



Ministério da Saúde

Instituto Nacional do Câncer

Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Oncologia

**Aspectos funcionais das mutações de neoplasias mieloides – um
estudo de modelagem *in vitro* baseado em edição genética por
CRISPR/Cas9**

DIEGO FERREIRA COUTINHO

Orientadora: Dra. Ilana Zalcborg Renault

Co-orientadora: Dra. Bárbara C. R. Monte-Mór

Rio de Janeiro

2018

Aspectos funcionais das mutações de neoplasias mieloides – um estudo de modelagem *in vitro* baseado em edição genética por CRISPR/Cas9

DIEGO FERREIRA COUTINHO

Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Oncologia do Instituto Nacional do Câncer como parte dos requisitos necessários para a obtenção do título de Doutor em Oncologia.

Orientadora: Dra. Ilana Zalcborg Renault

Co-orientadora: Dra. Bárbara C. R. Monte-Mór

Rio de Janeiro

2018

C871a Coutinho, Diego Ferreira.

Aspectos funcionais das mutações de neoplasias mieloides: um estudo estudo de modelagem in vitro baseado em edição genética por CRISPR/Cas9. /Diego Ferreira Coutinho – Rio de Janeiro, 2018.

xvi, 62f.: il. color.

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

Orientador: Ilana Zalcborg Renault

Co-orientador: Bárbara C. R. Monte-Mór

1. Hematopoese. 2. Processamento de RNA. 3. Repetições Palindrômicas Curtas Agrupadas e Regularmente Espaçadas. 4. SMD. I. Renault, Ilana Zalcborg (Orient.). II. Monte-Mór, Bárbara C.R. (Co-orient.). III. Instituto Nacional do Câncer José de Alencar Gomes da Silva. IV. Título.

CDD: 616.994

**Aspectos funcionais das mutações de neoplasias mieloides – um
estudo de modelagem *in vitro* baseado em edição genética por
CRISPR/Cas9**

DIEGO FERREIRA COUTINHO

Orientadora: Dra. Ilana Zalcborg Renault

Co-orientadora: Dra. Bárbara C. R. Monte-Mór

Rio de Janeiro, 03 de agosto de 2018.

BANCA EXAMINADORA

Titular: Dr. Luis Felipe Ribeiro Pinto
Instituto Nacional do Câncer (INCA), Rio de Janeiro, RJ.

Titular: Dra. Patricia Torres Bozza
Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz), Rio de Janeiro, RJ.

Titular: Dr. Eduardo Magalhães Rego
Universidade de São Paulo (USP), São Paulo, SP.

Titular: Dra. Elvira Deolinda Rodrigues Pereira Velloso
Universidade de São Paulo (USP), São Paulo, SP.

Suplente interno: Dr. Marcelo Alex de Carvalho
Instituto Nacional do Câncer (INCA), Rio de Janeiro, RJ.

Suplente externo: Dra. Luciana Pizzatti Barboza
Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ), Rio de Janeiro, RJ.

Aos meus pais, Maria Helena Ferreira Coutinho e Adão Pereira Coutinho (*in memoriam*), e a minha amada esposa, Thais Basili de Oliveira.

AGRADECIMENTOS

A “alguém” que nunca vi, mas que me acompanha, ainda que [apenas] dentro do meu íntimo, e aprendi a nomeá-Lo de Deus.

Aos meus pais, por me mostrarem ainda muito cedo a importância da educação e que através dela eu poderia ser quem eu quisesse – e hoje sou.

A minha esposa, Thais, pelo amor incondicional, amizade, exemplo, companheirismo, PACIÊNCIA e momentos mágicos vividos até aqui.

A Ilana, pela amizade, orientação, formação e por enxergar em mim a capacidade, que mesmo notada por outros, nunca confiada até então.

A Dr. Azra Raza, pela oportunidade, orientação, confiança e amparo.

Ao Dr. Siddhartha Mukherjee (Sid), pela orientação, entusiasmo e por me permitir vivenciar essa histeria intelectual que é sua cabeça.

Ao Abdullah Ali, por toda ajuda e discussões sobre experimentos e resultados.

Aos queridos amigos Christa Bonhof-Grühn e Andrew Stein (Andy), pelo suporte durante meu primeiro ano em Nova York e por acreditarem que vale a pena realizar sonhos.

Aos amigos de laboratório da *Columbia University*, por todo enriquecimento intelectual e cultural, muito além dos projetos científicos.

A Yen K. Lieu, pela colaboração no presente estudo.

Aos amigos do laboratório de Biologia Molecular do CEMO/INCA, em especial a Bárbara Monte-Mór e Simone Bonecker por estarem tão presentes, mesmo tão distantes.

Aos amigos brasileiros e estrangeiros, por todo companheirismo, conversas e momentos especiais vividos na *Big Apple*. Meu carinho especial ao Leonardo Chicaybam, Andressa Sodré e Livia Goes.

Aos parentes e familiares, em especial, a Célia Regina, pelo suporte nos últimos meses de doutoramento.

Ao grupo SciBr e Fundação Leman, pela indicação no Edital Jovens Talentos da Ciência 2016.

A FAPERJ, Ministério da Saúde e *The Orphaned Starfish Foundation*, pela bolsa de estudos.

“O sonho é que leva a gente para a frente. Se a gente for seguir a razão, fica aquietado; acomodado.”

(Ariano Suassuna)

RESUMO

Indivíduos normais, em sua grande maioria, idosos acima de 65 anos de idade, podem apresentar nas células do sangue periférico mutações somáticas relacionadas à etiopatogênese das malignidades mieloides. Esse fenômeno, nomeado de hematopoese clonal do idoso, está associado ao risco aumentado para o desenvolvimento de neoplasias sanguíneas, o que leva a crer que essa seja uma condição pré-leucêmica. Alguns dos genes acometidos possuem função de regulação epigenética ou atuam na edição do RNA mensageiro (*splicing*). Até o momento, há poucas evidências sobre o papel funcional desses marcadores na carcinogênese, o que motiva os estudos baseados em modelagem das doenças malignas do sangue, sobretudo, na era da edição genômica. Com este intuito, foi realizado no presente projeto de tese a geração e o estabelecimento de clones celulares, provindos da linhagem hematopoética K562, editados geneticamente para os alvos *DNMT3A* (R882H), *TET2*, *SF3B1* (K700E) e *SRSF2* (P95H). Uma linhagem estável com expressão indutível de eCas9 e EGFP foi gerada, e a partir dela, foram realizadas transfecções subsequentes com os gRNAs específicos para a edição dos genes de interesse. A presença de mutações nos marcadores epigenéticos (*DNMT3A* e *TET2*) e *SRSF2* não alteraram a habilidade proliferativa, comparadas às células WT, ao passo que a mutação *SF3B1* K700E reduziu o crescimento dessas células. Esses dados foram confirmados por ensaio de competição clonal *in vitro* e *in vivo*, realizados em camundongos NSG. Além de impactar na viabilidade celular, a mutação em *SF3B1* atribuiu resistência ao estresse genotóxico induzido por radiação gama. O mesmo comportamento não foi observado em células *SRSF2* P95H, demonstrando que o fenótipo de resistência parece ser gene-específico. Mudanças nos níveis de morte por apoptose e presença de sideroblastos em anel, figura displásica relacionada a mutações no gene *SF3B1*, não foram observados em clones K562 editados para o gene. Em contrapartida, células com mutações em genes do spliceossoma (*SF3B1*, *SRSF2* e *U2AF1*) apresentaram expressão aumentada da citocina IL-8, confirmada por ELISA e qRT-PCR. Ensaio de co-cultura entre clones K562 *SF3B1* WT e K700E em presença de IL8 e/ou IL-1 α mostraram que as citocinas não interferiram na capacidade proliferativa dessas células. Esses resultados foram semelhantes aos obtidos com o co-cultivo desses clones com células estromais obtidas a partir de amostras de medula óssea de indivíduos saudáveis ou acometidos com malignidade hematológica. A presença de mutações co-ocorrentes (*TET2* e *SF3B1*) diminuíram a habilidade proliferativa dos clones afetados, além de induzir eritropoese espontânea *in vitro*. Em conclusão, nossos dados sugerem que a mutação K700E no gene *SF3B1* foi capaz de impactar na sobrevivência e na expressão de IL-8, citocina já contextualizada, anteriormente, com neoplasias da linhagem mielóide, em especial, as síndromes mielodisplásicas. Além disso, a geração desses modelos *in vitro* permitirá o melhor entendimento da relação biológica entre esses marcadores genéticos e a fisiopatologia de doenças malignas do sangue.

