada nas etapas iniciais do processo de diferenciação hematopoiética *in vitro*. Os progenitores hematopoiéticos são divididos em dois tipos, o primeiro nomeado como progenitor hematopoiético primitivo, ou da primeira onda de diferenciação, capaz de diferenciar-se principalmente em colônias eritroides primitivas, granulocíticas, monocíticas e megacariocíticas, todas com tamanhos pequenos. Esses progenitores são encontrados nos dias 6 ou 7 nos sistemas de diferenciação *in vitro* 2D (SALVAGIOTTO *et al.*, 2011).

Já o segundo tipo de progenitores é apontado como o progenitor hematopoiético definitivo, originado da segunda onda da diferenciação. Nesse último caso, os progenitores definitivos são capazes de diferenciar-se em células da linhagem mieloide e linfoide. A diferença da primeira onda, os progenitores hematopoiéticos definitivos, apresentam um aumento do tamanho das colônias mieloides assim como a presença do marcador de superfície CD45, porém ambos os progenitores compartilham os marcadores CD34 e CD43.

A partir dos resultados obtidos na geração de iPSCs derivada dos pacientes com MF e baseados no nosso interesse em estudar o papel de reguladores epigenéticos nos processos de diferenciação hematopoiética, selecionamos as iPSCs derivadas do paciente P4 visando entender a influência da mutação no gene *TET2* no processo de diferenciação. Neste modelo avaliamos o potencial clonogênico dos progenitores derivados dos diferentes clones iPSCs do paciente P4.

Nesta terceira etapa do projeto, a partir da diversidade clonal identificada no paciente P4, comparamos os fenótipos observados na diferenciação hematopoiética *in vitro feeder free* das iPSCs relativas aos genótipos  $CALR^{ins5}/TET2^{WT}$  (iPS.MF.P4.WT) e  $CALR^{ins5}/TET2^{G898X}$  (iPS.MF.P4.mut). Em todos os experimentos realizamos a diferenciação com os controles  $CALR^{WT}/TET2^{WT}$  (iPS.CNT.WT). Dessa maneira, a iPSC cujo genótipo é  $CALR^{ins5}/TET2^{WT}$  foi utilizada como um “controle interno”, com o mesmo *background* genético que aquelas iPSCs com mutação no gene *TET2*, uma vez que ambas foram geradas do mesmo *pool* de células primárias do P4. Desse modo, podemos comparar ambas as iPSCs para inferir a influência da mutação em *TET2* na diferenciação hematopoiética.

Frequentemente se observa, nos estágios avançados da MF, um número aumentado dos progenitores CD34<sup>+</sup> mutados presentes na circulação dos pacientes resultando em quadros de eplénomegalia e hepatomegalia. Os progenitores hematopoiéticos podem ser

diretamente quantificados *in vitro* para estudar a capacidade de formação de CFU mieloides (Ery-P, CFU-G, CFU-M, CFU-GM, GEMM) em meio semissólido. Nessa possibilidade, os progenitores podem ser avaliados também em função do potencial de formação de colônias CFU-MK *in vitro* utilizando a técnica do coágulo plasmático. Em seu conjunto, a avaliação do potencial clonogênico dos progenitores hematopoiéticos permite, em parte, o entendimento da biologia da doença e torna-se necessário para estudar a influência das mutações nos precursores mieloides responsáveis pela expansão e fenótipo mieloproliferativo observado na MF.

Dentre as estratégias propostas para tal avaliação, induzimos neste trabalho a diferenciação hematopoiética *in vitro* a partir das iPS.MF.P4.WT, iPS.MF.P4.mut e iPS.CNT.WT.

Após diferenciação, os progenitores hematopoiéticos foram comparados quanto a sua capacidade de formar colônias CFU mieloides e MK diferenciados das iPSCs no dia 10 e 14 da diferenciação. Desse modo, no dia 10 da diferenciação hematopoiética, após 12 dias dos progenitores CD43<sup>+</sup>CD34<sup>+</sup> se diferenciar em cultivo semissólido em metilcelulose suplementado com o coquetel de citocinas hematopoiéticas, observamos que os mesmos foram capazes de gerar todos os tipos de colônias mieloides, cujas morfologias foram correspondentes às observadas no progenitores primitivos como mostrado em outros trabalhos . Portanto, identificamos primeiramente colônias eritroides primitivas (Ery-P) e colônias monocíticas (CFU-M). Em contraste, as células CD43<sup>+</sup>CD34<sup>+</sup> sortadas no dia 14 de cultura apresentavam colônias eritroides de tamanho maior, assim como um maior tamanho e número de progenitores da linhagem monocítica. Observamos também um aumento dos progenitores multilinhagem.

Os progenitores primitivos em todas as condições, incluindo aqueles portadores da mutação no gene *TET2*<sup>G898X</sup>, foram capazes de formar todos os tipos de colônias mieloides. Porém, quando quantificadas as colônias formadas a partir dos progenitores *TET2*<sup>G898X</sup> e avaliado se a mutação poderia influenciar o número final de colônias mieloides, não observamos aumento significativo quando comparados com os diferentes genótipos. Desse modo, os resultados sugerem que *TET2*<sup>G898X</sup> não estaria influenciando o número total de formação de colônias.

Além disso, quando avaliados os tipos de colônias, observamos um aumento significativo do número total de colônias granulocíticas diferenciadas a partir dos progenitores primitivos *CALR*<sup>ins5</sup>/*TET2*<sup>G898X</sup> quando comparados com os progenitores *CALR*<sup>ins5</sup>/*TET2*<sup>WT</sup> do paciente P4 assim como daqueles diferenciados a partir das

iPS.CNT.WT. Portanto, sugere-se que a mutação em *TET2* poderia estar impactando na formação da linhagem granulocítica, diferentemente dos progenitores *TET2*<sup>WT</sup>.

No mesmo experimento observamos ainda uma diminuição significativa do número de colônias monocíticas em ambos os genótipos dos progenitores diferenciados a partir das iPSCs derivadas do paciente P4, quando comparadas com o controle. Não observamos, no entanto, diferença significativa entre os diferentes clones do mesmo paciente. Este resultado sugere que o fenótipo observado depende da mutação em *CALR*, em vez de *TET2* mutado influenciar na diminuição das CFU-M.

As análises realizadas com células selecionadas no dia 14 da diferenciação hematopoiética, cos progenitores sorteados e avaliados 12 dias após plaqueamento em metilcelulose evidenciaram que os progenitores *CALR*<sup>ins5</sup>/*TET2*<sup>G898X</sup> apresentaram um aumento significativo do número total das colônias comparados com os diferenciados a partir daqueles *CALR*<sup>ins5</sup>/*TET2*<sup>WT</sup> ou *CALR*<sup>WT</sup>/*TET2*<sup>WT</sup>. Observamos também que o número de colônias monocíticas diferenciadas a partir dos progenitores *TET2*<sup>G898X</sup> aumentaram significativamente quando comparadas com o controle, mas não entre elas. Logo, o resultado poderia sugerir que as mutações *CALR*<sup>ins5</sup>/*TET2*<sup>G898X</sup> poderiam estar levando a um aumento da diferenciação monocítica a partir de precursores responsáveis pela segunda onda hematopoiética.

Os resultados observados nos experimentos tanto do dia 10 quanto do dia 14 foram consistentes com estudos anteriores realizados tanto *in vitro* quanto *in vivo* em modelos deficientes na expressão de *TET2*. Pronier e colegas mostraram que a depleção de *TET2* em células progenitoras CD34<sup>+</sup> humanas purificadas a partir de cordão umbilical de doadores saudáveis levou à interrupção da diferenciação eritróide e linfóide, promovendo, no entanto, a diferenciação monocítica mais que a diferenciação granulocítica (PRONIER et al., 2010).

A partir dos mesmos resultados, uma nova análise foi realizada visando entender se a mutação em *TET2*<sup>G898X</sup> poderia influenciar o número de formação de colônias CFU-M e/ou tamanho das mesmas no curso da cinética da diferenciação dos progenitores hematopoiéticos. Desse modo, foram comparados os resultados observados das colônias derivadas dos progenitores sorteados nos dias 10 e 14 em todos os genótipos acima descritos.

Nessa análise, observamos que os progenitores diferenciados das iPSCs controle diminuiriam significativamente o número total de colônias entre os dias 10 e 14, fato que poderia estar associado à diminuição da autorrenovação. No entanto, na análise dos progenitores que carregam a mutação *TET2*<sup>G898X</sup> observou-se um aumento do número total de colônias, sendo maior número as colônias CFU-M quando comparado com os progenitores *TET2*<sup>WT</sup>, sugerindo que *TET2*, quando mutado, poderia conferir uma maior capacidade de

autorrenovação dos progenitores sorteados no dia 14, influenciando, desse modo, o número final de colônias obtidas. Fenômenos semelhantes foram reportados por Pronier e cols e Delhommeau e cols em experimentos de diferenciação a partir de células progenitoras CD34+

Avaliamos também os resultados do número total de colônias CFU-M geradas nos diferentes dias, discriminando colônias de diferentes tamanhos. Tanto no caso dos progenitores do controle e os derivados do pacientes *CALR*<sup>ins5</sup>/*TET2*<sup>WT</sup>, quando analisados os tamanhos das colônias, observamos que não apresentavam diferença significativa entre os dias 10 e 14, porém mantiveram as proporções entre as colônias pequenas e grandes. Em contraste, pudemos verificar que, no caso dos progenitores *TET2*<sup>G898X</sup>, houve um aumento das colônias menores comparando os progenitores sorteados os dias 10 e 14. Apesar de observar um aumento no número de colônias, não observamos aumento do tamanho das mesmas.

Desse modo, poderíamos associar o tamanho das colônias com o potencial de proliferação desses progenitores como mostrado por Quivoron e colegas. Portanto, no caso do *TET2*, podemos sugerir que a mutação estaria influenciando no número total de progenitores (aumento do número de colônias), porém não no potencial de proliferação (tamanhos menores das colônias).

Sugerimos assim que outros experimentos, como o repique de colônias CFU-M em múltiplas passagens, devem ser realizados para entender se *TET2*<sup>G898X</sup> poderia estar influenciando o balanço entre a autorrenovação, a proliferação dos progenitores e a diferenciação daqueles progenitores na cinética de diferenciação.

O mesmo aumento na diferenciação monocítica foi observado em modelos animais deficientes de *TET2*. Ko e colegas observaram que as células progenitoras CD34<sup>+</sup> isoladas do camundongo deficientes de *TET2* cultivadas *in vitro* apresentavam um desvio da diferenciação para a linhagem monocítica quando na presença das citocinas SCF, TPO e GM-CSF. Os autores sugeriram que *TET2* poderia ter um papel na regulação da diferenciação, impedindo que os progenitores prematuros iniciem a diferenciação para monócitos/macrófagos (KO et al., 2011).

Além de mostrar que os progenitores deficientes de *TET2*, quando transplantados, eram capazes de reconstituir a hematopoiese completa. *TET2* mutado é encontrado em um amplo espectro de doenças que incluem a MDS (26%), MPN (37%), sendo mais frequentemente mutado nas CMML (50%) (TEFFERI *et al.*, 2009). Numerosos trabalhos têm correlacionado as mutações com perda da função em *TET2* com o aumento da linhagem monocítica observada na CMML (MORAN-CRUSIO, 2011).

Recentemente, mutações somáticas foram descobertas no gene da Calreticulina (*CALR*) (deleções ou inserções, entre outros). As mutações mais frequentes em *CALR* (em

cerca de 80% dos casos) são identificadas com deleções em 52pb classificadas como tipo 1 e inserção de 5pb classificada como tipo 2 (em cerca de 53% e 32% dos casos respectivamente) (KLAMPFL *et al.*, 2013). Ambos os tipos de mutações levam à modificação do extremo C-terminal da proteína que resulta em um aumento da afinidade pelo reconhecimento do domínio extracelular do receptor de trombopoietina (MPL), participando no transporte do mesmo à membrana citoplasmática e ativação constitutiva do receptor. A ativação constitutiva de vias de sinalização JAK-STAT e MAPKs é responsável pelo fenótipo observado nos pacientes que carregam as mutações em *CALR*, levando ao aumento de proliferação independente de citocinas e influenciando a diferenciação da linhagem megacariocítica nos pacientes com NMP, incluindo aqueles portadores de MF (BALDUINI *et al.*, 2011).

Posteriormente, para uma completa análise, o potencial clonogênico de formar colônias CFU-MK dos progenitores hematopoiéticos derivados das iPS.MF.P4 e um controle foi avaliada. Como descrito em vários trabalhos, mutações em *CALR* têm sido associadas ao desvio da diferenciação na linhagem megacariocítica em pacientes com ET e MF, é portanto, de grande importância avaliar a capacidade desses progenitores *CALR*<sup>ins5</sup> em combinação com *TET2*<sup>G898X</sup> na formação das colônias MK. Com esta finalidade, os progenitores sorteados no dia 10 da diferenciação foram cultivados em meio semissólido rico em fibrinogênio e, após 9 dias, foram quantificadas as colônias segundo o número de células que as compõem. A morfologia das colônias diferenciadas dos progenitores do paciente P4 apresentaram tamanhos maiores que aquelas diferenciadas do controle.

No caso das colônias diferenciadas a partir dos progenitores controle, observamos um aumento das colônias constituídas entre 3 e 10 células, quando comparadas com os progenitores *CALR*<sup>ins5</sup>/*TET2*<sup>WT</sup>. Resultado semelhante foi observado nas colônias diferenciadas dos progenitores *CALR*<sup>ins5</sup>/*TET2*<sup>G898X</sup>. Apesar dessa diferença, os progenitores *CALR*<sup>ins5</sup>/*TET2*<sup>WT</sup> foram os únicos que apresentaram um aumento na formação de colônias constituídas por mais de 50 células, comparando-se com os progenitores diferenciados de P4 *CALR*<sup>ins5</sup>/*TET2*<sup>G898X</sup> e dos progenitores controle. Esse resultado poderia estar associado à influência da mutação *driver* no gene *CALR* na formação de colônias MK. Em contrapartida, os progenitores *CALR*<sup>ins5</sup>/*TET2*<sup>G898X</sup> poderiam estar sendo influenciados pelas mutações em *TET2*, levando ao aumento da diferenciação monocítica, como discutido anteriormente.

No contexto da MF, o fenótipo biológico da doença depende, dentre outros fatores, do *status* mutacional nos pacientes. Em pacientes com mutações em *CALR* tipo 1 (*CALR*<sup>del52</sup>) ou tipo 2 (*CALR*<sup>ins5</sup>) se observa um aumento da linhagem megacariocítica e, em estágios mais avançados, aumento de granulócitos e de fibrose medular. Existem, no

entanto, diferenças fenotípicas entre ambos os tipos dois subtipos, como, por exemplo, em pacientes com mutações do tipo 1 se observa displasia dos MK na medula óssea, enquanto no tipo 2 observa-se aumento da produção de plaquetas não funcionais .

Os estudos da heterogeneidade clonal nos pacientes com NMPs têm sido associados à ordem de aquisição das mutações com os fenótipos observados dessas doenças. Tais estudos identificaram mutações nos genes *TET2* e *JAK2*<sup>V617F</sup> em pacientes com NMPs. Da análise de pacientes identificados como *TET2-first* observou-se aumento dos progenitores mieloides,. Não se observou, no entanto, alteração dos progenitores megacariocíticos e eritrocíticos (MEP).

Por outro lado, nos pacientes *JAK2-first* prevaleceu-se o aumento dos progenitores MEP. No entanto, o clone somente se expandiu após a aquisição da mutação no gene *TET2*. Esses resultados sugerem que *TET2* não parece influenciar a eritropoiese ou levar a um aumento das células MK. Entretanto, a mutação neste gene poderia ser o responsável pelo aumento granulomonocítico. Além disso, os autores deste trabalho mostraram que os clones carregando esta mutação aumentaram a capacidade de autorrenovação das HSPC (MORAN-CURSO et al 2011).

Um terceiro experimento que foi realizado no presente trabalho consiste na diferenciação das iPS em granulócitos. Esse experimento permite obter granulócitos *in vitro* com os diferentes genótipos identificados no *pool* das células primárias do paciente. A continuação, a partir dos GRs diferenciados, pode-se estudar o perfil epigenético e a influência dos genes mutados ou combinações dos mesmos tanto nas marcas epigenéticas quanto na expressão gênica.

No processo de reprogramação as células somáticas de pacientes sofrem hipometilação global e as marcas epigenéticas associadas à diferenciação são perdidas, adquirindo-se marcas epigenéticas relacionadas com o estado de pluripotência e autorrenovação. Embora haja um remodelamento epigenético, as mutações originais das células permanecem inalteradas. Os precursores hematopoiéticos rediferenciados a partir de cada iPS podem recapitular as marcas epigenéticas originais associadas à diferenciação, mantendo as mutações originais e, desta forma, isolando os efeitos das mutações nas marcas epigenéticas.

Sendo assim, o objetivo desse experimento foi obter os granulócitos para uma posterior análise de expressão gênica e estudo do *status* de metilação de promotores de genes alvos.

O processo de diferenciação hematopoiético *in vitro* de progenitores mielóides a partir de iPSC requer a sincronização da diferenciação dos múltiplos progenitores, fator crítico no sucesso do processo de diferenciação, além de outros fatores que também podem influenciar o resultado final do processo. A combinação de diferentes citocinas influencia o resultado final da diferenciação para células maduras. O G-CSF, por exemplo, leva à diferenciação de neutrófilos e, em combinação com IL-3 e IL-5, aumenta a população de eosinófilos. A diferenciação *in vitro* de granulócitos a partir de iPSC poderia apresentar uma população heterogênea de células tanto imaturas como mielócitos e promielócitos (MORISHIMA et al., 2010).

RAMAL e colegas, identificaram em uma coorte de pacientes com NMP, assinaturas de expressão gênica de pacientes que carregavam a mutação *driver*  $JAK2^{V617F}$  em diferentes *status* mutacionais (genótipos em heterozigose e homozigose), ou de pacientes que carregaram mutações em *CALR*. Em ambos os casos as assinatura gênica foram comparadas com doadores saudáveis. Quando analisadas as assinaturas, os autores, mostraram que todos eles compartilham a expressão de genes das vias de sinalização JAK-STAT, porém, nos pacientes com *CALR* observou-se uma alteração nos genes associados com o complexo de repressão policomb.

Além disso, dividiram a coorte de pacientes (tanto *JAK2* quanto *CALR* mutado) em dois grupos: os que carregavam mutações em *TET2*mut e os que apresentavam o genótipo *TET2*WT. A partir de amostras de GR primários foram analisados e comparados os perfis de expressão gênica. Nesse estudo, foram identificados 78 genes silenciados para os pacientes *TET2* mutado vs *TET2*WT. Entre os genes silenciados, incluem-se VEGF, CCRC2, SMAD7 e POU3F3, genes que estão associados à diferenciação hematopoiética, inflamação e sinalização, pluripotência, entre outros. Uma assinatura gênica em comum que correspondeu à diferenciação mieloide foi identificada nos pacientes com *TET2*mut (RAMAL ET AL 2011).

No presente trabalho observamos que para todos os genótipos das iPSC derivadas do paciente P4 foi possível induzir a diferenciação de granulócitos *in vitro*, portanto as mutações não influenciaram no processo de granulopoiese. Características fenotípicas em comum foram descritas até agora nos pacientes com MF que incluem anemia, esplenomegalia, granulócitos imaturos, incremento de células CD34<sup>+</sup>, fibrose medular e osteosclerose. Apesar de os pacientes com MF que carregam mutações em *CALR* apresentarem displasia, principalmente em megacariócitos, alguns trabalhos tem descrito alterações na população granulocítica de pacientes com MF .

Quando analisadas e quantificadas as diferentes populações de GR diferenciados *in vitro* a partir de uma das iPS derivada do paciente P4, observamos a presença tanto de células imaturas quanto de células maduras. Entre as maduras observamos principalmente um aumento de eosinófilos e de neutrófilos segmentados. Já na população imatura foram identificados os neutrófilos-bastonetes, meta-mielócitos e mielócitos. As mesmas populações também foram observadas nas células usadas como controle. Porém, à diferença do controle, nos granulócitos derivados do pacientes identificou-se uma população de células com características similares às células displásicas.

Posteriormente foi realizada uma comparação quanto ao imunofenótipo observado entre todas as populações de GR diferenciados *in vitro*. Para isso, foram comparados os tamanhos (FSC), das populações de granulócitos positivos para o marcador CD15 (marcador específico de GR) mas observamos diferenças significativas entre as amostras.

Feng e colegas avaliaram as características fenotípicas por citometria dos GR e monócitos de pacientes com MF e SMD-MF. Baseados na imunexpressão do antígeno de superfície CD56, que é expresso anormalmente na células displásicas mas não é expresso em células normais, a relação das marcações CD13/CD16 utilizado com marcador de maturação dos GR e monócitos, e os valores do SSC foram comparados os grupos de células correspondente a cada doença e ao controle (doador saudável). Os autores observaram que os granulócitos dos pacientes com MF apresentavam características displásicas com exceção do tamanho do granulócito, onde eles não observaram diferença no FSC, porém identificou-se diferença no SSC. Os valores foram menores quando comparados com as células dos pacientes com SMD-MF (FENG *et al.*, 2010). Outros trabalhos também têm avaliado as características fenotípicas de células displásicas por citometria (OUYANG *et al.*, 2015). Em alguns casos a aquisição de um fenótipo mielodisplásico poderia estar associada com um evento pre-leucêmico, ainda observado em pacientes com NMPs clássicas tratados com hidroxiureia (NISCHLE *et al.*, 2003).

Para todos os granulócitos derivados das iPSCs do paciente P4 e controle foi realizada a caracterização imunofenotípica dos granulócitos diferenciados *in vitro*, e, em todos os casos, observamos marcação positiva do antígeno CD15. À diferença dos granulócitos primários, os granulócitos diferenciados *in vitro* expressam outros marcadores, como o antígeno CD43. Ainda outra diferença é a ausência em alguns casos do marcador CD45, sendo que na rotina clínica este é o marcador mais frequentemente usado para poder separar as diferentes populações celulares (incluindo os granulócitos).

Por outro lado, a diferença poderia estar nos níveis de marcação classificados como baixos, intermediário e/ou altos. Contudo, para o caso dos granulócitos diferenciados *in vitro*, ainda se faz necessária a padronização de um conjunto de antígenos capazes de selecionar a população heterogênea de células que formam parte dos granulócitos, uma vez que os painéis utilizados para os granulócitos obtidos de pacientes não definem perfeitamente os granulócitos gerados *in vitro*. Os marcadores CD15 e CD16 são frequentemente utilizados em vários estudos na caracterização dos granulócitos obtidos tanto *in vitro* quanto *in vivo*.

O marcador CD43 é um antígeno identificado primeiramente nos progenitores hematopoiéticos em estágios precoces da diferenciação a partir de ES/iPSC. O marcador está coexpresso em conjunto com os antígenos de superfície CD41<sup>+</sup>, CD235a<sup>+</sup> e CD34<sup>+</sup> em progenitores hematopoiéticos primitivos ou definitivos (MEP). Nas populações dos progenitores mieloides em estágios mais diferenciados, assim como em células maduras derivadas de ES/iPSC, o antígeno CD43 se mantém altamente expresso, podendo estar coexpresso com os marcadores CD34 e CD45. Os marcadores CD43 e CD45 podem ainda estar expressos nas células maduras na diferença do marcador CD34, o qual é perdido gradualmente durante a maturação.

Na diferenciação granulocítica as células começam a expressar os marcadores CD15 e CD14, utilizados para identificação de populações mielomonocíticas. O marcador CD15 é expresso na etapa de expansão blástica, pro-mielócito e em fases avançadas da maturação dos neutrófilos (MORISHIMA *et al.*, 2010). No entanto, o marcador CD14 foi identificado também em granulócitos diferenciados *in vitro*, o que o torna pouco recomendado para uso como marcador para discernir entre as populações granulocíticas e monocíticas (SLUKVIN *et al.*, 2011).

Para identificação dos neutrófilos são utilizados os marcadores CD15, CD66b, CD11b, já no caso da população referente aos eosinófilos, esses marcadores não foram encontrados, em vez deles poderiam ser utilizado os marcadores CD123 e CD64. O marcador CD66b e CD16 começa a expressão nas células pró-mielocíticas, meta-mielocíticas até neutrófilos segmentados podendo se manter expresso também nos neutrófilos maduros com exceção do marcador CD16 (ELGHETANY *et al.*, 2002). Por fim, o marcador CD11b pode ser expresso na maioria das células a partir do dia 10 da diferenciação *in vitro* e expresso cerca do dia 30.

No presente trabalho observamos a marcação positiva para os antígenos de superfície CD15, CD11b e CD43 para todos os GR diferenciados *in vitro*. Esses resultados sugerem

que a diferenciação *in vitro* para granulócitos foi capaz de recapitular o processo da granulopoiese de uma maneira hierárquica como descrita em outros trabalhos.

A caracterização dos granulócitos permitirá dar continuidade à última etapa do presente trabalho que é o estudo das marcas epigenéticas que poderiam ser influenciadas pelos genes mutados *CALR* e o gene regulador epigenético *TET2* mutado. Desse modo, como perspectivas futuras temos proposto a realizar a análise do perfil epigenético dos granulócitos primários, e comparar com os granulócito diferenciados *in vitro* a partir das iPSCs. Todos os genótipos serão comparados para entender a influência de TET2 na reacquirição das marcas epigenéticas.

## 6. CONCLUSÕES

1) Todos os clones das iPSCs apresentaram as mutações originais caracterizadas nas células primárias dos pacientes. No caso dos pacientes P1, P3 e P6 observamos um único genótipo quando caracterizadas as iPSCs. Esses resultados poderiam sugerir que os clones dominantes correspondem aos genótipos identificados nos clones iPSCs, uma vez que P3 e P6 foram diagnosticados por adquirir LMA-s, e o paciente P1 apresentar uma alta frequência alélica de  $JAK2^{V617F}$ . Por outro lado, as iPSCs derivadas do paciente P2, P5 e P4 apresentaram uma maior diversidade clonal.

2) Esses resultados mostraram que as mutações não impediram a reprogramação das células do paciente. Além disso, a identificação dos diferentes genótipos dos clones permitiram inferir em alguns pacientes o clone dominante na evolução clonal da doença, e em outros a possível arquitetura clonal. O impacto da carga alélica de  $JAK2^{V617F}$  dos pacientes portadores dessa mutação assim como das mutações em *CALR* serão uma ferramenta valiosa para investigar o impacto biológico e mecanismos moleculares ainda não descritos dessas mutações *driver* na MF.

Por outro lado, o clone 5 iPSC derivado do paciente P5, que carrega a mutação somática em *ASXL1* e del20q, apresentou alteração na morfologia das colônias iPSCs. Esse resultado abre um novo caminho para investigar o papel da mutação em *ASXL1* na manutenção do estado de pluripotência e autorrenovação das iPSCs.

3) Os experimentos envolvendo a diferenciação *in vitro* das iPSCs em células hematopoiética do paciente P4 foram realizados para os clones portadores das mutações detectadas no gene *TET2* e *CALR*. Nos observamos que a mutação em *TET2* não impediu a diferenciação para geração dos progenitores hematopoiéticos. Além disso, quando avaliado o potencial clonogênico dos progenitores hematopoiéticos observamos que nas células que carregavam a mutação em *TET2* mutada, mas não as WT, apresentara uma vantagem na diferenciação das linhagens granulo-monocíticas. Os resultados foram consistentes com os evidenciados na literatura para as mutações de *TET2* com perda da função.

Contudo, pouco se sabe da influência das mutações de *TET2* em combinação com *CALR* mutada em pacientes com MF. Dessa maneira, nossos resultados poderiam contribuir com o melhor entendimento dos fenótipos associados ao *status* mutacional de *TET2* e *CALR* nesses pacientes.

4) Posteriormente, nos confirmamos que a mutação em *TET2* não interferiu na diferenciação granulocítica. A partir dos granulócitos diferenciados *in vitro* foram comparadas as alterações epigenéticas entre os granulócitos com diferentes genótipos, assim com nos granulócitos diferenciados a partir das piscas derivadas do controle. Ainda, foram comparados os granulócitos derivados *in vitro* a partir do paciente P4 e os granulócitos primários.

Em conjunto, esses resultados têm permitido recapitular em parte a arquitetura clonal dos pacientes. Assim como, recapitular o fenótipo observado em células deficientes de *TET2* identificado por outros grupos em modelos *in vitro* e *in vivo* dos pacientes com MF.

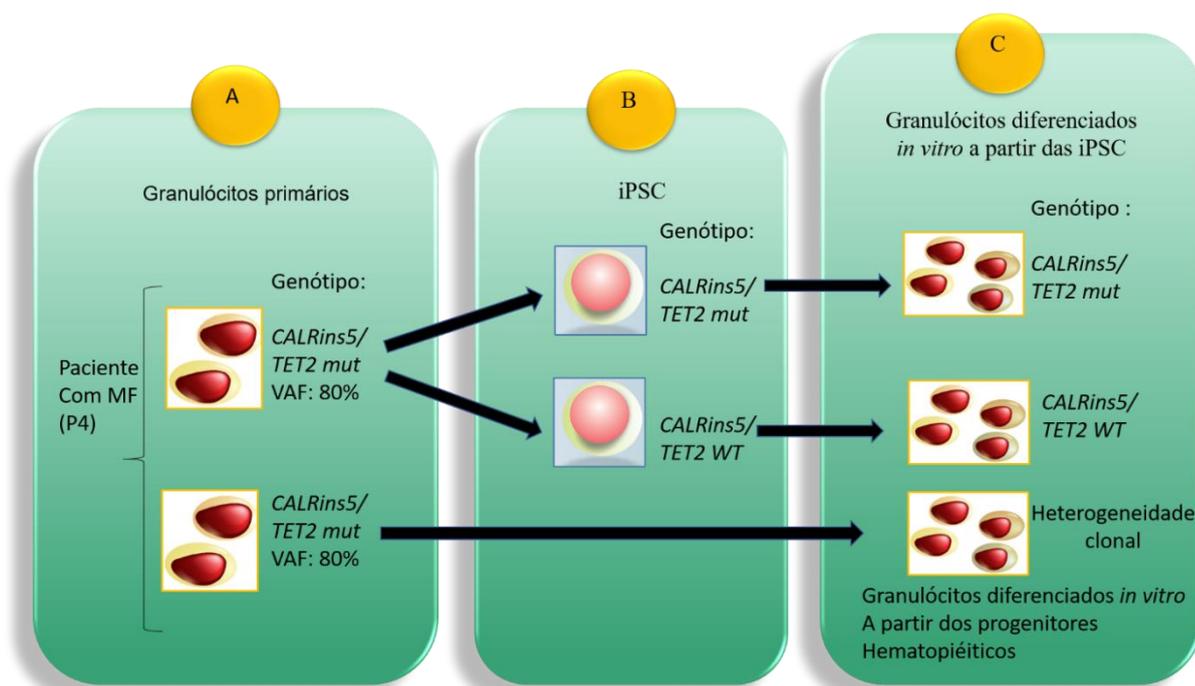
O estabelecimento das iPSCs paciente-específico oferece um modelo de estudo dos eventos iniciais da diferenciação hematopoiética e permite recapitular algumas das características da doença *in vitro*. Assim como, no presente projeto permitiu estudar as alterações epigenéticas influenciadas pela mutação em *TET2*.