ABSTRACT

Normal subjects, most of them older than 65 years, might present somatic mutations related to myeloid malignancies in peripheral blood cells. This phenomenon is called clonal hematopoiesis of the elderly and is associated with increased risk to the development of blood cancer, suggesting this is a pre-leukemic condition. Some of the genes affected by those mutations have epigenetic role or act on the mRNA editing (splicing). So far, there is little evidence on the role of these markers in carcinogenesis, which motivates studies based on modeling of malignant blood diseases, especially in the genomic editing era. We carried out the generation and establishment of clones genetically edited for *DNMT3A* (R882H), *TET2*, *SF3B1* (K700E) and *SRSF2* (P95H) genes from K562 hematopoietic cell line. A stable cell lineage with inducible expression of eCas9 and EGFP was generated, and subsequent transfections were performed with the gRNAs specific for edition of the genes of interest. The presence of mutations in epigenetic markers (*DNMT3A* and *TET2*) and *SRSF2* did not change the cellular proliferation compared to WT clones, whereas the *SF3B1* K700E mutation reduced the growth of these cells. These data were confirmed by clonal competition assay performed *in vitro* and *in vivo* on NSG mice. In addition, the *SF3B1* mutation attributed resistance to genotoxic stress gamma radiation-induced. This behavior was not observed in *SRSF2* P95H cells, demonstrating this phenotype seems to be gene-specific. Changes in the levels of apoptosis and presence of ring sideroblasts, a dysplastic figure related to mutations in the *SF3B1* gene, were not observed in K562 clones edited for the gene. In another hand, cells with mutations in spliceosome genes (*SF3B1*, *SRSF2* and *U2AF1*) showed increased expression of IL-8, confirmed by ELISA and qRT-PCR. Co-culture assays between K562 *SF3B1* WT and K700E clones in the presence of IL-8 and / or IL-1 α showed those cytokines did not interfere the proliferation. These results were similar such as the co-culture of those K562 clones with stromal cells obtained from bone marrow samples from healthy or MDS patients. The presence of co-occurring mutations (*TET2* and *SF3B1*) decreased cellular proliferation and induced spontaneous erythropoiesis *in vitro*. In conclusion, our data suggest that the K700E mutation in the *SF3B1* gene was able to impact the survival, and expression of IL-8, a cytokine previously related to myeloid neoplasms, especially MDS. In addition, the generation of these *in vitro* models will contribute to a better understanding of the biological relationship between these genetic markers and the malignant blood diseases.

ÍNDICE

RESUMO	ix
ABSTRACT	x
1. INTRODUÇÃO	1
1.1 Hematopoese: uma breve descrição sobre um processo bastante complexo	1
1.1.1 Regulação da hematopoese	4
1.2 Hematopoese clonal relacionada ao envelhecimento: um novo paradigma de leucemogênese	7
1.2.1 CHIP, ICUS, IDUS e CCUS	11
1.3 Síndromes mielodisplásicas: uma doença maligna pré-leucêmica	14
1.3.1 Marcadores somáticos das SMD e demais neoplasias mielóides	15
2. JUSTIFICATIVA	23
3. OBJETIVOS	25
3.1 Objetivo geral	25
3.2 Objetivos específicos	25
4. MATERIAL E MÉTODOS	26
4.1 Estratégias para edição gênica por CRISPR/Cas9	26
4.1.1 Linhagens celulares	26
4.1.2 Desenho dos RNA guias (gRNA)	27
4.1.3 Construções plasmidiais	28
4.1.4 Transfecção e transdução celulares	30
4.1.5 Citometria de fluxo	32
4.1.6 Sequenciamento de DNA	33
4.1.7 Diluição limitante	35
4.2 Ensaio funcionais	38
4.2.1 Viabilidade celular	38
4.2.2 Ciclo celular	38
4.2.3 Estresse genotóxico	39
4.4.4 Apoptose	39

4.2.5	Análise morfológica	40
4.2.6	Competição clonal	40
4.2.6.1	Ensaio <i>in vitro</i>	40
4.2.6.2	Ensaio <i>in vivo</i>	42
4.2.7	Expressão de marcadores de superfície	42
4.2.8	Expressão de citocinas	43
4.2.8.1	Expressão proteica	43
4.2.8.2	Expressão de transcritos	44
4.3	Análises estatísticas	45
5.	RESULTADOS	46
5.1	Células K562 podem ser utilizadas para a modelagem das mutações em genes das neoplasias mieloides	45
5.2	A mutação SF3B1 K700E confere perda do potencial proliferativo	53
5.3	Células com mutações em genes do spliceossoma secretam mais IL-8	58
5.4	Células estromais da MO não conferem dominância clonal às células K562 SF3B1 ^{WT/K700E}	61
5.5	Co-ocorrência de mutações nos genes <i>TET2</i> e <i>SF3B1</i> potencializam a perda de viabilidade celular no modelo de K562	63
5.6	Clones duplo-mutados (SF3B1 ^{K700E} /TET2 ^{+/-}) apresentam diferenciação eritróide espontânea <i>in vitro</i>	66
6.	DISCUSSÃO	68
7.	CONCLUSÃO	76
8.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	77

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Hematopoese clonal e condições relacionadas	pág.: 13
Tabela 2	Oligonucleotídeos utilizados para a confecção dos gRNA	pág.: 28
Tabela 3	Oligonucleotídeos fita-simples (ssOND) utilizados para a geração de modelos <i>knock-in</i>	pág.: 32
Tabela 4	Oligonucleotídeos iniciadores utilizados para a confirmação da edição genética	pág.: 35
Tabela 5	Clones celulares gerados com mutações em genes de regulação epigenética e do spliceossoma	pág.: 52

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Modelo hierárquico de hematopoese humana	pág.: 3
Figura 2	Fatores transcricionais importantes em cada etapa da diferenciação hematopoética	pág.: 6
Figura 3	Modelo de expansão clonal e frequência alélica das alterações somáticas na hematopoese clonal do idoso	pág.: 10
Figura 4	Modelo de evolução clonal em neoplasias mielóides (SMD/LMA)	pág.: 12
Figura 5	Metilação e desmetilação do DNA	pág.: 19
Figura 6	Edição do RNA mensageiro (<i>splicing</i>)	pág.: 21
Figura 7	Estratégias para edição gênica por CRISPR/Cas9, geração e caracterização de linhagens celulares para expressão indutível de eCas9	pág.: 37
Figura 8	Esquemas de clonagem molecular para geração do plasmídeo pCW-eCas9-EGFP	pág.: 46
Figura 9	Esquemas de clonagem molecular para geração do plasmídeo pGL4.22-dsRED-gRNA.	pág.: 47
Figura 10	Avaliação da expressão de GFP em células HEK 293T após 48h de transdução	pág.: 49

Figura 11	Avaliação da transfecção de células K562 eCas9+ com pGL4.22-dsRED-gRNA	pág.: 50
Figura 12	Confirmação da edição genética	pág.: 51
Figura 13	Análise de transcritos SF3B1 para confirmação da expressão de alelos editados	pág.: 51
Figura 14	Cinética de proliferação celular dos clones editados	pág.: 54
Figura 15	Viabilidade celular após estresse genotóxico por radiação gama	pág.: 54
Figura 16	Competição clonal in vitro entre clones selvagens e mutados para <i>SF3B1</i>	pág.: 55
Figura 17	Análise por citometria de fluxo do ensaio de competição clonal in vivo realizado com o animal NSG #01 – clones W1 + K1	pág.: 56
Figura 18	Avaliação de morte celular por apoptose	pág.: 57
Figura 19	Observação de sideroblastos em anel por coloração de lâminas com Azul da Prússia	pág.: 58
Figura 20	Expressão de citocinas humanas por Luminex	pág.: 59
Figura 21	Expressão de IL-8 nos diferentes clones celulares gerados	pág.: 60

Figura 22	Concentração ótima de citocinas para os ensaios de competição clonal	pág.: 60
Figura 23	Ensaio de competição clonal <i>in vitro</i> em presença de citocinas.	pág.: 61
Figura 24	Ensaio de competição clonal <i>in vitro</i> em presença de estroma	pág.: 62
Figura 25	Ensaio de viabilidade celular com células duplo-mutadas [<i>SF3B1/TET2</i>]	pág.: 64
Figura 26	Avaliação do ciclo celular em células geneticamente editadas	pág.: 65
Figura 27	Avaliação de morte celular por apoptose	pág.: 66
Figura 28	Análise da diferenciação eritróide em clones editados para <i>SF3B1</i> e <i>TET2</i>	pág.: 67

LISTA DE ABREVIATURAS

°C	Graus Celsius
α	Alpha
β	Beta
γ	Gama
μg	Micrograma
μL	Microlitro
μM	Micromolar
μm	Micrometro
11q	Braço longo do cromossomo 11
17p	Braço curto do cromossomo 17
20q	Braço longo do cromossomo 20
4q	Braço longo do cromossomo 4
5-caC	5-carboxilcitosina
5-fC	5-formilcitosina
5-hmC	5-hidroximetilcitosina
5-mC	5-metilcitosina
5q	Braço longo do cromossomo 5
AS	<i>Antisense</i>
BER	Reparo de DNA por excisão de Base
BPS	Sequências do tipo <i>branchpoint</i>
CCUS	Citopenias Clonais de Significado Indeterminado
cDNA	DNA Complementar
CHIP	Hematopoese Clonal de Potencial Indeterminado