## 7. PERSPECTIVAS FUTURAS

### ETAPA D - Ensaios epigenéticos

#### Ensaios epigenéticos

As marcas epigenéticas dos granulócitos primários isolados do paciente P4 foram comparadas com as de iPSCs derivadas do paciente (iPSC.controle, iPSC.MF.clone *TET2* mutados, iPSC.MF.clone *TET2* WT) e dos granulócitos diferenciados *in vitro* a partir das iPSC. Do mesmo modo foram comparadas as alterações entre os modelos *TET2*WT vs *TET2*mut (Figura 7.1).



**Figura 7.1. Esquema experimental para análise das alterações epigenéticas das células do paciente P4.** As alterações epigenéticas e de expressão gênica foram comparadas entre os grupos de células A (GR granulócitos primários), B (iPSC), C (granulócitos derivados das iPSC), como representado no esquema

## 8. REFERÊNCIAS

ABDEL-WAHAB O., *et al.* **Genetic analysis of transforming events that convert chronic myeloproliferative neoplasms to leukemias.** *Cancer Res.*, v. 70, n. 2, p.447-52. Jan. 15, 2010.

ABDEL-WAHAB O., *et al.* **A SXL1 Mutations Promote Myeloid Transformation Through Inhibition of PRC-Mediated Gene Repression.** *Cancer Cell*, v.22, n. 2, p. 180-193. Aug. 14, 2012.

ALSHEMMARI SH., *et al.* **JAK2V617F allele burden in patients with myeloproliferative neoplasms.** *Ann Hematol.* v.: 93, n.: 5, p.:791-6. May, 2014.

ALVAREZ S., *et al.* **DNA methylation profiles and their relationship with cytogenetic status in adult acute myeloid.** *Plos One*, v.5, n.8, p. e: 12197. 2010.

AMABILE G. AND MEISSNER A. *et al.* **Induced pluripotent stem cells: current progress and potential for regenerative medicine.** *Trends Mol Med.*, v. 15, n. 2, p. 59-68. Feb., 2009.

ANTONY-DEBRÉ I., *et al.* **Level of RUNX1 activity is critical for leukemic predisposition but not thrombocytopenia.** *Blood*, v. 125, n. 6, p. 930-40. Feb 5, 2015.

ARBER D. A., *et al.* **The 2016 revision to the World Health organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia.** *Blood*, v.127, n. 20, p. 2391-405. May 19, 2016.

BARBUI T., *et al.* **Problems and pitfalls regarding WHO-defined diagnosis of early/prefibrotic primary myelofibrosis versus essential thrombocytemia.** *Leukemia*, v.27, n. 10, p. 1953-8. Oct, 2013.

BAROSI G., *et al.* **Proposed criteria for the diagnosis of post-polycythemia vera and post-essential thrombocytemia myelofibrosis: a consensus statement from the International Working group for Myelofibrosis Research and Treatment.** *Leukemia.*, v.22, n. 2, p. 437-8. Feb., 2008.

BAXTER E.J *et al.* **Acquired mutation of the tyrosine kinase JAK2 in human myeloproliferative disorders.** *Lancet*, v. 365, n. 9464, p. 1054-61.

BECKER AJ, McCULLOCH EA, TILL JE. **Cytological demonstration of the clonal nature of spleen colonies derived from transplanted mouse marrow cells .** *Nature.* v.: 197, p:452-4. Feb 2, 1963.

BEER P. A., *et al.* **MPL mutations in myeloproliferative disorders: analysis of the PT-1 cohort.** *Blood*, v.: 112, n.: 1, p.: 141-9. Jul. 1, 2008.

BHUTANI, *et al.* **Reprogramming towards pluripotency requires AID-dependent DNA demethylation.** *Nature.* v.: 463, n.: 7284, p.:1042-1047, Fev. 2010.

BOISSET JC *et al.* **In vivo imaging of haematopoietic cells emergi.ng from the mouse aortic endothelium.** *Nature.* v. 464, n. 7285, p. 116-20. Mar 4, 2010.

BOULTWOOD J., *et al.* **Frequent mutation of the polycomb-associated gene ASXL1 in the myelodysplastic syndromes and in acute myeloid leukemia.** *Leukemia*, v. 24, n. 5, p. 1062-5. May 2., 2010.

CAMPOS P. *et al.* **Primary Myelofibrosis: current therapeutic options.** *Rev Bras Hematol Hemoter.*, v. 38, n. 3, p. 257-63. Jul-Sep. 2016.

CARBUCCIA N., *et al.* **Mutations of ASXL1 gene in myeloproliferative neoplasms.** *Leukemia*, v. 23, n. 11, p. 2183-6. Nov. 2009.

CARBUCCIA N. *et al.* **Mutual exclusion of ASXL1 and NMP1 mutations in a series of acute myeloid leukemia.** *Leukemia*, v. 24, n. 2, p. 469-73. Feb ., 2010.

CARNERO A. *et al.* ., **The PTEN/PI3K/AKT signalling pathway in cancer, therapeutic implications.** *Curr Cancer Drug Targets*.v. 8, n. 3. p:187-98. May 8, 2008.

CERVANTES F. *et al.* **Acute transformation in non leukemic chronic myeloproliferative disorders: actuarial probability and main characteristics in a series of 218 patients.** *Acta Haematol.*, v. 85, n. 3, p. 124-7. 1991.

CERVANTES F *et al.* **Myelofibrosis with myeloid metaplasia in adult individuals 30 years old or younger: presenting features, evolution and survival.** *Eur J Haematol.* v. 66, n., 5. p.:324-7. May, 2001.

CERVANTES F. , *et al.* . **How I treat myelofibrosis.** *Blood*, v.124, n. 7, p. 2635-2642. 2014.

CERVANTES F., *et al.* **New prognostic scoring system for primary myelofibrosis based on a study of the International Working Group for Myelofibrosis Research and Treatment.** *Blood*, v. 113, n. 13, p. 2895-901. Mar 26, 2009.

CHALLEN GA, *et al.* **Dnmt3a is essential for hematopoietic stem cell Differentiation.** *Nat Genet.* v. 44, n: 1, p: 23-31. Dec 4, 2011.

CHAN, *et al.* **KLF4 and PBX1 Directly Regulate NANOG Expression in Human Embryonic Stem Cells.** *Stem Cells.* v. 27, n. 9, p.2114-2125, set. 2009.

CHAO MP *et al.* **Human AML-iPSCs Reacquire Leukemic Properties after Differentiation and Model Clonal Variation of Disease .** *Cell Stem Cell.* v. 20, n.: 3, p.: 329-344.e7. Mar 2, 2017.

CHEN E., *et al.* . **Distinct Clinical Phenotypes associated with JAK2V617F Reflect Differential STAT1 Signaling.** *Cancer Cell*, v. 18, n. , p. 524-535. Nov. 16, 2010.

CHEN E. *et al.* **Distinct effects of concomitant Jak2V617F expression and Tet2 loss in mice promote disease progression in myeloproliferative neoplasms.** *Blood.* v.: 125, n.: , p.:327–35. Jan 8, 2015.

CHOI *et al.* . **Hematopoietic differentiation and production of mature myeloid cells from human pluripotent stem cells.** *Nature Protocols.* v. 6, n. 3, p.296-313, 17 fev. 2011.

CHOU W. C., *et al.* **Distinct clinical and biological features of de novo acute myeloid leukemia with additional sex comb-like 1 (ASXL1) mutations.** Blood, v. 116, n. 20, p.4086-94. Nov. 18, 2010.

CHOU W.C. *et al.* **TET2 mutation is an unfavorable prognostic factor in acute myeloid leukemia patients with intermediate-risk cytogenetics.** Blood, v. 118, n. 14, p. 3803-10. Oct. 16., 2011a.

CHOU B.K., *et al.* **Efficient human iPS cell derivation by non-integrating plasmid from blood cells with unique epigenetic and gene expression signatures.** v. 21, n. 3, p. 518-29. Mar., 2011b.

CLEVERS H. . **The cancer stem cell: premises, promises and challenges.** Nat Med. v. 17, n., 3, p., :313-9. Mar, 2011.

COSTA Y., *et al.* **NANOG-dependent function of TET1 and TET2 in establishment of pluripotency.** J. Nature. v.: 495, n.: 7441, p.: 370-4. Mar 21, 2013.

COYLE KM., *et al.* **Genetic Mutations and Epigenetic Modifications: Driving Cancer and Informing Precision Medicine.** Biomed Res Int. v. 2017, p., 1-18. Jun 8, 2017.

DAMESHEK W. **Some speculations on the myeloproliferative syndromes.** . Blood. v. 6, n.,4.p: :372-5.Apr, 1951.

DAO T., *et al.* **Hydroxymethylation as a Novel Enviromental Biosensor.** Curr Environ Health Rep., v. 1, n. 1, p. 1-10. Mar. 1, 2014.

De CARVALHO DD., *et al.* **DNA methylation and cellular reprogramming.** Trends Cell Biol. v.: 20, n.: 10., p.:609-17. Oct, 2010.

DELHOMMEAU F., *et al.* **TET2 Is a Novel Tumor Suppressor Gene Inactivated in Myeloproliferative Neoplasm: Identification of a Pre-JAK2 V617F Event.** Blood, v.112, n. 11, p. Iba-3. 2008.

DELHOMMEAU F. *et al.* **Mutation in TET2 in myeloid cancers.** N Engl J Med., v. 360, n.22, p. 2289-301. May. 28, 2009.

DOEGE C.A, *et al.* **Early-stage epigenetic modification during somatic cell reprogramming by Parp1 and Tet2 .** Nature, v. 488, p. 652-655. Aug 3., 2012.

DUFFY MJ. *et al* . **Mutant p53 as a target for cancer treatment.** Eur J Cancer. v. 83. p.,:258-265.Sep, 2017.

ECKSTEIN OS *et al.* **Mixed-phenotype acute leukemia (MPAL) exhibits frequent mutations in DNMT3A and activated signaling genes.** Exp Hematol. v. 44, n. 8. p:740-4. May 18, 2016.

ELGHETANY MT, PATEL J. **Assessment of CD24 expression on bone marrow neutrophilic granulocytes: CD24 is a marker for the myelocytic stage of development.** Am J Hematol. v.:71, n.: 4, p:348-9. Dec, 2002.

FIGUEROA M.E. *et al.* **Leukemic IDH1 and IDH2 mutations result in a hypermethylation phenotype, disrupt TET2 function, and impair hematopoietic differentiation.** *Cancer Cell*, v. 18, n. 6, p. 553-67. 2010.

FLYNN R, *et al.* **Targeting Syk-activated B cells in murine and human chronic graft-versus-host disease.** *Blood*. v.:125, n.: 26, p.:4085-94. Apr 7, 2015.

EL-SHARKAWI D., *et al.* **ASXL1 mutations are infrequent in young patients with primary acute myeloid leukemia and their detection has a limited role in therapeutic risk stratification.** *Lek Lymphoma*, v. 55, n. 6, p. 1326-31. Jan., 2014.

FENG, *et al.* **Aberrant Myeloid Maturation Identified by Flow Cytometry in Primary Myelofibrosis.** *American Journal Of Clinical Pathology*. v. 133, n. 2, p.314-320, Feb. 2010.

FISHER C.L., *et al.* **Additional sex combs-like 1 belongs to the enhancer of trithorax and polycomb group and genetically interacts with Cbx2 in mice.** *Dev Biol.*, v. 337, n. 1, p. 9-15. Jan. 1, 2010.

FISCHER C.L *et al.* **A human homolog of additional sex-combs, ADDITIONAL SEX COMS-LIKE1, maps to chromosome 20q11.** *Gene*, v.13, n. 306, p.115-26. Mar. 13, 2003.

GANGAT *et al.* **DIPPSS plus: refined Dynamic International Prognostic information from karyotype, platelet count, and transfusion status .** *J. Clin. Oncol.* v. 29, n. 4, p. 392-7. Feb. 1, 2011.

GELSI-BOYER V., *et al.* **Mutations in ASXL1 are associated with poor prognosis across the spectrum of malignant myeloid disease.** *J Hematol Oncol*, v. 5, n. 21. 2012.

GEORGE, E. L. *et al.* **Defects in mesoderm, neural tube and vascular development in mouse embryos lacking fibronectin.** *Development*. v.: 119, p. 1079–1091. 1993.

GRONER B. *et al.* **Jak Stat signaling and cancer: Opportunities, benefits and side effects of targeted inhibition.** *Mol Cell Endocrinol.* v. 451, n. 2017. p. 451:1-14. May 30, 2017.

HA J.S., *et al.* **Analysis of the Ten-Eleven Translocation 2 (TET2) gene mutation in myeloproliferative neoplasms.** *Ann Clin Lab Sci*, v.44, n. 2, p.173-9. 2014.

HANAHAHAN D., WEINBERG RA. **Hallmarks of cancer: the next generation.** *Cell*. n. 144, n. 5. p.:646-74. Mar 4, 2011.

HANAHAHAN D., WEINBERG RA. **The hallmarks of cancer.** *Cell*, v. 100, n. 1, p.:57-70. Jan 7, 2000.

HOSOI M., *et al.* **Generation of induced pluripotent stem cells derived from primary and secondary myelofibrosis patient samples.** *Exp Hematol.* v.: 42, n.: 9, p.:816-25. Sep, 2014.

HU K. *et al.* **All roads lead to induced pluripotent stem cells : The technologies of iPSC generation.** *Stem Cells Dev.*, v. 23, n. 12, p. 1285-300. Jun 15, 2014.

HU X., *et al.* **Tet and TDG Mediate DNA Demethylation Essential for Mesenchymal-to-Epithelial Transition in Somatic Cell Reprogramming .** *Cell Stem Cell* 14, v.13, n.4, p.512-22. Apr. 3, 2014.

HUNTLY BJ *et al.* **Leukaemia stem cells and the evolution of cancer-stem-cell research.** Nat Rev Cancer . v. 5, n., 4., p. :311-21. Apr, 2005.

IIZUKA H., *et al.* **Targeted gene correction of RUNX1 in induced pluripotent stem cells derived from familial platelet disorder with propensity to myeloid malignancy restores normal megakaryopoiesis.** Exp Hematol., v.43, n.10, p. 849-57. Oct., 2015.

ILCE, *et al.* **Cellular reprogramming: A new way to understand aging mechanisms.**Wiley Interdisciplinary Reviews: Developmental Biology. v.: 7, n.: 2, p.: 308-320, 19 jan. 2018.

ITO S., *e t al.* **Role of Tet proteins in 5mC to 5hmC conversion, ES-cell self-renewal and inner cell mass specification .** Nature, v. 466, n. 7310, p. 1129-33. Aug. 26, 2010.

ITO S., *et al.* **Tet proteins can convert 5-methylcytosine to 5-formylcytosine and 5-carboxylcytosine.** Science, v.333, n. 6047, p. 1300-3. 2011. Hematol., v: 89, n. 12, p. 1233-7. Dec., 2010.

JOANNE L., *et al.* **Epigenetic characterization of hematopoietic stem cell differentiation using miniChIP and bisulfite sequencing analysis.** PNAS. n.: 104, v.: 30, p.: 12371-12376. July, 2007.

KAMEDA T., *et al.* **Loss of TET2 has dual roles in murine myeloproliferative neoplasms: disease sustainer and disease accelerator.** Blood, v. 115, n. 2, p. 304-15. Jan 8., 2015.

KANG M., *et al.* **Positive regulation of additional sex comb-like1 gene expression by the pluripotency factor SOX2.** Biochem Biophys Res Commun, v. 421, n. 3, p. 621-6. May, 11, 2012.

KOH K.P., *et al.* **TET1 and TET2 regulate 5-hydroxymethylcytosine production and cell lineage specification in mouse embryonic stem cells.** Cell Stem Cell., v. 8, p. 200-213. 2011.

KJAER L, *et al.* **Differential Dynamics of CALR Mutant Allele Burden in Myeloproliferative Neoplasms during Interferon Alfa Treatment.** PLoS One. v. 11, n: 11, p:e0165336. Oct 20,2016.

KLAMPFL T. *et al.* **Somatic mutations of calreticulin in myelofibrosis neoplasms.** N Engl J Med, v. 369, n. 25, p. 2379-90. Dec. 19, 2013.

KO M. *et al.* **Impaired hydroxylation of 5-methylcytosine in myeloid cancers with mutant TET2.** Nature, v. 468, n. 7325, p. 839-43. Dec., 2010.

KOLLMAN K., *et al.* **A novel signaling screen demonstrates that CALR mutations activate essential MAPK signaling and facilitate megakaryocyte differentiation.** Leukemia. Doi: 10.1038/leu.2016.280., Dec 2, 2016.

KOLLMAN K., *et al.* **MARIMO cells harbor a CALR mutation but are not dependent on JAK2/STAT5 signaling.** Leukemia, v. 29, n. 2, p. 494-7. Feb, 2015.

KOLLMANN K. *et al.* **A novel signalling screen demonstrates that CALR mutations activate essential MAPK signalling and facilitate megakaryocyte differentiation.** Leukemia. v.; 31, n.: 4, p. :934-944. Oct 14, 2016.

- KRALOVICS R., et al . **A gain-of-function mutation of JAK2 in myeloproliferative disorders.** N Engl J Med. v.: 352, n.: 17, .p:1779-90. Apr 28, 2005.
- LANGABEER S.E., *et al.* **Molecular heterogeneity of familial myeloproliferative neoplasms revealed by analysis of the commonly acquired JAK2, CALR and MPL mutations.** Fam Cancer, v. 13, n. 4, p. 659-63. Dec, 2014.
- LANGEMEIJER S. M. *et al.* **Acquired mutations in TET2 are common in myelodysplastic syndromes .** Nat Genet, v. 41, n. 7, p. 838-42. Jul., 2009.
- LATAILLADE JJ *et at.* **Does primary myelofibrosis involve a defective stem cell niche? From concept to evidence.** Blood. v. 112, n. 8, p: :3026-35. Oct 15,2008.
- LEE J., *et al.* **Human Acute Myeloid Leukemia Reprogramming to Pluripotency Is a Rare Event and Selects for Patient Hematopoietic Cells Devoid of Leukemic Mutations.** Stem Cells. v.: 35, n: 9, p.:2095-2102. Sep, 2017.
- LEVINE R. L., *et al* . **Activating mutation in the tyrosine kinase JAK2 in polycythemia vera, essential thrombocythemia, and myeloid metaplasia with myelofibrosis.** C ancer Cell., v.7, n. 8, p. 673-683. Apr. 5, 2005.
- LI J. *et al.* **Regulatory mechanisms of tumor suppressor P16(INK4A) and their relevance to cancer.** Biochemistry. v.;50, n. 25. p.:5566-82. Jun 28, 2011.
- LIN T., *et al* . **p53 induces differentiation of mouse embryonic stem cells by suppressing Nanog expression.** Nat Cell Biol. v.: 7, n.: 2, p.:165-71. Dec 26, 2004. LIU Y., *et al.* **Reprogramming of MLL-AF9 leukemia cells into pluripotentstem cells.** Leukemia, v. 28, p. 1071–1080. 2014.
- LIM WF., *et al.* **Hematopoietic cell differentiation from embryonic and induced pluripotent stem cells.** Stem Cell Res Ther. v .: 4, n.: 3, p.: 71. Jun 18, 2013.
- LOENARZ C., SCHOFIELD C.J. **Oxygenase catalyzed 5-methylcytosine hydroxylation.** Chem Biol., v. 16, n. 6, p. 580-3. Jun. 26, 2009.
- LUNDBERG P., *et al.* **Clonal evolution and clinical correlates of somatic mutations in myeloproliferative neoplasms .** Blood, v. 123, n. 14, p. 2220-8. Apr. 3, 2014.
- MAGEE JA., *et al.* **Cancer stem cells: impact, heterogeneity, and uncertainty.** Cancer Cell. 20;21(3):283-96. Mar, 2012.
- MARTINEZ-AVILEZ L., *et al.* **TET2, ASXL-1, IDH1, IDH2 and c-CBL genes JAK2 and MPL-negative myeloproliferative.** Ann Hematol., v.91, n. 4, p. 533-41. Apr., 2012.
- MARTINEZ-TRILLOS *et al.* **Efficacy and tolerabuluty of hyroxiurea in the tratment of the hyperproliferative manifestations of myelofibrosis: results in 40 patients.** Ann Hematol.v.: 89, n.: 12, p.: 1233-7. Dec, 2010.
- MESA R. A., *et al.* **Leukemic transformation in myelofibrosis with myeloid metaplasia: single- institution experience with 91 cases.** Blood, v. 105, n. 3. p. 973-977.

MESA R.A *et al.* **Epidemiology of myelofibrosis, essential thrombocythemia, and polycythemia vera in the European Union.** Eur J Haematol, v. 92, n. 4, p. 289-97. Feb. 3, 2014.

METZELER K.H., *et al.* **TET2 mutations improve the new European Leukemia Net risk classification of acute myeloid leukemia : a Cancer and Leukemia Group B study .** J Clin Oncol, v. 29, n. 10, p. 1373-81. Apr., 2011.

MIKKOLA HK *et al.* **The journey of developing hematopoietic stem cells.** Development . v. 133. n. 19. p. 3733-44. Oct 2006.

MILLS K.I., *et al.* **Mutational spectrum defines primary and secondary myelofibrosis.** Hematologica, v.99, n. 1, p. 2-3. Jan., 2014.

MORAN-CRUSIO K., *et al.* **Tet2 loss leads to increased hematopoietic stem cells self-renewal and myeloid transformation.** Cancer Cell., v. 20, n. 10, p. 11-24. Jul 12, 2011.

MORISHIMA T., *et al.* **Neutrophil differentiation from human-induced pluripotent stem cells.** J Cell Physiol. n.: 226, n.: 5, p.:1283-91. May, 2011.

MOSCA M. *et al.* **Aspects biologiques de la voie JAK/STAT dans les néoplasmes myéloprolifératifs classiques négatifs pour BCR-ABL.** Bull Cancer; v. : 103, n.: 6, p.: S16–S282016. June. 2016.

MOSCHETTA M., *et al.* **BRCA somatic mutations and epigenetic BRCA modifications in serous ovarian cancer.** Ann Oncol. v.: 27, n.: 8, p.: 1449-55. Aug, 2016.

MOULARD O *et al.* **Epidemiology of myelofibrosis, essential thrombocythemia, and polycythemia vera in the European Union.** Eur J Haematol. V. 92, n. 4, p.:289-97. Feb 3, 2014.

NABEL, *et al.* **The Curious Chemical Biology of Cytosine: Deamination, Methylation, and Oxidation as Modulators of Genomic Potential.** Acs Chemical Biology. v.: 7, n.: 1, p.: 20-30, 31 Oct. 2011.

NABEL CS., *et al.* **AID/APOBEC deaminases disfavor modified cytosines implicated in DNA demethylation .** Nat Chem Biol. v.: 8, p.: 9.,p:751-8. Sep, 2012.

NAKAGAWA M., *et al.* **Generation of induced pluripotent stem cells without Myc from mouse and human fibroblasts .** Nat Biotechnol, v. 26, n. 1, p. 101-6. Jan, 2008.

NAKAHARA F *et al.* **The role of PML in hematopoietic and leukemic stem cell maintenance.** Int J Hematol. ;v.: 100, n.:1, p.:18-26. Feb 1, 2014.

NAN X *et al.* **Ras-GTP dimers activate the Mitogen-Activated Protein Kinase (MAPK) pathway.** Proc Natl Acad Sci U S A. 112(26):7996-8001. Jun 30, 2015.

NANGALIA J., *et al.* **Somatic CALR mutations in Myeloproliferative Neoplasms with Nonmutated JAK2.** N Eng J Med., v. 369, n. 25, p. 2391–2405p. Dez. 19, 2013.

NISCHAL S., *et al.* **Methylome Profiling Reveals Distinct Alterations in Phenotypic and Mutational Subgroups of Myeloproliferative Neoplasm.** *Cancer Res.*, v.73, n.3, p.1076-85. 2012.

NISHIKAWA, S. **Progressive lineage analysis by cell sorting and culture identifies FLK1+VE-cadherin+ cells at a diverging point of endothelial and hematopoietic lineages.** *Development.* v.: 125, p: 1747-1757. 1998.

NIWA A., *et al.* **A novel serum-free monolayer culture for orderly hematopoietic differentiation of human pluripotent cells via mesodermal progenitors.** *PLoS One.* v.: 6, p.: 7, :e22261. Jul 27, 2011.

OSBORN M., *et al.* **CRISPR/Cas9 Targeted Gene Editing and Cellular Engineering in Fanconi Anemia.** *Stem Cells*, DOI: 10.1089/scd.2016.0149. Dev. 2016.

OUYANG J, *et al.* **Flow cytometry immunophenotypic analysis of Philadelphia-negative myeloproliferative neoplasms: Correlation with histopathologic features.** *Cytometry B Clin Cytom.* v.: 88, n.: 4, p:236-43. Jul-Aug, 2015.

OUYANG, J. *et al.* **The clinical significance of negative flow cytometry immunophenotypic results in a morphologically scored positive bone marrow in patients following treatment for acute myeloid leukemia .** *American Journal Of Hematology.* v.: 90, n.: 6, p.: 504-510, 2 Abr. 2015.

PAPADANTONAKIS N., *et al.* **Megakaryocyte pathology and bone marrow fibrosis: the lysyl oxidase connection.** *Blood.* 30;v.:120, n.: 9, p.:1774-81. Aug , 2012. PAPP B., *et al.* **Epigenetics of Reprogramming to Induce Pluripotency.** *Cell*, v. 152, n. 6, p. 1324-1343. March. 14, 2013.

PEREZ C., *et al.* **Aberrant DNA methylation profile of chronic and transformed classic Philadelphia-negative myeloproliferative neoplasms.** *Haematologic*, v. 98, n. 9, p. 1414-20. Sep, 2013.

PFEIFER G.P. *et al.* **5-hydroxymethylcytosine and its potential roles in development and cancer.** *Epigenetic Chromatin*, v.6, n. 1, p. 10. May., 2013.

PRATCORONA M., *et al.* **Acquired mutations in ASXL1 in acute myeloid leukemia: prevalence and prognostic value.** *Hematological*, v. 97, n. 3, p. 388-392. 2012.

PASSAMONTI F *et al.* **JAK inhibitor in CALR-mutant myelofibrosis.** *N Engl J Med.* v. 370, n. 12, p.:1168-9. Mar 20, 2014.

PRICK J. *et al.* **Clonal heterogeneity as a driver of disease variability in the evolution of myeloproliferative neoplasms.** *Exp. Hematol.*, v. 42, n. 10, p. 752-762. 2014.

PROINER E., *et al.* **Inhibition of TET2-mediated conversion of 5-methylcytosine to 5-hydroxymethylcytosine disturbs erythroid and granulomonocytic differentiation of human hematopoietic progenitors.** *Blood.* V.: 118, n.: 9, p.:2551-5. Sep 1, 2011.

RAMPAL R., *et al.* **Genomic and functional analysis of leukemic transformation of myeloproliferative neoplasms.** Proc Natl Acad Sci USA., v. 111, n. 50, p. E5401-10. Dec. 16, 2014.

REUTHER G.W. **Recurring mutations in myeloproliferative neoplasms alter epigenetic regulation of gene expression.** Am J Cancer Res., v. 1, n. 6, p. 752-62. 2011.

ROLLISON DE *et al.* **Epidemiology of myelodysplastic syndromes and chronic myeloproliferative disorders in the United States, 2001-2004, using data from the NAACCR and SEER programs.** Blood. v. 112, n. 1, p. :45-52. Jul 1, 2008.

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

SALVAGIOTTO G., *et al.* **A defined, feeder-free, serum-free system to generate in vitro hematopoietic progenitors and differentiated blood cells from hESCs and hiPSCs.** PLoS One.v.: 6, n.: 3, p.:e17829. Mar 8, 2011.

SALIBA J., *et al.* **Heterozygous and homozygous JAK2(V617F) states modeled by induced pluripotent stem cells from myeloproliferative neoplasm patients.** PloS One, v.8, n. 9,p. e74257. Sep. 16, 2013.

SCHAUB F.X., *et al.* **Clonal analysis of TET2 and JAK2 mutations suggests that TET2 can be a late event in the progression of myeloproliferative neoplasms.** Blood, v.115, n. 10, p. 2003-2207.

SCHEUERMANN JC, *et al.* **Histone H2A deubiquitinase activity of the Polycomb repressive complex PR-DUB.** Nature. v.: 465, n. 7295, p:243-7. May 13, 2010. SHARMA S., *et al.* **Epigenetics in cancer.** Carcinogenesis. v.: 31, n.: 1, p.: 27-36. Jan, 2010.

SMITH A.E. *et al.* **Next-generation sequencing of the TET2 gene in 355 MDS and CMML patients reveals low-abundance mutant clones with early origins, but indicates no definite prognostic value .** Blood, v. 116, n. 19, p. 3923-32. Nov 11, 2010.

SOLARY E., *et al.* **The Ten-Eleven Translocation-2 (TET2) gene in hematopoiesis and hematopoietic diseases.** Leukemic, v. 28, n. 3, p. 485-96. 2014.

STEIN B.L., *et at.* **Disruption of the ASXL1 gene is frequent in primary, post-essential thrombocytosis and post-polycythemia vera myelofibrosis, but not essential thrombocytosis or polycythemia vera: analysis of molecular genetics and clinical phenotypes.** Haematologica, v. 96, n. 10, p. 1462-9. Oct., 2011.

STURGEON C.M., *et al.* **Wnt signaling controls the specification of definitive and primitive hematopoiesis from human pluripotent stem cells.** Nat Biotechnol. v. 32, n. 6, p. 554-61. Jun, 2014.

SWERDLOW *et al.* **The 2016 revision to the World Health organization classification of lymphoid neoplasms.** Blood, v.127, n. 20, p. 2375-90. May 19, 2016.

TADA M. *et al.* **Embryonic germ cells induce epigenetic reprogramming of somaticnucleus in hybrid cells.** EMBO J, v. 16, n. 21, p. 6510-20. Nov. 3, 1997.

TAKAHASHI K., *et al.* **Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors.** Cell, v. 126, n. 6, p. 663-76. Aug. 25, 2006.

TAKAHASHI K., *et al.* **Induction of pluripotent stem cells from human fibroblasts by defined factors.** Cell, v. 131, n. 5, p. 861-72. Nov. 30, 2007.

TAM CS., *et al.* **The role of cytogenetic abnormalities as a prognostic marker in primary myelofibrosis: applicability at the time of diagnosis and later during disease course.** Blood.v.: 113, n.:18, p.:4171-8. Apr 30, 2009.

TAVIAN M, PÉAULT B. **Embryonic development of the human hematopoietic system.** Int J Dev Biol. v.: 49, n.: 2-3, p.: 243-50. 2005.

TEFFERI A. **Pathogenesis of myelofibrosis with myeloid metaplasia.** J Clin Oncol., v. 23, n. 33, p. 8520-30. Nov. 20, 2005.

TEFFERI A., *et al.* **Epigenetic alterations and anti-epigenetic therapy in myelofibrosis.** Leuk Lymphoma, v. 49, n. 12, p. 2232-2. Dec. 9, 2008.

TEFFERI A, VARDIMAN JW. **Classification and diagnosis of myeloproliferative neoplasms: the 2008 World Health Organization criteria and point-of-care diagnostic algorithms.** Leukemia. v.: 22, n.: 1, p.:14-22. Jan, 2008.