CNV	Alterações no número de cópias
CSF	Fatores Estimulantes de Colônias
CTH	Célula-Tronco Hematopoética
CTH-L	CTH Leucêmica
CUMC	<i>Columbia University Medical Center</i>
del	Deleção
DNMTs	DNA-metiltransferases
DOXI	Doxiciclina
EPO	Eritropoietina
FAB	Franco-Americano-Britânico
FISH	Hibridização fluorescente <i>in situ</i>
FT	Fator de Transcrição
gRNA	RNA guia
GWAS	Associação genômica em larga escala
HATs	Histonas acetiltransferases
HDACs	Histonas desacetilases
HM	Homozigoto
HT	Heterozigoto
ICUS	Citopenias Idiopáticas de Significado Indeterminado
IDUS	Displasia Idiopática Medular de Significado Incerto
IL	Interleucinas
Kb	Kilobase
LLC	Leucemia Linfocítica Crônica
LMA	Leucemia Mielóide Aguda
LMC	Leucemia Mielóide Crônica

LMMC	Leucemia Mielomonocítica Crônica
LOH	Perda de heterozigosidade
LT-CTH	<i>Long-term CTH</i>
MBPs	<i>Metil-CpG-Binding Proteins</i>
MIT	<i>Massachusetts Institute of Technology</i>
mL	Mililitro
mM	Milimolar
MO	Medula óssea
mRNA	RNA mensageiro
ms	Milisiemens
Mut	Mutado
ncRNA	RNA não-codificante
ng	Nanograma
NK	<i>Natural Killer</i>
nm	Nanometro
NMP	Neoplasias Mieloproliferativas Crônicas
Nts	Nucleotídeos
OMS	Organização Mundial da Saúde
pb	Pares de Bases
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
PEM	Progenitores Eritrocitário-Megacariocítico
pg	Picograma
PLC	Progenitores Linfóides Comuns
PMC	Progenitores Mielóides Comuns
PMG	Progenitores Monocítico-Granulocítico

PMP	Progenitor Multipotente
PV	Policitemia Vera
qRT-PCR	PCR em Tempo Real Quantitativo
Rpm	Rotações por minuto
S	<i>Sense</i>
SCF	<i>Stem Cell Factor</i>
SMD	Síndromes Mielodisplásicas
SMDi	SMD Inclassificável
SMD-DM	SMD com Displasia Multilinhagem
SMD-DU	SMD com Displasia Unilinhagem
SMD-EB	SMD com Excesso de Blastos
SMD-SA	SMD com Sideroblastos em Anel
snRNP	Complexo Ribonucleoproteico
ssODN	Oligonucleotídeo
ST-CTH	<i>Short-term CTH</i>
TDG	Timina-DNA-glicosilase
TPO	Trombopoetina
V	Volt
VAF	Frequência alélica
WT	<i>Wild Type</i>

1. INTRODUÇÃO

1.1 Hematopoese: uma breve descrição sobre um processo bastante complexo

Proliferação e diferenciação são fenômenos celulares resultantes de uma comunicação íntima entre ambiente e célula, que por sua vez, culmina na ativação de uma maquinaria molecular extremamente refinada denominada via de sinalização (SUN *et al.*, 2015). Ambos eventos, associados a morte celular, formam o tripé biológico indispensável à ontogenia tecidual, ou até mesmo, à formação de um indivíduo *per si*. O sangue, tecido conjuntivo responsável pelo transporte de gases e biomoléculas para os diferentes órgãos, é composto majoritariamente por uma porção líquida, o que confere sua fluidez tecidual. Imersas neste grande fluido encontram-se células sanguíneas procedentes da medula óssea (MO), produto de proliferação e diferenciação celular contínua que garantem a manutenção do tecido sanguíneo, processo esse conceituado como hematopoese.

A MO é um tecido conjuntivo de aspecto líquido-esponjoso localizado no interior das cavidades centrais de ossos axiais e longos. Nas primeiras semanas do desenvolvimento embrionário humano, a hematopoese primitiva ocorre, transitoriamente, no saco vitelino. De seis semanas aos primeiros meses, o fígado e o baço se tornam os principais produtores de células do sangue. Após esse período, a MO se estabelece como a única fonte de novas células do sangue (HOFFBRAND; MOSS, 2012). Ao nascimento, virtualmente, toda a MO é hematopoiética, ou MO vermelha, mas posteriormente ocorre a sua substituição progressiva por gordura nos ossos longos. Dessa forma, a capacidade de produção intensa de células é perdida, o que faz com que a função hematopoética fique confinada ao esqueleto central e às extremidades proximais do fêmur e do úmero (COMPSTON, 2002). Apesar disso, o fígado e o baço podem exercer papel hematopoético, sobretudo em condições patológicas, desempenhando o que conhecemos como hematopoese extramedular (HOFFBRAND; MOSS, 2012).

Do ponto de vista estrutural, a MO é um órgão extremamente complexo composto por um repertório celular hematopoético e não-hematopoético. Além de

vasos, fibras conjuntivas e nervos, o estroma medular é composto por células de suporte, tais como histiócitos, adipócitos, fibroblastos e células endoteliais, todas derivadas das células-tronco mesenquimais, responsáveis por estruturarem todo o arcabouço necessário para a manutenção e diferenciação das células hematopoéticas (KIM; KIM; CHO, 2013). Ademais, osteoblastos e osteoclastos são encontrados também na MO e garantem, sobretudo, a manutenção do tecido ósseo (TRAVLOS, 2006). As células hematopoéticas imaturas são aquelas responsáveis pela produção de todo repertório celular sanguíneo, e serão discutidas ao longo deste capítulo.

Há diferentes modelos de hematopoese, entretanto, o mais aceito é o de diferenciação hierárquica que inicia-se a partir de uma célula-tronco hematopoética (CTH) pluripotente, que, por divisão assimétrica, pode tanto se autorrenovar como dar origem às distintas proles celulares (HOFFBRAND; MOSS, 2012) (Figura 1). A capacidade de autorrenovação das CTH garante a produção contínua das células sanguíneas, tendo em vista, que a manutenção da população tronco é um fator limitante para a reconstituição hematopoética. Na década de 50, foram publicados os primeiros estudos que demonstraram reconstituição hematopoética em animais irradiados transplantados com MO alogênica (JACOBSON *et al.*, 1951; LORENZ *et al.*, 1951). Só na década de 90 foi comprovado que a habilidade de sustentar a hematopoese multilinhagem (mieloide/linfoide) era proveniente apenas de uma subpopulação muito restrita, as CTH (MEDVINSKY; DZIERZAK, 1996; MÜLLER *et al.*, 1994). O número exato de CTH que residem na MO humana é controverso, mas acredita-se que elas representem, aproximadamente, 1 a cada 10^5 células mononucleares encontradas na medula (HARRISON; ASTLE; LERNER, 1988; MORRISON; UCHIDA; WEISSMAN, 1995). Ainda assim, a elevada capacidade proliferativa dessas células é o que garante que cerca de 10^{12} células sanguíneas sejam geradas diariamente (DOULATOV *et al.*, 2012).

As CTH podem ser classificadas em duas populações distintas: As CTH *long-term* (LT-CTH) e as *short-term* (ST-CTH). Esse conceito de duas populações de CTH surgiu a partir de ensaios *in vivo* que demonstraram que ambos grupos, imunofenotipicamente distintos, eram capazes de promover reconstituição hematopoética: um a longo prazo (LT-CTH), e o outro, em tempo mais reduzido (ST-CTH) (SEITA; WEISSMAN, 2010). A maioria das LT-CTH humanas, caracterizadas pelos marcadores de superfície celular Lin⁻CD34⁺CD38⁻CD90⁺CD45RA⁻CD49f⁺, está em estado de quiescência dentro de nichos específicos na MO. Quando perturbadas

por estímulos intrínsecos ou extrínsecos se diferenciam em ST-CTH ($\text{Lin}^- \text{CD34}^+ \text{CD38}^+ \text{CD90}^- \text{CD45RA}^- \text{CD49f}^+$). Muitos são os trabalhos que discutem o papel e as diferenças entre essas duas populações de CTH, no entanto, o único consenso até o momento é a capacidade limitada de autorrenovação das ST-CTH (CHRISTENSEN; WEISSMAN, 2001; MORRISON; WEISSMAN, 1994; YANG *et al.*, 2005). Os progenitores hematopoéticos comuns são estabelecidos a partir de ST-CTH e apresentam um potencial restrito de diferenciação, originando células de uma linhagem hematopoética específica – mieloide ou linfoide. Alguns autores defendem a existência de um progenitor multipotente (PMP) derivado das ST-CTH, que seria capaz de diferenciar em progenitor hematopoético comum, independente da linhagem (KONDO, 2010; MORRISON *et al.*, 1997). Por outro lado, há quem defenda que ST-CTH e PMP, conceitualmente, retratam a mesma população celular e que seriam capazes de serem diferenciadas imunofenotipicamente apenas na hematopoese murina (DOULATOV *et al.*, 2012).