TEFFERI A., SKODA R. e VARDIMAN J.W. **Myeloproliferative neoplasms: contemporary diagnosis using histology and genetics.** Nat. Rev. Clin. Oncol., v. 6, n. 10, p. 627-637. Nov. 6, 2009b.

TEFFERI et al. **The 2008 World Health Organization classification system for myeloproliferative neoplasms: order out of chaos.** Cancer, v. 115, n.17, p. 3842-3847. Sep. 1, 2009a.

TEFFERI A., *et al.* **Myeloproliferative neoplasms: contemporary diagnosis using histology and genetics.** Nat. Rev. Clin. Oncol., v. 6, n. 10, p. 627-637. Nov. 6, 2009b.

TEFFERI A., *et al.* **TET2 mutations an their clinical correlates in polycythemia vera, essential thrombocythemia an myelofibrosis.** Leukemia, v. 23, n. 5, p. 905-911. May., 2009c.

TEFFERI A, *et al.* **Myeloproliferative neoplasms: molecular pathophysiology, essential clinical understanding, and treatment strategies.** J Clin Oncol. v. 29, n.5. Jan 10, 2011.

TEFFERI A., *et al.* **CALR and ASXL1 mutations-based molecular prognostication in primary myelofibrosis: an international study of 570 patients.** Leukemia, v. 28, n. 7, p. 494-500. Jul., 2014a.

TEFFERI A., *et al.* **Polycythemia vera and essential thrombocythemia 2015 update on diagnosis risk-stratification and management.** Am J Hemato, v. 90, n. 2, p: 162-73. Feb, 2015.

TEFFERI A., *et al.* **Primary myelofibrosis 2017b update in diagnosis, risk stratification and management.** Am J Hematol., v.91, n:12, p:1262-1271. Dec., 2016.

THOMSON J.A. *et al.* **Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts.** Science, v. 282, n. 5391, p. 1145-7. Nov. 6, 1998.

TILL JE, MCCULLOCH EA, SIMINOVITCH L. **A stochastic model of stem cell proliferation, based on the growth of spleen colony-forming cells.** Proc Natl Acad Sci U S A. v.: 51, p.:29-36. Jan, 1964.

TURINETTO, V. *et al.* **Induced Pluripotent Stem Cells: Advances in the Quest for Genetic Stability during Reprogramming Process.** International Journal Of Molecular Sciences. v. 18, n. 12, p.1952-1970, 13 set. 2017.

UNGEWITTER , SCRABLE H. **Delta40p53 controls the switch from pluripotency to differentiation by regulating IGF signaling in ESCs.** Genes Dev. v.: 24, n.: 2, p.:2408-19. Nov 1, 2010.

VAINCHENKER W. *et al.* **JAK/STAT signaling in hematological malignancies.** Oncogene, v. 23, n. 32, p. 2601-13. May 23, 2013.

VAINCHENKER W. *et al.* **Recent advances in understanding myelofibrosis and essential thrombocythemia.** F1000Res. 5: F1000 Faculty Rev-700. Apr, 19. 2016.

VAINCHENKER W and KRALOVICS R., *et al.* **Genetic basis and molecular pathophysiology of classical myeloproliferative neoplasms.** Blood. v.:129, n.: 6, p.: 667-679. Feb 9, 2017.

van NIEKERK G *et al.* **Cancer stem cells: A product of clonal evolution?** Int J Cancer. v. 140, n., 5, p., :993-999. Mar 1, 2017.

VANNUCHI AM., *et al.* **A pathobiologic pathway linking thrombopoietin, GATA-1, and TGF-beta1 in the development of myelofibrosis.** Blood. v.: 105, n.: 9, p.:3493-501. May 1, 2005.

VANNUCHI A., *et al.* **JAK2 allele burden in the myeloproliferative neoplasms: effects on phenotype, prognosis and change with treatment.** Ther Adv Hemantol, v. 2, n. 1, p. 21-32. 2010.

VANNUCCHI AM., *et al.* **JAK2 Allele Burden in the Myeloproliferative Neoplasms: Effects on Phenotype, Prognosis and Change with Treatment.** Ther Adv Hematol. v.: 2, n.: 1, p.: 21-32. Feb, 2011.

VANNUCHI A.M., Biamonte F. **Epigenetics and mutations in chronic myeloproliferative neoplasms.** Hematological, v. 96, n. 10, p. 1398-402. Oct., 2011

VANNUCCHI AM., *et al.* **Mutations and prognosis in primary myelofibrosis.** Leukemia. v.: 27, n.: 9, p.: :1861-9. Sep, 2013.

VARDIMAN J W *et al.* **The 2008 revision of the World Health Organization (WHO) classification of myeloid neoplasms and acute leukemia: rationale and important changes.** Blood. v. 114, n., 5. p., 937-51. Jul 30, 2009.

VARRICCHIO L., *et al.* **Pathological interactions between hematopoietic stem cells**

**and their niche revealed by mouse models of primary myelofibrosis.** *Expert Rev Hematol.*, v.2, n. 3, p. 315-334. Jun 1, 2009.

VERSTOVSEK S *et al.* **A Double-Blind Placebo-Controlled Trial of Ruxolitinib for Myelofibrosis.** *The New England journal of medicine.*v. 366, n. 9, p:799-807. Mar 1, 2012.

VERSTOVSEK S *et al.* **A phase 1 study of the Janus kinase 2 (JAK2)V617F inhibitor, gandotinib (LY2784544), in patients with primary myelofibrosis, polycythemia vera, and essential thrombocythemia.** *Leuk Res.* v. 61., p:89-95. Aug 31, 2017.

WAGNER, WELCH. **Feeder-Free adaptation, culture and passaging of human iPS cells using complete Knockout Serum Replacement feeder-free medium.** *J Vis Exp.*, v. 41, pi:2236. Jul. 15, 2010b.

YAMANAKA S. **Pluripotency and nuclear reprogramming.** *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* v. 363. n. 1500. p. 2079-87. Jun 27, 2008.

YANG H, *et al.* **Gain of function of ASXL1 truncating protein in the pathogenesis of myeloid malignancies.** *Blood.* v. 131. n. 3. p. 328-341. Jan 18, 2018.

YANG W., *et al.* **The Stem Cells Research Community. In: YANG W. et al. iPSC Reprogramming from Human Peripheral Blood Using Sendai Virus Mediated Gene Transfer** .1. ed. re. ampl. Cambridge: Harvard Stem Cell Institute, Jan 10, 2012. p. 2008-2012.

YENER IB., *et al.* **Cellular reprogramming: A new way to understand aging mechanisms.** *Wiley Interdiscip Rev Dev Biol.* v.:7, n.: 2. doi: 10.1002/wdev.308. Mar, 2018.

YING SY., *et al.* **The miR-302-Mediated Induction of Pluripotent Stem Cells (iPSC): Multiple Synergistic Reprogramming Mechanisms.** *Methods Mol Biol.* v.:1733, p.: 283-304, 2018.

ZERBINI MCN *et al.* **Classificação dos tumores hematopoéticos e linfoides de acordo com a OMS: padronização da nomenclatura em língua portuguesa, 4ª edição.** *J. Bras. Patol. Med. Lab.* v. 47 n.6, p. 643-648. Dec, 2011.

ZHANG P., *et al.* **Loss of Asxl1 Alters Self-Renewal and Cell Fate of Bone Marrow Stromal Cell, Leading to Bohring-Opitz-like Syndrome in Mice.** *Stem Cell Reports.* v.: 6, p.: 6, p.: 914-25. Jun 14, 2016.

ZHANG XB. **Cellular reprogramming of human peripheral blood cells.** *Genomics Proteomics Bioinformatics.* v. 11, n. 5, p. 264-74. Oct, 2013.

ZHAO R, *et al.* **Implications of Genetic and Epigenetic Alterations of CDKN2A (p16 INK4a) in Cancer.** *EBioMedicine.* v. 8, p:30-39. Jun, 2016.

ZHAO W., *et al.* **JAK2V617F and p53 mutations coexist in erythroleukemia and megakaryoblastic leukemic cell lines.** *Exp Hematol Oncol.* v.: 1, n.: 1, p:15. Jun 21, 2012.

## 9. ANEXO

### 9.1. Anexos 1

Cartas de aprovação do CEP: do projeto original (2008) e do adendo (2012)

 MEMÓRIA DE ÉTICA <b>Memo 206/08-CEP-INCA</b>	 INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER Rio de Janeiro, 28 de julho de 2008.
<p>A(o): Dr(a) Ilana Zalberg Pesquisador(a) Principal</p>	
<p>Registro CEP nº 062/08 (Este nº. deve ser citado nas correspondências referentes a este estudo) Título do Estudo: Análise molecular de mutações da tirosina cinase JAK2 e de possíveis alvos de intervenção farmacológica nas doenças mieloproliferativas</p>	
<p>Prezada Pesquisador,</p>	
<p>Informo que o Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto Nacional de Câncer aprovou após re-análise, o estudo intitulado: <b>Análise molecular de mutações da tirosina cinase JAK2 e de possíveis alvos de intervenção farmacológica nas doenças mieloproliferativas (protocolo versão de julho/2008)</b>, bem como o seu Termo de Consentimento Livre e Esclarecido para doadores de medula óssea (versão 1), Termo de Consentimento Livre e Esclarecido para doadores de sangue (versão 2), Termo de Consentimento Livre e Esclarecido para coleta prospectiva de amostras (versão 2) e Termo de Consentimento Livre e Esclarecido para análise retrospectiva de amostras (versão 1), em 21 de julho de 2008.</p>	
<p>Ressalto que conforme descrito na folha de rosto (item 49), o pesquisador responsável deverá apresentar relatórios semestrais a respeito do seu estudo. As datas previstas são: <i>janeiro/2009 e julho/2009</i>.</p>	
<p>A documentação pertinente será encaminhada a CONEP com vistas a registro e arquivamento.</p>	
<p>Atenciosamente,</p> Dr. Carlos Henrique D. Silva Coordenador Substituto do Comitê de Ética em Pesquisa CEP-INCA	
<p>C/c - Dra. Eliana Abdelhay - Chefe do Serviço de Atividades Laboratoriais - CEMO Dr. Luis Fernando Bouzas - Diretor do CEMO</p>	



- Novas marcações  
- Haplótipo 46/Δ



A(o): Dr(a) Ilana Zalberg  
Pesquisador(a) Principal

Rio de Janeiro, 22 de maio de 2012.

Registro CEP n° 062/08 (Este n°. deve ser citado nas correspondências referentes a este estudo)  
Título do Estudo: Análise molecular de mutações da tirosina cinase JAK2 e de possíveis alvos de intervenção farmacológica nas doenças mieloproliferativas

Prezada Pesquisador,

Informo que o Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto Nacional de Câncer analisou e aprovou a Emenda JAK2 130312 e o Anexo I Metodologia 130312, relacionados ao estudo acima, em sua reunião de 14 de maio de 2012.

Atenciosamente,

Dr. Carlos Henrique D. Silva  
Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa  
CEP-INCA

INCA

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER



MINISTÉRIO  
DA SAÚDE

**TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO  
(para doadores de sangue)**

**“Modelagem *in vitro* de neoplasias mieloproliferativas através da reprogramação celular e diferenciação hematopoiética de amostras de pacientes”**

**Nome do Voluntário:** \_\_\_\_\_

Você está sendo convidado(a) a participar de um projeto de pesquisa na condição de doador saudável.

**ESCLARECIMENTOS**

As doenças mieloproliferativas crônicas (DMPC) são doenças em que ocorre aumento do número de células do sangue, incluindo células vermelhas e/ou plaquetas. As principais doenças que compõem esse grupo são a policitemia vera (PV), a trombocitemia essencial (TE), a mielofibrose primitiva (MF) e a leucemia mielóide crônica (LMC). Alterações no DNA (mutações) foram descobertas em alguns pacientes com DMPC, mas no caso da PV, TE e MF ainda não se entende completamente como estas alterações contribuem para o desenvolvimento da doença. Nos pacientes que não possuem essas mutações, outros fatores, ainda não conhecidos, podem ser responsáveis pela doença.

Como seu quadro clínico é compatível com a condição de um **doador saudável de sangue**, estamos convidando você a participar deste estudo. Você não tem qualquer indício de possuir a doença e justamente por isso pretendemos utilizar sua amostra biológica como doador controle saudável. O material doado servirá como controle, ao ser comparado com o material dos pacientes participantes do estudo.

**OBJETIVOS**

O objetivo deste projeto é criar em laboratório um modelo de células que sejam semelhantes às células dos pacientes com DMPC para estudar o papel das mutações já conhecidas, descobrir novas alterações envolvidas na(s) doença(s) e testar potenciais novos medicamentos.

**PROCEDIMENTOS DO ESTUDO**

Ao término da sua doação de sangue, uma pequena quantidade da amostra de equivalente a 3 colheres de sopa cheias, será enviada ao laboratório para ser analisada. Este procedimento não comprometerá a sua doação nem qualquer outro teste ao qual o seu sangue é submetido normalmente após a doação.

Após a coleta, as células brancas do sangue coletado serão manipuladas geneticamente em laboratório, recebendo genes que permitem a estas células serem classificadas agora como pluripotentes, ou seja, tenham potencial de se diferenciar em outros tipos de células, do sangue ou não. Estas células são chamadas de iPS (células de pluripotência induzida).

Avaliaremos também algumas características genéticas das células do seu sangue e das iPS geradas a partir delas, como a presença de mutações e outras alterações no DNA.

Estas células serão utilizadas em ensaios de laboratório para a avaliação de características das doenças estudadas neste projeto, além de testes laboratoriais de novos medicamentos atualmente em desenvolvimento, para avaliar sua eficiência.

As iPS serão mantidas para estudo sem que seja revelado em momento algum o a identidade do doador das células.

Anexo 7 – adendo projeto 62/08. Versão 05/03/2012

**RISCOS**

Como coletaremos o sangue durante a fase de doação, este procedimento não trará qualquer risco para você, uma vez que não será necessário fazer uma punção adicional. Os riscos são os mesmos presentes na doação de sangue que você já concordou em realizar.

**BENEFÍCIOS**

Não haverá nenhum benefício imediato para o Sr.(a). Entretanto, com sua participação no estudo, o Sr.(a) estará contribuindo para um melhor conhecimento da policitemia vera (PV), a trombocitemia essencial (TE) e mielofibrose idiopática (MI), o que pode gerar no futuro melhores tratamentos para estas doenças.

**CUSTOS**

Para participar dessa pesquisa o(a) senhor(a) não terá nenhuma despesa e nem receberá pagamento pela doação do material biológico (sangue ou derivados).

**NATUREZA DA PARTICIPACAO**

1) A participação no estudo é livre e voluntária. O(a) senhor(a) não sofrerá nenhuma penalidade caso não queira participar. Caso queira participar, tem a liberdade de tirar o seu consentimento e deixar de participar do estudo a qualquer momento, sem penalidades ou perda de benefícios aos quais você tem direito.

2) A participação no estudo é confidencial: a identidade dos doadores será mantida em sigilo. Além da equipe de saúde envolvida na coleta e análise do seu sangue, seus registros médicos poderão ser consultados pelo Comitê de Ética em Pesquisa do INCA e equipe de pesquisadores envolvidos. Seu nome não será revelado ainda que informações de seu registro médico sejam utilizadas para propósitos educativos ou de publicação científica, que ocorrerão independentemente dos resultados obtidos.

3) Qualquer dúvida poderá ser esclarecida pela pesquisadora responsável pelo estudo. Nós estimulamos a você ou seus familiares a fazerem perguntas a qualquer momento do estudo. Neste caso, por favor, ligue para a **Dra Ilana Zalberg Renault**, chefe do Laboratório de Biologia Molecular situado na Unidade Laboratorial do CEMO-INCA, 6 andar do Hospital do Câncer I - Praça da Cruz Vermelha, 23, telefone 3207-1506.

Se você tiver perguntas com relação a seus direitos como participante do estudo de pesquisa, também pode contar com um terceiro contato imparcial, o **Dr Carlos Henrique Debenedito Silva**, do Comitê de Ética em Pesquisa do INCA, na Rua André Cavalcante, 37, 2º andar, telefone: 3207-6551.



### TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (para pacientes)

“Modelagem *in vitro* de neoplasias mieloproliferativas através da reprogramação celular e diferenciação hematopoiética de amostras de pacientes”

Nome do Voluntário: \_\_\_\_\_

Você está sendo convidado(a) a participar de um projeto de pesquisa.

#### ESCLARECIMENTOS

As doenças mieloproliferativas crônicas (DMPC) são doenças em que ocorre aumento do número de células do sangue, incluindo células vermelhas e/ou plaquetas. As principais doenças que compõem esse grupo são a policitemia vera (PV), a trombocitemia essencial (TE), a mielofibrose primitiva (MF) e a leucemia mieloide crônica (LMC). Alterações no DNA (mutações) foram descobertas em alguns pacientes com DMPC, mas no caso da PV, TE e MF ainda não se entende completamente como estas alterações contribuem para o desenvolvimento da doença. Nos pacientes que não possuem essas mutações, outros fatores, ainda não conhecidos, podem ser responsáveis pela doença.

#### OBJETIVOS

O objetivo deste projeto é criar em laboratório um modelo de células que sejam semelhantes às células dos pacientes com DMPC para estudar o papel das mutações já conhecidas, descobrir novas alterações envolvidas na(s) doença(s) e testar potenciais novos medicamentos.

#### PROCEDIMENTOS DO ESTUDO

Ao término da sua doação de sangue, o mesmo será filtrado em um dispositivo que retém as células brancas do sangue, chamados de leucócitos. Este procedimento é realizado de forma rotineira e permite que as células vermelhas do sangue sejam destinadas aos receptores que os necessitam. O destino do filtro de leucócitos normalmente é o lixo e pedimos sua autorização para aproveitar as células que ficam retidas neste dispositivo e que normalmente seriam descartadas. Este procedimento não comprometerá a sua doação nem qualquer outro teste ao qual o seu sangue é submetido normalmente após a doação.

Outra forma de participar é autorizar o uso na pesquisa da bolsa de sangue obtida durante a sangria, que é feita como parte do tratamento, e que seria descartada normalmente.

Após a coleta, as células brancas do sangue coletado serão manipuladas geneticamente em laboratório, recebendo genes que permitem a estas células serem classificadas agora como pluripotentes, ou seja, tenham potencial de se diferenciar em outros tipos de células, do sangue ou não. Estas células são chamadas de iPS (células de pluripotência induzida).

Avaliaremos também algumas características genéticas das células do seu sangue e das iPS geradas a partir delas, como a presença de mutações e outras alterações no DNA.

Estas células serão utilizadas em ensaios de laboratório para a avaliação de características da doença, além de testes laboratoriais de novos medicamentos atualmente em desenvolvimento, para avaliar sua eficiência.

As iPS serão mantidas para estudo sem que seja revelado em momento algum o a identidade do doador das células.

#### RISCOS

Não haverá outros riscos senão aqueles já previstos na coleta de material que seria realizada normalmente para exame ou sangria terapêutica, ao qual o(a) senhor(a) se submete normalmente.

No caso da utilização de material de sangria, não há qualquer risco adicional, uma vez que o material seria descartado normalmente.



A Comissão de Ética e Pesquisa do Instituto Nacional de Câncer aprovou este estudo, considerando-o ético e seguro, seguindo as exigências da Legislação Brasileira.

#### **BENEFÍCIOS**

Não haverá benefício direto para o(a) senhor(a). Os benefícios principais da sua participação neste estudo seriam o aumento do conhecimento sobre as doenças estudadas e a possibilidade de desenvolvimento de novas terapias, que beneficiariam outros pacientes no futuro.

#### **CUSTOS**

Para participar dessa pesquisa o(a) senhor(a) não terá nenhuma despesa e nem receberá pagamento pela doação do material biológico (sangue ou derivados).

#### **NATUREZA DA PARTICIPAÇÃO**

1) A participação no estudo é livre e voluntária. O(a) senhor(a) não sofrerá nenhuma penalidade caso não queira participar. Caso queira participar, tem a liberdade de tirar o seu consentimento e deixar de participar do estudo a qualquer momento, sem que isto traga prejuízo à continuidade do meu tratamento.

2) A participação no estudo é confidencial: a identidade dos pacientes e doadores será mantida em sigilo.

3) Qualquer dúvida poderá ser esclarecida pela pesquisadora responsável pelo estudo. Nós estimulamos a você ou seus familiares a fazerem perguntas a qualquer momento do estudo. Neste caso, por favor, ligue para a **Dra Ilana Zalberg Renault**, chefe do Laboratório de Biologia Molecular situado na Unidade Laboratorial do CEMO-INCA, 6 andar do Hospital do Câncer I - Praça da Cruz Vermelha, 23, telefone 3207-1506.

Se você tiver perguntas com relação a seus direitos como participante do estudo de pesquisa, também pode contar com um terceiro contato imparcial, o **Dr Carlos Henrique Debenedito Silva**, do Comitê de Ética em Pesquisa do INCA, na Rua André Cavalcante, 37, 2º andar, telefone: 3207-6551.

**DECLARAÇÃO DE CONSENTIMENTO E ASSINATURA**

Eu, ....., abaixo assinado, tendo sido devidamente esclarecido sobre todas as condições que constam deste documento, que trata do projeto intitulado "Modelagem *in vitro* de neoplasias mieloproliferativas através da reprogramação celular e diferenciação hematopoiética de amostras de pacientes", que tem como pesquisador responsável a Dra. Ilana Zalberg Renault (tel:3207-1506), especialmente no que diz respeito ao objetivo da pesquisa, aos procedimentos aos quais serei submetido, aos riscos e benefícios, bem como a forma de indenização por danos decorrentes da pesquisa, declaro ter pleno conhecimento dos direitos e das condições que me foram assegurados. Declaro, ainda, que concordo inteiramente com as condições que me foram apresentadas e que, livremente, manifesto a minha vontade em participar do referido projeto.

Rio de Janeiro, de de 20

\_\_\_\_\_  
(Nome do Doador – letra de forma )

\_\_\_\_\_  
(Assinatura do Doador)

\_\_\_\_\_  
(Dra. Ilana Zalberg Renault - PESQUISADOR RESPONSÁVEL)

9.4. Anexo 4  
Tess de micoplasma

**Tabela 9.1. Valores dos test de micoplasma dascélulas utilizadas para reprogramar e das iPSCs geradas.**

Tipo de célula	Controle	Reading A (RA)	Reading B (RB)	Myco.Alert™ ratio (RB/RA)	Resultado
Ert P1		4407	2007	0,455	<b>Negativo</b>
Ert P2		1986	987	0,496	<b>Negativo</b>
Ert P3		14435	4489	0,310	<b>Negativo</b>
Ert CNT1		638	484	0,758	<b>Negativo</b>
	Controle negativo	1181	245	0,207	
	Controle positivo	1011	21083	20,853	
Ert P4		346	223	0,644	<b>Negativo</b>
Ert P5		325	271	0,833	<b>Negativo</b>
CD34 P6		2992	1956	0,653	<b>Negativo</b>
Ert CNT2		1096	735	0,670	<b>Negativo</b>
	Controle negativo	739	210	0,284	
	Controle positivo	1371	19327	14,097	
iPS- P1		1663	711	0,427	<b>Negativo</b>
iPS-P2		7578	2713	0,358	<b>Negativo</b>
iPS-CNT1		5761	2979	0,517	<b>Negativo</b>
iPS-P4		667	503	0,754	<b>Negativo</b>
iPS-CNT2		4887	2154	0,440	<b>Negativo</b>
iPS-P5		8800	3029	0,344	<b>Negativo</b>
	Controle negativo	739	210	0,284	
	Controle positivo	1371	1987	1,449	
iPS-P3		5795	2115	0,42	<b>Negativo</b>
	Controle negativo	2642	310	0,12	
	Controle positivo	5407	80808	14,94	
iPS-P6		1108	870	0,785	<b>Negativo</b>
	Controle negativo	585	75	0,13	
	<b>Controle positivo</b>	1147	25692	22,4	

9.5. Anexo 5

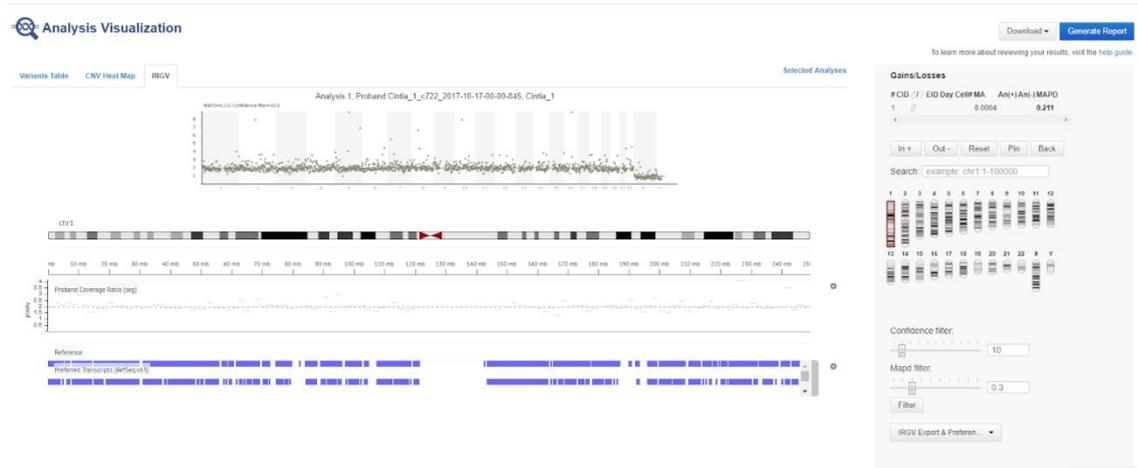
**Tabela 9.2. Lista de genes correspondentes à região deletada do cromossomo 20q**

SPATA25	CTSA	LOC107985388	MMP9	SLC12A5	CD40
NEURL2	PLTP	ZNF335	SLC12A5	NCOA5	ELMO2
MYLK2	LOC105372714	NNAT	CTNBL1	KIAA1755	WFDC5
FOXS1	BPIFA2	SRC	BLCAP	BPI	WFDC12
DUSP15	BPIFA3	GHRH	MANBAL	LBP	PI3
TTLL9	BPIFA1	MROH8	RPN2	RALGAPB	SEMG1
PDRG1	BPIFB1	SLA2	NDRG3	ARHGAP40	SEMG2
XKR7	CDK5RAP1	TGIF2	C20orf24	SLC32A1	SLPI
CCM2L	SNTA1	TGIF2	TGIF2-C20orf24	ACTR5	MATN4
HCK	CBFA2T2	CNBD2	EPB41L1	PPP1R16B	RBPJL
TM9SF4	NECAB3	PHF20	SCAND1	FAM83D	SDC4
GGT7	C20orf144	DEFB115	PLAGL2	DHX35	SYS1
ACSS2	ACTL10	DEFB116	ASXL1	LOC100128988	TP53TG5
GSS	E2F1	DEFB118	NOL4L	TOP1	DBNDD2
MYH7B	PXMP4	DEFB121	C20orf203	PLCG1	WFDC2
TRPC4AP	ZNF341	DEFB123	COMMD7	ZHX3	SPINT3
PROCR	CHMP4B	DEFB124	DNMT3B	LPIN3	WFDC6
EIF6	RALY	REM1	MAPRE1	EMILIN3	EPPIN-WFDC6
FAM83C	EIF2S2	HM13	EFCAB8	CHD6	EPPIN
UQCC1	ASIP	LOC107985416	SUN5	PTPRT	WFDC8
GDF5	AHCY	ID1	BPIFB2	SRSF6	WFDC9
CEP250	AHCY	COX4I2	BPIFB6	L3MBTL1	WFDC10A
ERGIC3	ITCH	TPX2	BPIFB4	SGK2	WFDC11
CPNE1	LOC107985381	IFT52	MYBL2	GTSF1L	WFDC10B
RBM12	ITCH	TOX2	JPH2	OSER1	WFDC13
ROMO1	DYNLRB1	GDAP1L1	HNF4A	SERINC3	WFDC3
RBM39	MAP1LC3A	FITM2	TTPAL	KCNK15	SPINT4
AAR2	PIGU	R3HDML	WISP2	RIMS4	DNTTIP1
DLGAP4	TP53INP2	ADA	YWHAB	ZNF334	OCSTAMP
MYL9	NCOA6	TOMM34	SNX21	SLC13A3	CEBPB
DSN1	SOGA1	TNNC2	TP53RK	CEBPB	LINC01272
SAMHD1	RBL1	CDH22	SLC2A10	LINC01272	FAM65C
TGM2	KIAA1755	SLC35C2	EYA2	FAM65C	PARD6B
BPI	GDAP1L1	SULF2	ZMYND8	PARD6B	BCAS4
LBP	STK4	PTGIS	NCOA3	BCAS4	ADNP
CTNBL1	VSTM2L	B4GALT5	PFDN4	ADNP	DPM1
TTI1	RPRD1B	SPATA2	DOK5	DPM1	MOCS3
KCNG1	ZFP64	RNF114	SALL4	BCAS1	PFDN4
NFATC2	TSHZ2	SNAI1	ZFP64	CYP24A1	DOK5
ATP9A	ZNF217	UBE2V1			