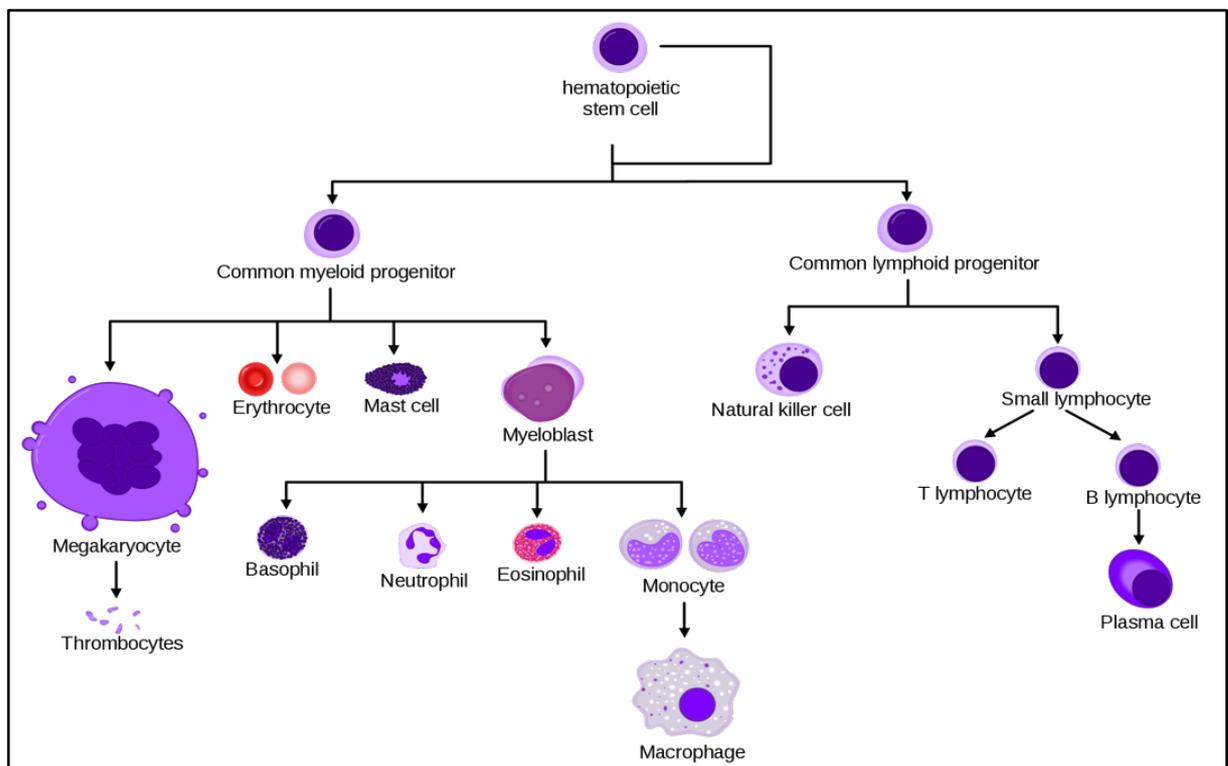


Figura 1 – Modelo hierárquico de hematopoese humana. A célula-tronco hematopoética (CTH), representada no topo da imagem, origina os precursores comuns das linhagens mieloide e linfoide. Essas células são capazes de diferenciar em precursores comprometidos, de forma a produzirem todos os tipos celulares encontrados no sangue [Fonte: (RAD, 2006)].

Os progenitores linfoides comuns (PLC) são aqueles responsáveis pela geração de todo repertório linfoide, composto por linfócitos B e T, que apresentam papel central na regulação e atividade efetora da imunidade adquirida, e células *natural killer* (NK), células citotóxicas atuantes na imunidade não específica. Em contraste, as células da linhagem mieloide, composta por (I) eritrócitos (hemácias ou glóbulos vermelhos), (II) plaquetas, (III) mastócitos, (IV) monócitos, e (V) granulócitos – neutrófilos, basófilos e eosinófilos, são provenientes dos progenitores mieloides comuns (PMC). PMC apresentam oligopotencialidade e se diferenciarem em progenitores eritrocitário-megacariocítico (PEM) e monocítico-granulocítico (PMG), gerando série vermelha e plaquetas, e monócitos e granulócitos, respectivamente. Células dendríticas podem ser provenientes de PLC e PMC e, portanto, não são claramente agrupadas em uma linhagem hematopoética específica (MANZ *et al.*, 2001a, 2001b; TRAVER *et al.*, 2000).

1.1.1 Regulação da hematopoese

Claramente, proliferação e diferenciação celulares são processos bastante relevantes na hematopoese e estão presentes ao longo de todas as etapas. A interação entre o repertório hematopoético e o microambiente medular é um fator crítico para a manutenção da plasticidade das CTH e a determinação do caminho tomado por elas ao longo da hematopoese, além dos sinais intrínsecos, inerentes à biologia da própria célula.

Dentre os fatores extrínsecos, o nicho nas quais as CTH residem provavelmente seja o mais importante. Osteoblastos interagem diretamente com CTH através de moléculas de adesão do tipo N-caderina, que por sua vez induzem a secreção de catenina, ativando as vias de *Wnt* e *Notch*, e culminando assim na regulação positiva e expansão dos precursores hematopoéticos primitivos (CALVI *et al.*, 2003). Além disso, estudos recentes sugerem que a depleção dessas células de suporte, ou a sua hiperativação mediada por mutação genética, são condições suficientes para o desenvolvimento de leucemia ou condições pré-leucêmicas em camundongos (KODE *et al.*, 2014; KREVVATA *et al.*, 2014).

O papel do endotélio vascular presente na MO não é tão definido quanto ao do nicho osteoblástico. Entretanto, células reticulares, que expressam altos níveis da

quimiocina SDF-1, importante para a manutenção da CTH, estão presentes no endotélio sinusoidal em múltiplos órgãos, incluindo a MO (AVECILLA *et al.*, 2004; KIEL *et al.*, 2005; SUGIYAMA *et al.*, 2006).

Os fatores de crescimento hematopoéticos são componentes importantes dos sinais extrínsecos que regulam as CTH e progenitores. Em sua grande maioria, essas biomoléculas solúveis são hormônios glicoproteicos ou peptídeos secretados por células estromais, fígado, rim e leucócitos (MÖHLE; KANZ, 2007). Dentre esses fatores, as citocinas, atuantes em toda a hierarquia hematopoética, talvez venham a ser as principais protagonistas nesse processo de regulação. Interleucinas (IL), eritropoietina (EPO), trombopoetina (TPO) e fatores estimulantes de colônias (CSF) são exemplos importantes dessas biomoléculas. Por exemplo, o fator CTH (*stem cell factor*, SCF) e TPO fornecem sinais de sobrevivência e promovem a proliferação e manutenção de CTH *in vitro* (EMA; NAKAUCHI, 2000; KELLER; ORTIZ; RUSCETTI, 1995; YOSHIHARA *et al.*, 2007). Em 2008, Kent *et al.* observaram que a intensidade de ativação e o perfil transcricional das CTH eram modulados diretamente pelo aumento gradativo de SCF no meio, evidenciando a regulação extrínseca mediada por esse fator (KENT *et al.*, 2008). Adicionalmente, animais *knock-out* para *c-kit* e *c-mpl*, receptores celulares para SCF e TPO, respectivamente, apresentaram diminuição na quantidade de precursores troncos e capacidade reduzida de repopulação de LT-CTH (KIMURA *et al.*, 1998; MURONE; CARPENTER; DE SAUVAGE, 1998).

De forma complementar, uma variedade de fatores intrínsecos também é responsável pela regulação das CTH, tais como status epigenômico, fatores e reguladores da transcrição gênica, e reguladores do ciclo celular e apoptose. Frequentemente, modelos de ganho (*knock-in*) e perda (*knock-out*) de função são empregados para o estudo de potenciais fatores intrínsecos à célula, cujo objetivo é determinar o impacto dos alvos moleculares sobre o fenótipo das CTH, sobretudo, dentro da perspectiva funcional.

Fatores de transcrição (FT) são proteínas com atividade de ligação a regiões específicas do DNA, que regulam a transcrição de genes específicos, ou até mesmo famílias gênicas inteiras (LAMBERT *et al.*, 2018). Em geral, contêm ao menos dois domínios proteicos: um domínio de ligação ao DNA, como por exemplo, um zíper de leucina ou estrutura em α -hélice, e um domínio de ativação, que contribui para a montagem do complexo de transcrição no promotor (“Fundamentos Em Hematologia

- 6ª Ed. 2013”, [s.d.]). Os FT desempenham um papel importante em todos os estágios da hematopoese (Figura 2), quer seja pela regulação direta de genes alvos ou indiretamente, pelo recrutamento de histonas acetiltransferases (HATs) ou histonas desacetilases (HDACs), capazes de alterar o modelamento da cromatina e, conseqüentemente, o perfil de expressão gênica global. Muitos desses fatores foram identificados, inicialmente, em amostras leucêmicas, apresentando-se translocados com outros parceiros gênicos ou diferencialmente expressos (ROWLEY; BEAU; RABBITTS, 2015). Alguns desses, inclusive, em subtipos específicos da doença, o que nos permitiu inferir a importância de um dado FT com determinado estágio da diferenciação hematopoética.

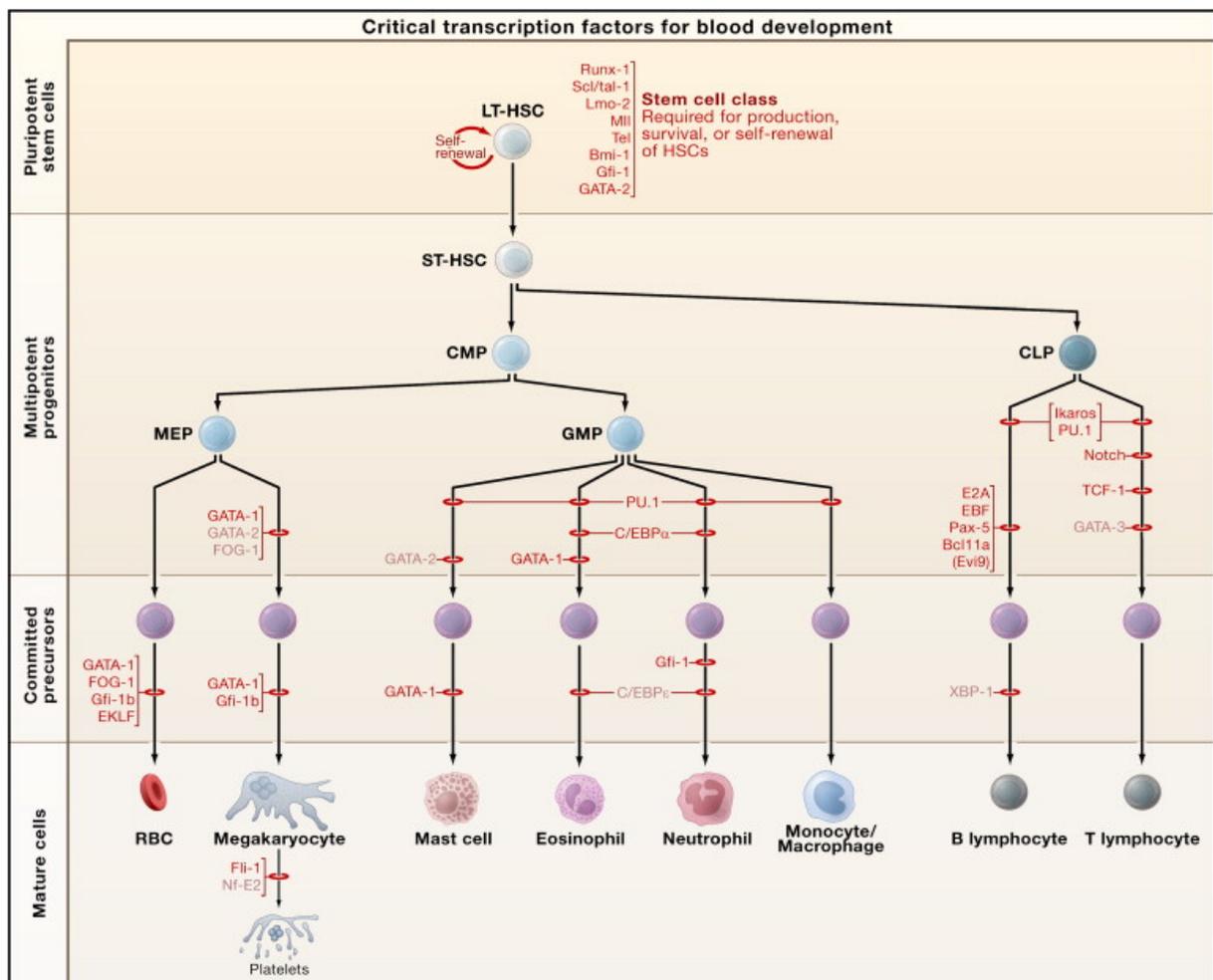


Figura 2 – Fatores transcripcionais importantes em cada etapa da diferenciação hematopoética. Todos os fatores de transcrição acima já foram caracterizados no contexto hematológico em estudos funcionais prévios por meio do desenvolvimento de modelos *knock-out* convencionais. O desenvolvimento hematopoético foi bloqueado na ausência de um determinado fator. Os FT evidenciados em vermelho escuro já foram identificados translocados ou mutados em malignidades hematológicas, ao passo que, os ressaltados em vermelho claro, não. [Fonte: (ORKIN; ZON, 2008)].

A regulação epigenética também é um fator importante para o direcionamento da célula precursora ao longo da hematopoese, tendo em vista a forte correlação entre o perfil de expressão gênica global e a arquitetura epigenômica. A metilação do DNA, caracterizada pela inserção de um grupamento metil (-CH₃) em um carbono 5' de citosinas específicas do DNA (CpG), talvez venha a ser o processo de regulação epigenética melhor compreendido. O aumento dos níveis de metilação de regiões promotoras está intimamente relacionado com o decaimento ou silenciamento da expressão dos genes alvos, enquanto, regiões CpG localizadas no interior do corpo gênico parecem regular positivamente a expressão (JJINGO *et al.*, 2012). Além disso, já foi demonstrado que uma classe de proteínas que reconhecem e se ligam a regiões CpG metiladas (*metil-CpG-binding proteins*, MBPs) podem recrutar co-repressores transcricionais, tais como HDACs, bem como modificar a estrutura da cromatina, favorecendo o silenciamento transcricional (BOYES; BIRD, 1991).

As modificações pós-traducionais em proteínas do tipo histonas são caracterizadas pela adição reversível de diferentes grupos orgânicos ou peptídeos (acetil, metil, ubiquitina, SUMO, etc.) nas caudas dessas proteínas, em geral, ricas em lisinas. Essas alterações químicas refletem no nível de interação da molécula de DNA com as histonas e, portanto, assim como a metilação do DNA, são responsáveis pela alteração no perfil de expressão gênica da célula. Ainda dentro dos mecanismos epigenéticos, os RNA não-codificantes (ncRNA) representam um fator importante da regulação da expressão gênica em células hematopoéticas (MONTAGNER; DEHÓ; MONTICELLI, 2014).

1.2 Hematopoese clonal relacionada ao envelhecimento: um novo paradigma de leucemogênese

O aumento da expectativa de vida a partir do século XX é uma das grandes conquistas da medicina moderna. Embora isso represente uma mudança satisfatória, é de se notar também uma maior prevalência de doenças crônico-degenerativas relacionadas à idade, como o câncer (MIRANDA; MENDES; SILVA, 2016; SMITH *et al.*, 2009). O reconhecimento dessas tendências levou a um aumento dos esforços para entender melhor os mecanismos moleculares do envelhecimento e seu impacto na homeostase tecidual.

A idade aumentada tem se mostrado um fator de risco importante para o desenvolvimento de anemias e outras citopenias do SP, que por sua vez, predispõe esses indivíduos a quadros de infecções recorrentes (CARMEL, 2001). Ainda no contexto hematológico, uma série de estudos demonstrou que o número absoluto de CTH na MO, acompanhado de uma diminuição funcional dessas células, tende a crescer de acordo com o aumento progressivo da idade, quer seja em humanos ou camundongos (PANG *et al.*, 2011; PARK, 2017). Além disso, o perfil transcriptômico e características celulares de CTH durante o envelhecimento é demarcado por alterações nos padrões de ciclo celular (DE HAAN; LAZARE, 2018), expressão gênica (PANG *et al.*, 2011; ROSSI *et al.*, 2005) e resposta a danos no DNA (BEERMAN *et al.*, 2014; FLACH *et al.*, 2014). Mais recentemente, foi observado que o aumento das CTH ao longo do envelhecimento é um fenômeno decorrente da expansão de um ou mais clones celulares, que por vantagem seletiva, exercem um papel dominante no processo hematopoético (CHUNG; PARK, 2017). O estabelecimento de uma população clonal pode ocorrer em decorrência do surgimento de uma ou poucas mutações somáticas que conferem vantagem proliferativa sobre as CTH não-mutadas, ou tipo selvagem (*wild type*, WT) (CORCES-ZIMMERMAN *et al.*, 2014; KOEFFLER; LEONG, 2017; MAJETI, 2015). Entretanto, alternativamente, essa expansão clonal pode surgir sem a presença de uma mutação fundadora, ou seja, uma alteração genética responsável por iniciar o processo de transformação celular, ainda que não seja um evento suficiente para o estabelecimento de malignidade (VOGELSTEIN *et al.*, 2013). Isso não exclui nesses casos a participação de sinais extrínsecos, ou até mesmo, outros mecanismos intrínsecos não-genéticos que atribuam vantagem seletiva as CTH (ZINK *et al.*, 2017). A expansão clonal das CTH é reflexo do descontrole celular, possivelmente, ocasionado pela ruptura no funcionamento normal de proteínas e vias biológicas importantes para a célula. Um dos fenômenos moleculares associados à redução da função das CTH em indivíduos idosos é o grau de encurtamento de regiões teloméricas, que, em geral, não ocorre de forma uniforme nos indivíduos (TOWNSLEY; DUMITRIU; YOUNG, 2014). Além disso, CTH envelhecidas também podem exibir mudanças drásticas no perfil de metilação global, que por sua vez, são associados com perturbação na autorrenovação das CTH e diferenciação mieloide (CHUNG; PARK, 2017; SUN *et al.*, 2014).