## 9.6. Anexo 6

### Análise de ploidia

#### iPSMF.P1.1

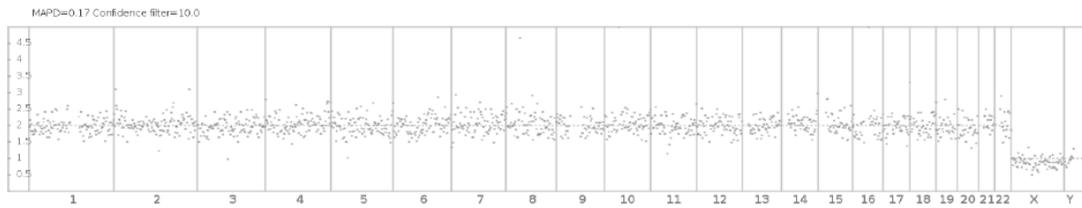


#### iPSMF.P2.10

#	CID	♂/♀	ED	Day	MA	An(+)	An(-)	MAPD
1		♂			0.0007			0.17

#### Whole Genome View

#### Analysis 1, Sample 6\_v5\_f60b03fd-41ff-4934-ab92-132e1e5c6d97

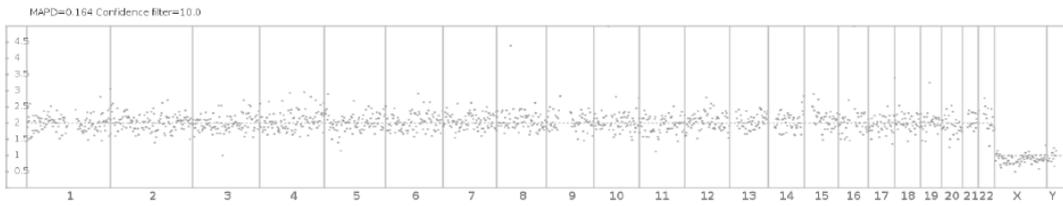


iPSMF.P2.18

#	CID	$\sigma^2/\eta$	EID	Day	MA	An(+)	An(-)	MAPD
1		$\sigma^2$			0.0006			0.164

Whole Genome View

Analysis 1, Sample\_5\_v5\_c9e03ff6-f684-42e3-b13c-9ee63eea1c5c

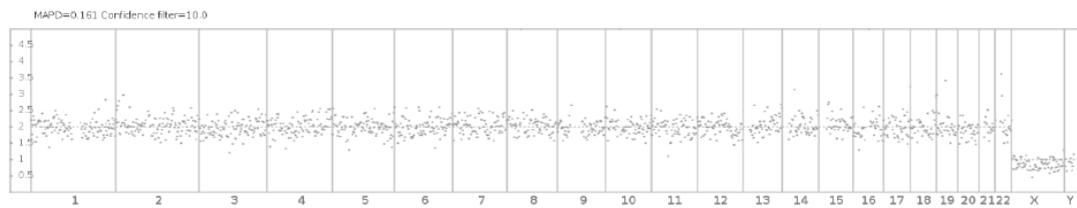


iPSMF.P3.17

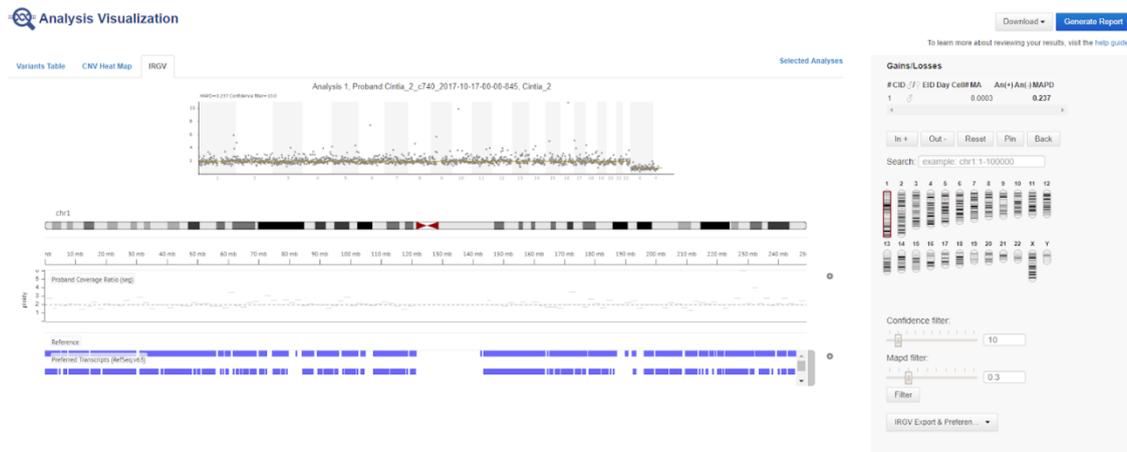
#	CID	$\sigma^2/\eta$	EID	Day	MA	An(+)	An(-)	MAPD
1		$\sigma^2$			0.0006			0.161

Whole Genome View

Analysis 1, Sample\_3\_v5\_aa7538be-173c-4b19-893a-b3db764e40f3



## iPSMF.P4.5



## iPSMF.P4.7

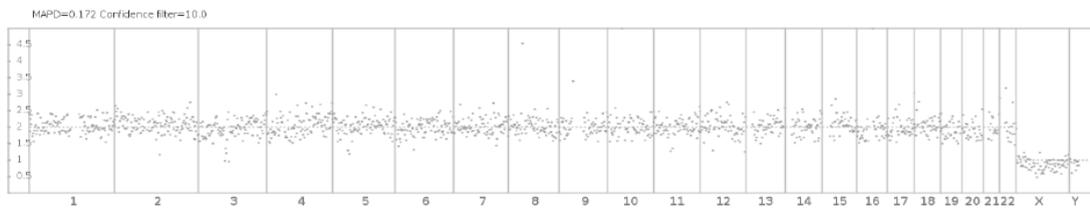
Name	Value
Confidence	10
mapd	0.3

### Gains/Losses Summary

#	CID	♂/♀	EID	Day	MA	An(+)	An(-)	MAPD
1	♂				0.0004			0.172

### Whole Genome View

#### Analysis 1, Sample\_9\_v3\_59192de3-989e-47c7-830d-dd9b4168f469

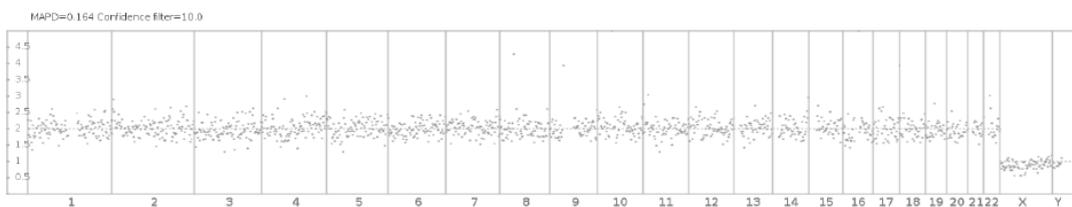


## iPSMF.P4.24

Name	Value
Confidence	10
mapd	0.3

### Whole Genome View

#### Analysis 1, Sample\_10\_v3\_3cd8fd5d-153d-4aec-b9d7-891ec0d04028

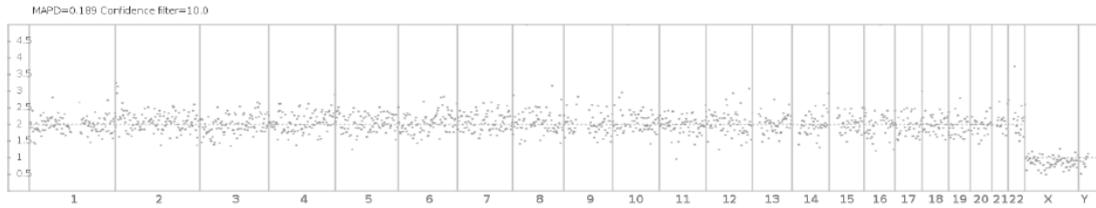


### iPSMF.P4.32

Name	Value
Confidence 10	
mapd	0.3

#### Whole Genome View

#### Analysis 1, Sample\_11\_v2\_97f0e82a-461e-4c76-997d-efdb165f41bc

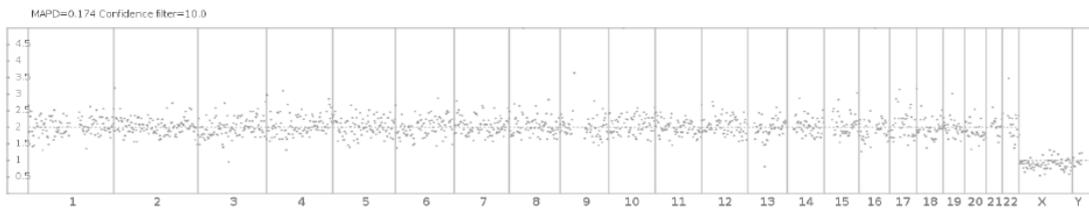


### iPSMF.P4.34

Name	Value
Confidence 10	
mapd	0.3

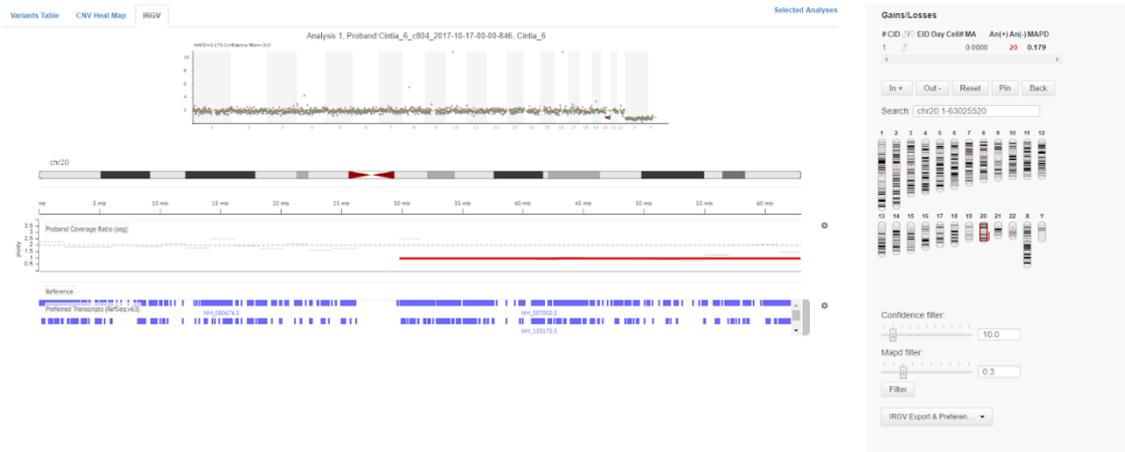
#### Whole Genome View

#### Analysis 1, Sample\_12\_v2\_172738c7-6b3d-4b40-bcca-08064421510a



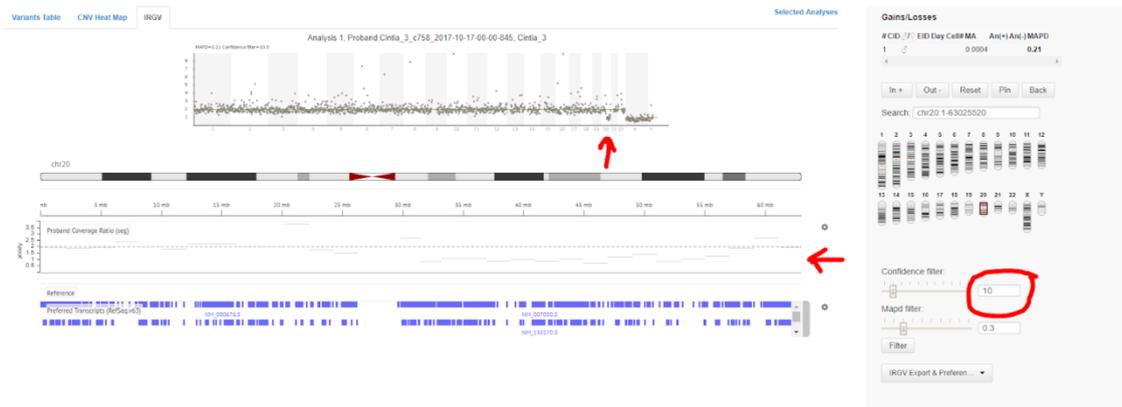
# Granulócito P5

## Analysis Visualization



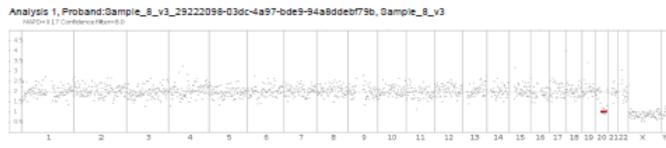
# iPSMF.P5.5 Passagem 15

## Analysis Visualization



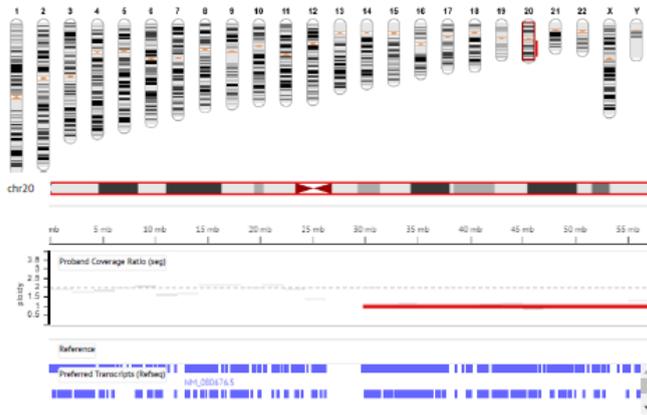
iPSMF.P5.5 Passagem 17

Sample\_8\_v3\_29222098-03dc-4a97-bde9-94a8ddeb79b, Sample\_8\_v3



Analysis #	Couple ID	Embryo ID	Biopsy Day	MDNA:Auto ratio	MAPD	
1		♂		0.0007	0.17	
Aneuploidy						
Passed Confidence				Below Confidence	Conf. Length	Precision Tiles
				20q11.21q13.32x1	8.37	27286.3 8.37 14 kb

In + Out - Reset Search: chr20:25000000-60000000

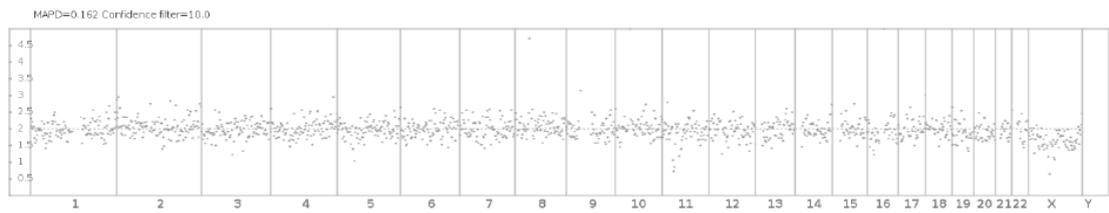


iPSMF.P6.1

#	CID	♂/♀	EID	Day	MA	An(+)	An(-)	MAPD
1		♀			0.0016			0.162

Whole Genome View

Analysis 1, Sample\_4\_v5\_d5243adf-342e-4261-b8ec-e01e691fbc52



9.7. Anexo 7

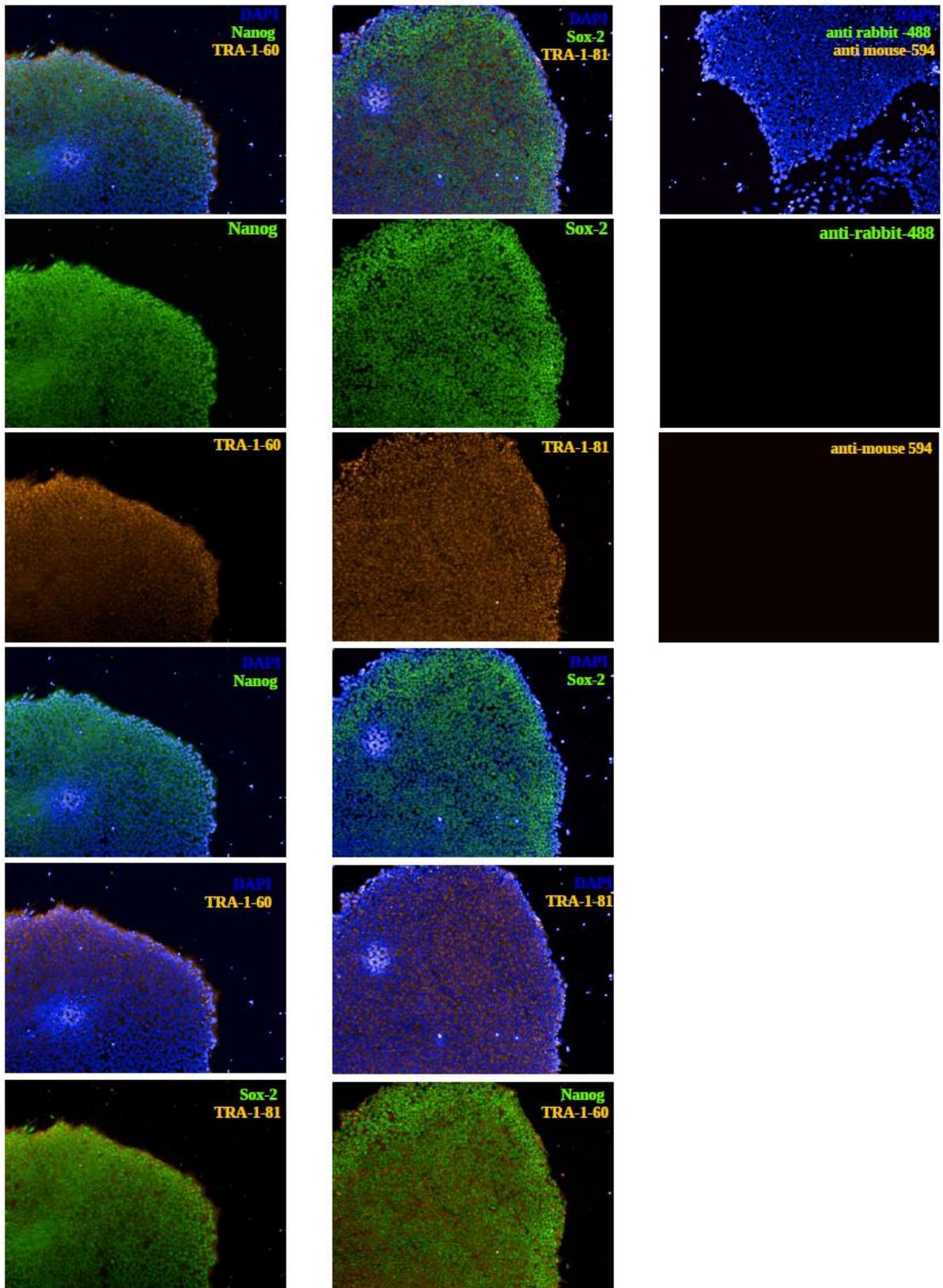
Marcadores de pluripotência identificados nos clones iPSCs

**Tabela 9.3. Confirmação da presença dos marcadores de pluripotência de todas as iPSCs**

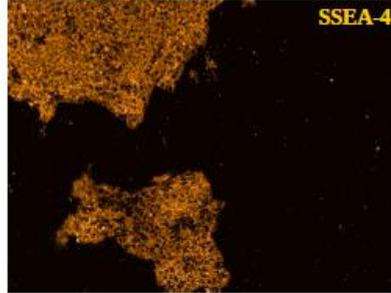
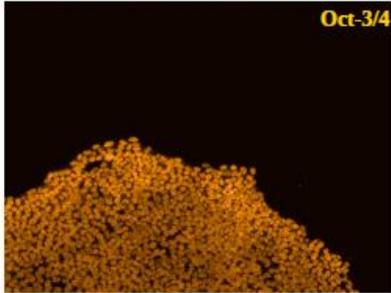
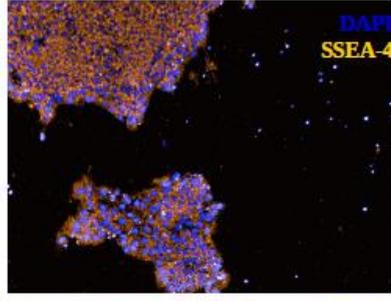
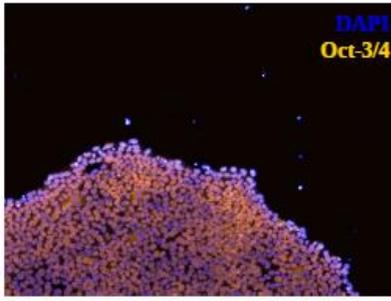
Paciente	Marcadores de pluripotência						
	Oct-3/4	Sox-2	Nanog	SSEA-4	TRA-1-81	TRA-1-60	SSEA-4
iPS.MFP1.1	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
iPS.MFP1.11	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
iPS.MFP2.3	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
iPS.MFP2.18	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
iPS.MFP3.14	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
iPS.MFP3.13	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
iPS.MFP3.17	✓	✓		✓	✓		✓
iPS.MFP4.7	✓	✓		✓	✓		✓
iPS.MFP4.14	✓	✓		✓	✓		✓
iPS.MFP4.15	✓	✓		✓	✓		✓
iPS.MFP4.21	✓	✓		✓	✓		✓
iPS.MFP5.32	✓	✓		✓	✓		✓
iPS.MFP5.33	✓	✓		✓	✓		✓
iPS.MFP6.34	✓	✓		✓	✓		✓
iPS.MFP5.2	✓	✓		✓	✓		✓
iPS.MFP5.3	✓	✓		✓	✓		✓

**Tabela 9.3. Confirmação da presença dos marcadores de pluripotência de todas as iPCS (continuação)**

Paciente	Marcadores de pluripotência						
	Oct-3/4	Sox-2	Nanog	SSEA-4	TRA-1-81	TRA-1-60	SSEA-4
iPS.MFP5.5	✓	✓		✓	✓		✓
iPS.MFP6.1	✓	✓	✓	✓	✓		✓
iPS.MFP6.4	✓	✓	✓	✓	✓		✓
iPS.CNT1.15	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
iPS.CNT1.3	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
iPS.CNT2.8	✓	✓		✓	✓		✓
iPS.CNT2.7	✓	✓		✓	✓		✓



**Figura 9.1.** Marcação por imunofluorescência da iPSC clone 3 derivado do paciente P2. Os anticorpos utilizados foram anti-Nanog, anti-Sox2, anti-Oct3/4 (marcação nuclear) e SSEA4, TRA-1-60 e TRA-1-80. No lado esquerdo encontram-se os cotroles negativos: utilizamos os anticorpos secundários na ausência de anticorpo primário.



**Tabela 9.4. Quantificação da imunexpressão dos marcadores de pluripotência**

	Tra1-81	Tra1-81	Sox2	Oct3/4	SSEA-4
iPSMF.P1.1					99,2158082
iPSMF.P1.1		97,93258618	97,87315334		
iPSMF.P1.1				98,66846145	
iPSMF.P1.1	95,418627				
iPSMF.P1.1					

iPSMF.P3.17					
iPSMF.P3.17	98,595958				
iPSMF.P3.17					97,46672833
iPSMF.P3.17		98,65375632	98,29277615		
iPSMF.P3.17				99,16108841	

iPSMF.P2.18				98,80763955	
iPSMF.P2.18					99,24108719
iPSMF.P2.18					
iPSMF.P2.18			96,93976841		

iPSMF.P5.2		95,84635998	96,87998469		
iPSMF.P5.2				99,80544747	
iPSMF.P5.2					
iPSMF.P5.2					

iPSMF.P5.2					
iPSMF.P5.2				99,25709516	

iPSMF.P4.7					
iPSMF.P4.7				98,43453741	
iPSMF.P4.7		99,7959496	99,77554456		
iPSMF.P4.7					99,72223625
iPSMF.P4.7	98,987644				

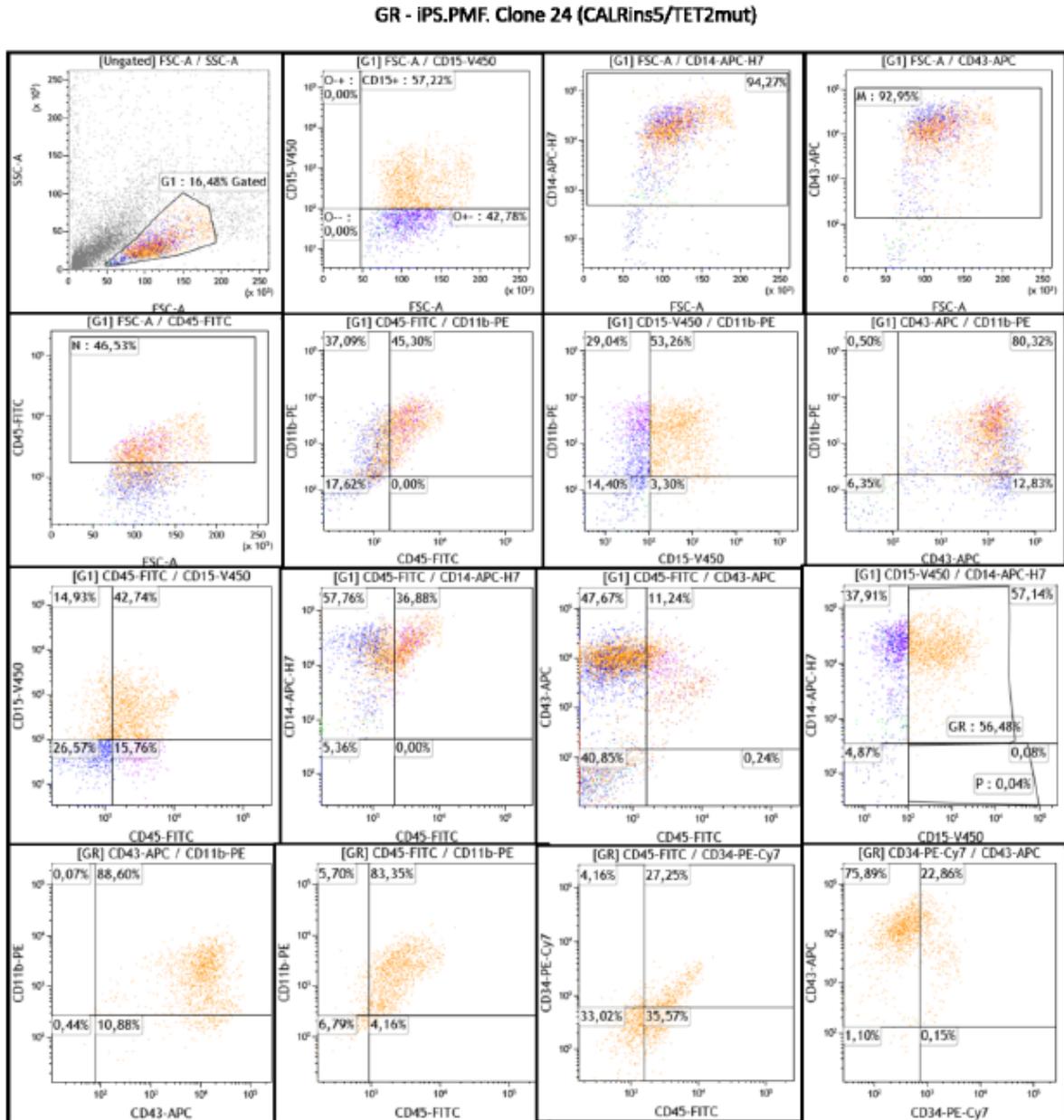
iPSMF.P4.24				99,59046365	
iPSMF.P4.24			98,75558867		
iPSMF.P4.24	98,276658				
iPSMF.P4.24					

iPSMF.P4.32		99,75213585	99,64138804		
iPSMF.P4.32				99,90374846	
iPSMF.P4.32					99,1064389
iPSMF.P4.32					

<b>iPSMF.P4.34</b>		98,6573387	98,69973853		
<b>iPSMF.P4.34</b>				99,82238712	
<b>iPSMF.P4.34</b>					98,73164219
<b>iPSMF.P4.34</b>					
<b>iPSMF.P4.34</b>					

9.8. Anexo 8

Imunofenotipagem dos granulócitos diferenciados *in vitro* a partir da iPSC clone 24 e 34 respectivamente.



**Figure 9.2. Imunofenotipagem dos granulócitos (GR) diferenciados *in vitro* dos progenitores derivados do paciente P4 clone 24 ( $CALR^{ins5}/TET2G898X$ ). A análise das marcações foi dividida na marcação *single* (CD15, CD14, CD43, CD45), seguida da análise de dupla marcação (CD11/CD43, CD11b/CD15, CD11b/CD45, CD15/CD45, CD14/CD45, CD43/CD45, CD14/CD15). Dentro da população CD14+/CD15+ foram analisadas as populações positivas para CD11/CD43, CD11b/CD15, CD11b/CD43, CD11b/CD45). As análises por citometria foram realizadas no citômetro de fluxo CANTO XI BD Bioscience e os dados analisados com o software Kaluza v 5.1.**

GR - iPS.PMF. Clone 34 (CALRins5/TET2WT)

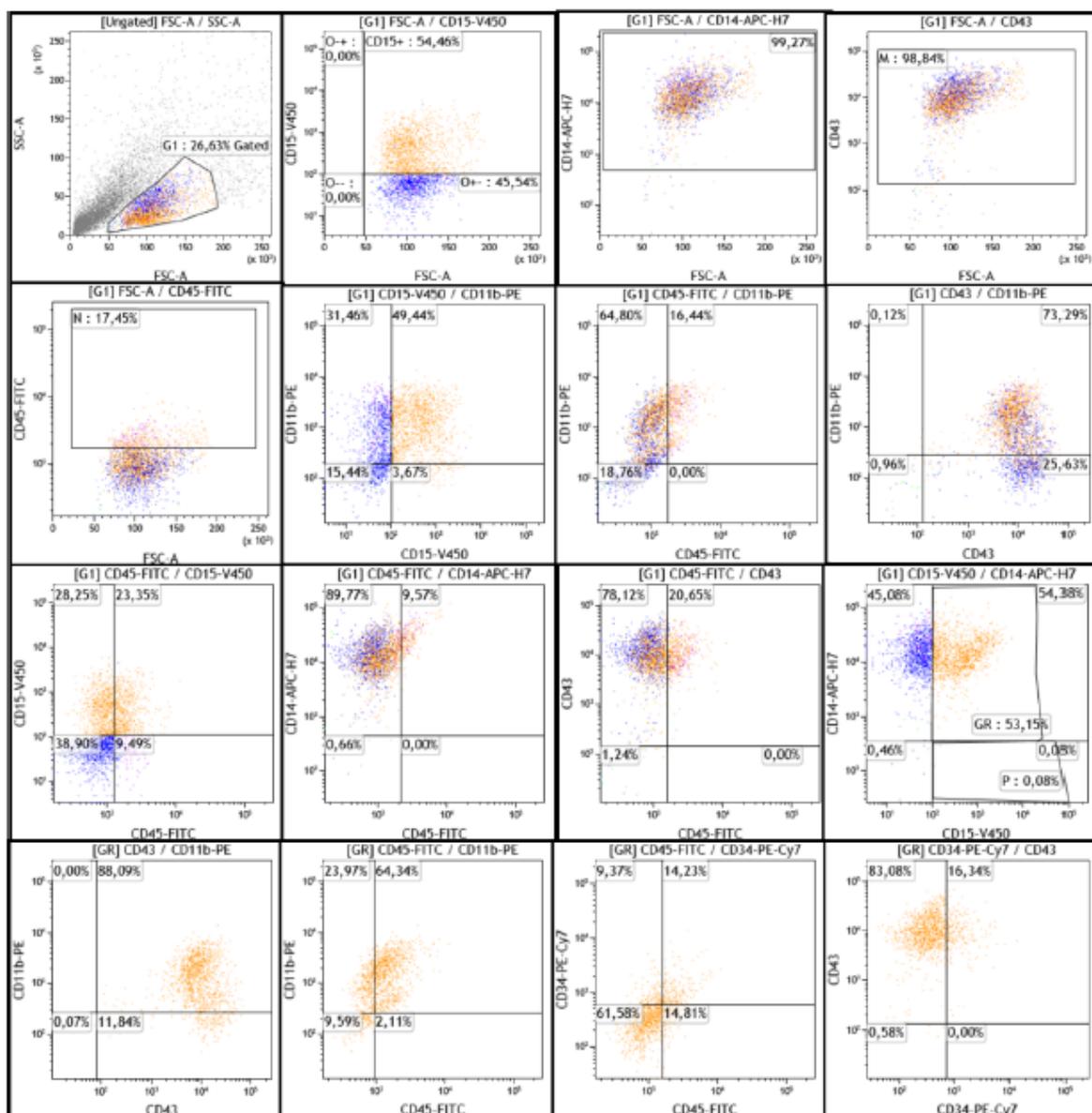


Figure 9.2. Imunofenotipagem dos granulócitos (GR) diferenciados *in vitro* dos progenitores derivados do paciente P4 clone 34 (*CALR<sup>ins5</sup>/TET2G898X*). A análise das marcações foi dividida na marcação *single* (CD15, CD14, CD43, CD45), seguida da análise de dupla marcação (CD11/CD43, CD11b/CD15, CD11b/CD45, CD15/CD45, CD14/CD45, CD43/CD45, CD14/CD15). Dentro da população CD14+/CD15+ foram analisadas as populações positivas para CD11/CD43, CD11b/CD15, CD11b/CD43, CD11b/CD45). As análises por citometria foram realizadas no citômetro de fluxo CANTO XI BD Bioscience e os dados analisados com o software Kaluza v 5.1..