As primeiras evidências experimentais de que a hematopoese clonal é um evento relativamente frequente em indivíduos saudáveis surgiram ainda na década de

70 quando Hitzeroth e colegas analisaram amostras de sangue de 981 mulheres africanas e observaram um desvio na frequência alélica dos marcadores da família gênica G6PD (BUSQUE; GILLILAND, 1998; HITZEROTH *et al.*, 1977). Quase uma década depois, Kristiansen *et al.* descreveram os padrões de inativação do cromossomo X em amostras sanguíneas de cerca de 500 gêmeos distribuídos entre 18 e 95 anos de idade (KRISTIANSEN *et al.*, 2005). Na ocasião, observaram índices aumentados de clonalidade em amostras de gêmeos idosos (34%) quando comparados aos mais jovens (15%). Em 2012, dois estudos de associação genômica em larga escala (GWAS) descreveram alterações no número de cópias (CNV) nos *loci* cromossômicos associados com neoplasias hematológicas, como 20q, 5q, 11q e 17p, em 2% dos indivíduos de 70 anos, aparentemente, saudáveis (JACOBS *et al.*, 2012; LAURIE *et al.*, 2012). Em ambos estudos, o mosaïcismo clonal adquirido predispsse um aumento do risco para o desenvolvimento de neoplasias hematológicas. Entretanto, apenas em 2014 houve uma quebra de paradigma no entendimento da hematopoese clonal, quando três grupos independentes descreveram a presença de mutações em marcadores subjacentes as malignidades mieloides em indivíduos não selecionados para neoplasias e levantaram a hipótese de que esse seria um evento pré-leucêmico (GENOVESE *et al.*, 2014; JAISWAL *et al.*, 2014; XIE *et al.*, 2014).

Cerca de 10% dos indivíduos acima de 65 anos de idade cursam com mutações genéticas somáticas em algum gene relacionado à etiopatogênese das malignidades mieloides, ao passo que, em indivíduos abaixo de 50 anos, a frequência dessas alterações é de 1%, aproximadamente (GENOVESE *et al.*, 2014). Curiosamente, a frequência alélica (VAF) dessas mutações no sangue periférico é baixa (10 – 20%), o que nos leva a acreditar que elas representam um estágio inicial da expansão clonal das CTH leucêmicas (CTH-L) (Figura 3). Em geral, essas variantes somáticas acometem genes de regulação epigenética, tais como, *DNMT3A*, *TET2*, *ASXL1* e *IDH1/2*, além de genes codificantes para proteínas do spliceossoma (*SF3B1* e *SRSF2*) e genes acionáveis (*JAK2* e *TP53*).

A maioria das mutações observadas na hematopoese clonal do idoso surge, provavelmente, de forma aleatória ao longo da vida. As mutações pontuais observadas, em sua grande maioria (55 – 65%), são transições C>T. Essas alterações são consequência da desaminação passiva da citosina e de erros no reparo de DNA, constituindo um tipo de assinatura mutacional do câncer associada ao envelhecimento (ALEXANDROV *et al.*, 2013). O papel do microambiente na hematopoese clonal

associada ao envelhecimento ainda é incerto. Entretanto, alguns estudos descrevem mudanças nos níveis citocinas ao longo da idade, muitas destas importantes na regulação das CTH e no processo inflamatório, tais como TNF- α e IFN- γ (CHAMBERS; GOODELL, 2007; DYBEDAL *et al.*, 2001; ERGEN; BOLES; GOODELL, 2012; KITAGAWA *et al.*, 1997).

A hipótese de que a presença das mutações somáticas em genes de neoplasias mieloides nos indivíduos saudáveis poderia ser uma condição pré-maligna, se deu através de estudos de associação. Uma forte correlação entre a hematopoese clonal e o risco aumentado de malignidade hematológica subsequente foi observada, ainda que não tenha sido estabelecido ao certo se esse estado pré-leucêmico é um biomarcador, a causa ou apenas um fator de risco relevante para a doença (GENOVESE *et al.*, 2014; JAISWAL *et al.*, 2014).

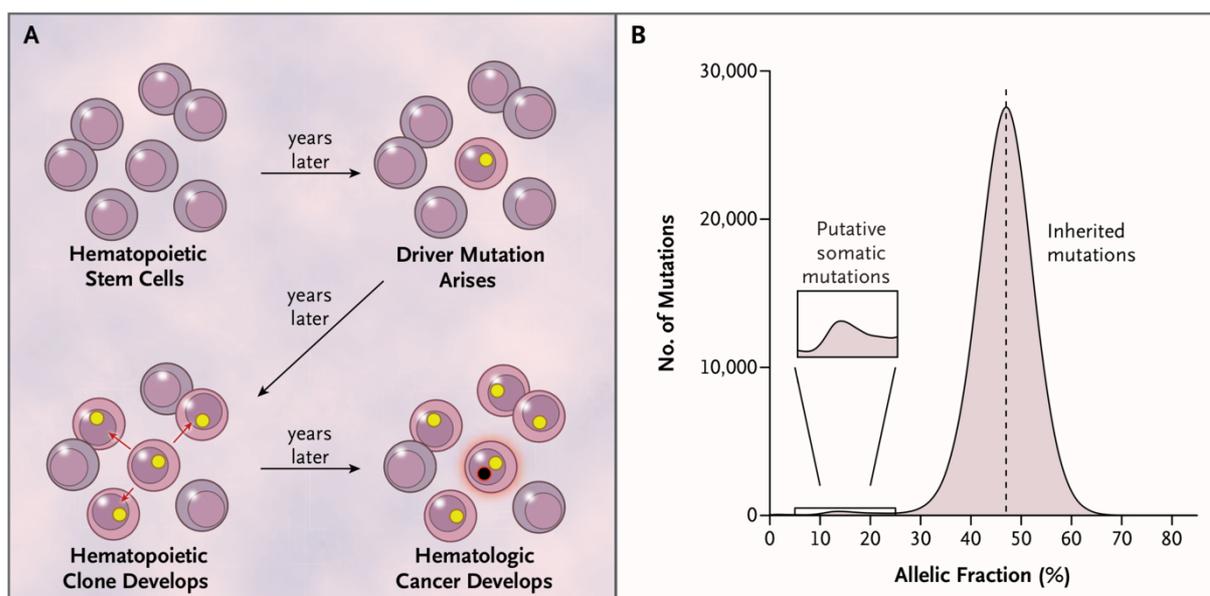


Figura 3 – Modelo de expansão clonal e frequência alélica das alterações somáticas na hematopoese clonal do idoso. (A) Modelo de expansão da CTH em decorrência do surgimento de mutações somáticas. A mutação ocorre ao longo dos anos levando a expansão do clone, agora pré-leucêmico. (B) Distribuição das VAF observadas a partir de dados genômicos para as mutações herdadas (VAF = 50%) e somáticas (~15%), à direita e esquerda do gráfico, respectivamente. [Fonte: (GENOVESE *et al.*, 2014)].

Aproximadamente 42% dos pacientes que vieram a desenvolver algum tipo de neoplasia hematológica apresentavam clonalidade no momento da coleta do DNA (fase pré-leucêmica) e manifestaram a doença, em média, cerca de 6 meses após a avaliação hematopoética. Além disso, a presença de uma mutação somática em

algum dos marcadores leucêmicos foi associada a um aumento de 12x no risco de desenvolvimento de câncer hematológico.

1.2.1 CHIP, ICUS, IDUS e CCUS.

Como já mencionado, as mutações observadas na hematopoese clonal em indivíduos saudáveis foram inicialmente descritas em malignidades hematológicas da linhagem mieloide, tais como, Síndromes Mielodisplásicas (SMD), Neoplasias Mieloproliferativas Crônicas (NMP), Leucemia Mielomonocítica Crônica (LMMC) e Mieloide Aguda (LMA). Se levado em consideração a incidência de SMD nos Estados Unidos (4.9 casos/100.000 habitantes/ano) (COGLE, 2015), é de se notar que nem todos os indivíduos normais com hematopoese clonal irão desenvolver a doença ou qualquer outro tipo de neoplasia hematológica. Por essa razão, essa condição foi denominada hematopoese clonal de potencial indeterminado (CHIP), definida pela presença de mutação(ões) somática(s) nas células do sangue, com VAF $\geq 2\%$, nos genes associados as malignidades mieloides em indivíduos sem distúrbio hematológico (STEENSMA *et al.*, 2015). A taxa estimada de progressão de CHIP para uma doença maligna é de 0,5-1,0% ao ano e ocorre, principalmente, nos indivíduos com maiores índices de clonalidade (BEJAR, 2017). Isto sugere que o CHIP poderia ser melhor descrito como uma condição de pouca significância clínica para as doenças malignas.

A situação não é muito diferente em pacientes com citopenias periféricas inexplicadas. Se a avaliação semiológica, associada à biópsia de MO, não encontrar a causa provável das citopenias, os pacientes podem ser agrupados às citopenias idiopáticas de significado indeterminado (ICUS) (VALENT *et al.*, 2012). Ao passo que indivíduos que apresentem algum grau de displasia medular com leve grau de citopenias periféricas, ou até mesmo indetectáveis, são classificados com displasia idiopática medular de significado incerto (IDUS). Ambas condições não cursam com marcadores de clonalidade, estabelecidos pela presença de mutações somáticas em alguns dos marcadores já discutidos. Entretanto, a presença de uma alteração genética em algum dos genes alvos conduz os indivíduos inicialmente classificados com ICUS/IDUS a um novo grupo, denominado citopenias clonais de significado indeterminado (CCUS) (BEJAR, 2017) (Tabela 1).

Ainda que essas condições pré-malignas sejam bastante dinâmicas e permitam o desenvolvimento de um modelo de leucemogênese baseado na evolução clonal da CTH pré-leucêmica (Figura 4), o perfil mutacional subjacente a cada uma delas não é necessariamente o mesmo. Mutações em *DNMT3A* e *TET2* são comuns na CHIP e CCUS, entretanto, a frequência de alterações em genes com significância prognóstica adversa na SMD (*ASXL1*, *RUNX1* e *TP53*) parece ser maior apenas na CCUS (CARGO *et al.*, 2015; KWOK *et al.*, 2015).

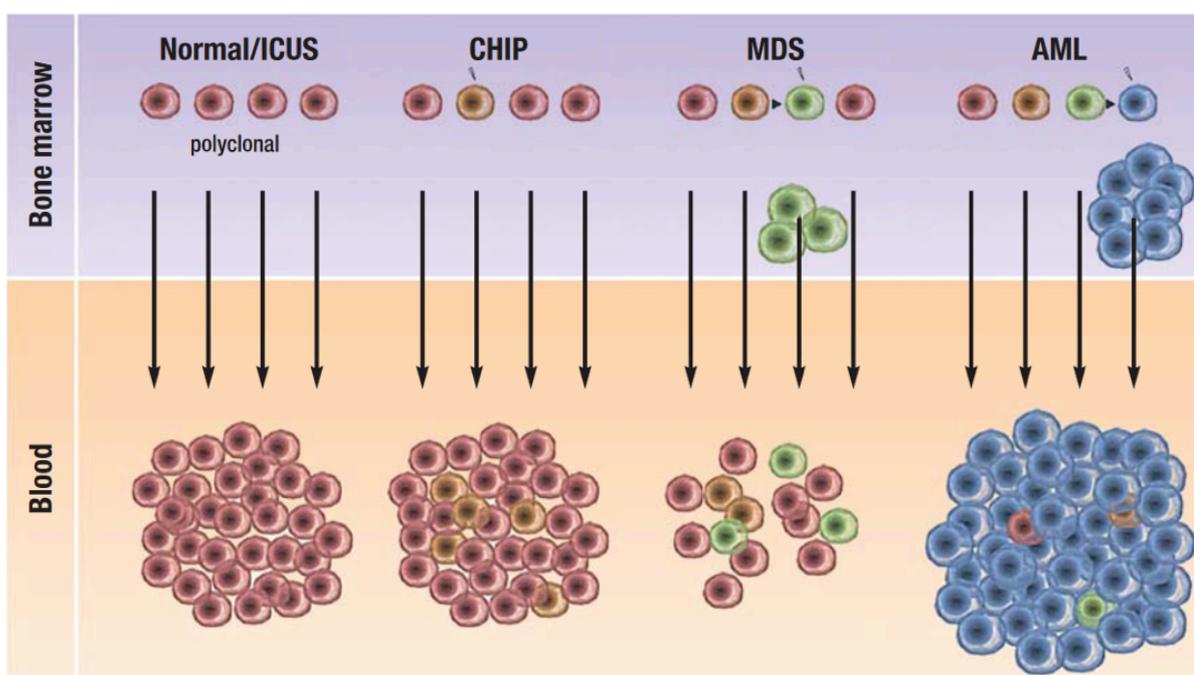


Figura 4 – Modelo de evolução clonal em neoplasias mieloides (SMD/LMA). A CHIP, um estado precursor para as malignidades mieloides, depende da presença de mutações genéticas somáticas. Essas alterações ocorrem, geralmente, nos genes *DNMT3A*, *TET2*, *ASXL1* e *SF3B1*. A medida que outras alterações somáticas aparecem, o paciente evolui de uma fase de hematopoese clonal para uma neoplasia hematológica (SMD e LMA). [Fonte: (HEUSER; THOL; GANSER, 2016)].

Malcovati e colaboradores examinaram a presença de mutações em aproximadamente 40 genes alvos em amostras de 154 pacientes com ICUS. Cerca de 36% dos indivíduos apresentaram marcador de clonalidade, o que os reclassificou para CCUS. Em comparação com indivíduos sem mutações (ICUS), as CCUS tinham uma taxa de risco de progressão de 14x e 95% de probabilidade de progressão em 10 anos, versus 9% em pacientes ICUS, o que sugere que o risco "indeterminado" no CCUS pode não ser tão indeterminado assim (MALCOVATI *et al.*, 2017).

Tabela 1 – Hematopoese clonal e condições relacionadas.

Acrônimo	Condição	Definição	Clonalidade	Citopenia	Displasia
CHIP	Hematopoese Clonal de Potencial Indeterminado	Mutações somáticas (VAF \geq 2%) em genes associados a malignidade mielóide presentes no sangue de indivíduos sem neoplasia hematológica	+	-	-
ICUS	Citopenias Idiopáticas de Significado Indeterminado	Citopenia(s) inexplicadas(s), sem evidência de hematopoese clonal, que não preenchem os critérios diagnósticos para neoplasia hematológica	-	+	-
IDUS	Displasia Idiopática Medular de Significado Incerto	Displasia morfológica inexplicável na MO com ausência de citopenia(s) periférica(s)	-	-	+
CCUS	Citopenias Clonais de Significado Indeterminado	Uma ou mais citopenias inexplicadas com ausência de displasia medular, ou vice-versa, que não preenchem os critérios diagnósticos para malignidade hematológica, mas que apresentam mutações somáticas em genes associados as neoplasias mielóides	+	+/-	+/-

Abreviatura(s): VAF, frequência alélica; MO, medula óssea.

1.3 Síndromes mielodisplásicas: uma doença maligna pré-leucêmica

Em 1976, um estudo promovido pelo grupo Franco-Americano-Britânico (FAB) propôs a classificação de diferentes leucemias agudas. Na ocasião, o termo síndrome mielodisplásica (SMD) referia-se a um pequeno conjunto de doenças neoplásicas que apresentavam índices elevados de progressão à LMA (BENNETT *et al.*, 1976). Hoje, por definição, SMD é compreendida como uma doença clonal decorrente da transformação maligna da CTH, que por sua vez, leva a hematopoese ineficaz, ou displásica, associada à citopenia(s) periférica(s) (COREY *et al.*, 2007). O diagnóstico de SMD é bastante complexo, e logo no seu início é fundamentado em critérios de exclusão diagnóstica para anemias ferroprivas e doenças infecciosas. Uma vez que seja considerada a malignidade, exames laboratoriais complementares são requeridos, em especial, a avaliação do esfregaço e biópsia da MO, para identificação de figuras displásicas, percentual de células CD34+ e avaliação do grau de fibrose; e análise citogenética, para determinação de marcadores de clonalidade (ARBER *et al.*, 2016).

A SMD não é uma doença, mas sim um conjunto delas. Sua heterogeneidade clínica é reflexo da sua complexidade biológica. Em 1982, o sistema de classificação elaborado pelo grupo FAB dividiu a SMD em cinco subtipos, utilizando critérios clínicos como o percentual de blastos e a presença de sideroblastos em anel na MO (BENNETT *et al.*, 1982). Entretanto, no ano 2000, a Organização Mundial da Saúde (OMS) desenvolveu um sistema próprio de classificação da SMD como tentativa de resolver algumas deficiências do sistema FAB, criando subtipos clinicamente mais homogêneos (BENNETT, 2000). Ao longo dos anos a classificação proposta pela OMS foi revisada e, atualmente, sua versão mais recente, publicada em 2016, estratifica a SMD em 6 subtipos distintos: (I) SMD com displasia unilinhagem (SMD-DU), (II) SMD com displasia multilinhagem (SMD-DM), (III) SMD com sideroblastos em anel (SMD-SA), (IV) SMD com excesso de blastos (SMD-EB), (V) SMD com del(5q) isolada, e (VI) SMD inclassificável (SMDi), além de uma entidade provisória, a citopenia refratária da infância (ARBER *et al.*, 2016).

De todas as modificações propostas pela OMS no seu sistema de classificação, a mais marcante foi a incorporação de uma alteração genética para a discriminação

de um subtipo à parte. Pacientes com del(5q) isolada cursam, em sua maioria, com anemia, baixo percentual de blastos na MO e contagem de plaquetas normal ou discretamente elevada. Em geral, são de bom prognóstico e dificilmente progridem à LMA, além de possuírem terapia específica, o imunossupressor lenalidomida (ADEMA; BEJAR, 2013).

Dentro do sistema de classificação das neoplasias hematológicas proposto pela OMS, a SMD não é o único exemplo de doença que define um dos seus subtipos com base em alterações genéticas. A investigação genética é uma conduta importante para a classificação de subtipos mais homogêneos de LMA, leucemias e linfomas de células B, neoplasias eosinofílicas com rearranjos em *PDGFRA*, *PDGFRB* e *FGFR1*, além de ser critério diagnóstico para leucemia mieloide crônica (LMC) e demais NMP (ARBER *et al.*, 2016). A incorporação de alterações genéticas para discriminar categorias de doença mais homogêneas em relação ao desfecho, iniciada na classificação das neoplasias hematológicas, tem sido introduzida na classificação de tumores sólidos. A classificação dessas doenças baseada em subtipos moleculares específicos vem permitindo a estratificação mais homogênea dos pacientes, identificação de novos biomarcadores diagnósticos e prognósticos, e o estabelecimento de novos alvos terapêuticos, o que vai ao encontro da medicina de precisão, projetada como o futuro do tratamento oncológico.

1.3.1 Marcadores somáticos das SMD e demais neoplasias mieloides

Os primeiros relatos na literatura de estudos que avaliaram a presença de mutações genéticas na SMD foram da década de 80, onde foram identificadas alterações somáticas nos genes *NRAS* e *TP53*, ambas com frequência inferior a 10% nas respectivas coortes de análise (JANSSEN *et al.*, 1987; KANEKO *et al.*, 1995). Hoje, quase 40 anos depois, os painéis genômicos utilizados para a caracterização da doença contemplam ao menos 50 genes alvos (HAFERLACH *et al.*, 2014; PAPAEMMANUIL *et al.*, 2013). Isso se dá pelo fato de que há algumas décadas atrás o rastreamento molecular era limitado pelo número de alvos e tamanho dos genes, independentemente da abordagem empregada. Para o sequenciamento direto de Sanger, que depende da amplificação prévia do fragmento de análise, a avaliação de

muitos marcadores requer grande quantidade de material genético (DNA) a custo elevado e com baixa sensibilidade. O desenvolvimento tecnológico impulsionou a geração de sequenciadores massivos de próxima geração (sequenciamento de nova geração; NGS) que permitiram a análise de inúmeros genes com elevado grau de profundidade (sensibilidade) e melhor custo-benefício, garantindo a exploração em larga escala de doenças genéticas complexas, como a SMD.

Os marcadores genéticos da SMD podem ser agrupados em diferentes categorias biológicas: (des)metilantes do DNA, modificadores de histonas, participantes do complexo de spliceossoma, fatores transcricionais, transdutores de sinais e participantes do complexo coesina (GROVE; VASSILIOU, 2014). Vale ressaltar que nenhum destes biomarcadores é específico da doença, pois são comumente observados em outras malignidades mieloides, ainda que com frequência distinta (PATEL *et al.*, 2017). Mutações em genes de função epigenética (*TET2* e *DNMT3A*) e do complexo spliceossoma (*SF3B1* e *SRSF2*) parecem ter efeito fundador nessas doenças, ou seja, são alterações somáticas que acometem os primeiros clones (pré-)malignos, e portanto, são observadas ao longo de toda a arquitetura genômica da doença (BEJAR; ABDEL-WAHAB, 2013). Na prática, isso reflete na VAF elevada dessas mutações, tendo em vista que elas estão presentes na maioria dos clones malignos. Curiosamente, os genes *TET2*, *DNMT3A*, *SF3B1* e *SRSF2* são os mesmos descritos como mutados nas diferentes entidades clínicas previamente discutidas (CHIP e CCUS), o que corrobora com o fato de que essas seriam fases pré-leucêmicas detectadas antes do aparecimento dos primeiros sintomas.

As proteínas DNMT3A e TET2 atuam dentro da mesma via biológica, a (des)metilação do DNA. A família de enzimas DNA-metiltransferases (DNMTs) é composta por três elementos distintos; DNMT3a e DNMT3b, responsáveis pela metilação *de novo* (HSIEH, 1999; TAKESHIMA *et al.*, 2006); e DNMT1, responsável pela metilação de manutenção, mantendo, necessariamente, o padrão de metilação de uma fita molde de DNA (LOGAN; MITCHELL; LOBIE, 2013; YU; BAEK; KAANG, 2011). As mutações no gene *DNMT3A* são observadas em cerca de 8% dos pacientes com SMD (WALTER *et al.*, 2011) e 20% dos pacientes com LMA de cariótipo normal (LEY *et al.*, 2010). As variantes observadas são, majoritariamente, do tipo missense, com frequência elevada para a mutação R882H. O valor prognóstico das mutações em *DNMT3A* ainda é bastante controverso. Entretanto, alguns estudos sugerem que

as mutações somáticas no gene atribuem prognóstico adverso na SMD e LMA, progressão acelerada à LMA secundária, além de permitirem a estratificação clínica das LMA de risco intermediário quando associadas a outros marcadores (LIN *et al.*, 2018; PAPAEMMANUIL *et al.*, 2016; WALTER *et al.*, 2011).

A maioria das mutações em *DNMT3A* se encontra em heterozigose, o que atribui uma função dominante negativa das variantes somáticas sobre o alelo WT. Ensaio *in vitro* comprovam que a proteína mutante (R882H) leva à diminuição drástica nos níveis de metilação global quando comparada à forma selvagem da proteína. Quando coexpressas, a variante R882H inibe significativamente a enzima WT impedindo sua capacidade de formar homotetrâmeros (KIM *et al.*, 2013; RUSSLER-GERMAIN *et al.*, 2014). No último ano, um estudo caracterizou o status de metilação global por sequenciamento em larga escala de células primárias leucêmicas e não-leucêmicas obtidas de pacientes com LMA, portadores ou não da mutação *DNMT3A* R882H (SPENCER *et al.*, 2017). O grupo observou que células hematopoiéticas não-leucêmicas com a mutação R882H apresentavam perda de metilação, sugerindo que a hipometilação do genoma ocorre antes mesmo da doença. Além disso, estudos *in vivo* demonstram que camundongos transplantados com CTH transduzidas com *DNMT3A*^{R882H} exibem acúmulo de progenitores tronco aberrantes, resultado da interação da proteína mutante com o complexo repressivo do polycomb 1 (PRC1), atividade não-canônica recentemente descrita (KOYA *et al.*, 2016).

Ainda sobre os marcadores com impacto na função epigenética, em 2009, Delhommeau e colaboradores descreveram a presença de mutações no gene *TET2* (metilcitosina dioxigenase 2) em pacientes com SMD, NMP e LMA *de novo* e secundária (DELHOMMEAU *et al.*, 2009). A investigação por alterações no gene foi motivada pelos achados publicados em 2005, onde foi reportada a deleção do 4q24 em três pacientes com LMA (VIGUIÉ *et al.*, 2005). Análises por FISH mostraram que a região comumente deletada em todos os casos compartilhava de um único gene comum, o *TET2*. Deleções do locus 4q24 ou deleções completas do gene são infrequentes em pacientes com SMD (OLIVEIRA *et al.*, 2013), em contraste, mutações gênicas (inserções, deleções e mutações de ponto), compreendidas por toda a região codificante do gene (éxons 3 – 11), podem atingir até 60% dos pacientes com LMMC (ITZYKSON *et al.*, 2013). As mutações ocorrem em heterozigose na grande maioria dos casos e quando em homozigose, representam perda de heterozigosidade (LOH).

A relevância clínica das alterações em *TET2* também ainda é incerta, entretanto, a frequência aumentada de mutações na LMA secundária, sugere uma correlação entre *TET2* e a progressão leucêmica das NMP (ABDEL-WAHAB *et al.*, 2010; KLAMPFL *et al.*, 2011; SCHAUB *et al.*, 2010). Em pacientes com SMD, mutações em *TET2* parecem atribuir valor preditivo de resposta aos hipometilantes (BEJAR *et al.*, 2014; ITZYKSON *et al.*, 2011; TRAINA *et al.*, 2014).

A enzima *TET2* é um membro da família de dioxigenases (*TET1 – 3*) dependentes de Fe^{2+} e α -KG responsáveis pela oxidação de 5-metilcitosina (5-mC) em 5-hidroximetilcitosina (5-hmC), 5-formolcitosina (5-fC) e 5-carboxicitosina (5-caC), respectivamente (KO; RAO, 2011). Inicialmente, pouco se sabia sobre a real importância biológica das enzimas TETs e 5-hmC, entretanto, nos últimos anos, uma série de estudos mostraram que 5-hmC é um intermediário da desmetilação do DNA, e que as demais citosinas modificadas (5-fC e 5-caC) também são fruto da atividade enzimática de *TET1 – 3* (GUO *et al.*, 2011; HE *et al.*, 2011; ITO *et al.*, 2011). Mais tarde, outros trabalhos mostraram que a desmetilação ativa do DNA relacionada às TETs se dá pelo recrutamento da enzima Timina-DNA-glicosilase (TDG), que por sua vez, orienta a excisão de 5-caC em uma citosina não modificada, evento esse conhecido como mecanismo de reparo do DNA por excisão de base (BER) (CORTELLINO *et al.*, 2011) (Figura 5).

TET2 exerce um papel fundamental na hematopoese. Modelos funcionais *TET2*-deficientes demonstraram uma diminuição dramática nos níveis globais de 5-hmC no genoma, levando ao comprometimento da hematopoese normal, e induzindo, em alguns casos, transformação maligna (KAMEDA *et al.*, 2015; KO *et al.*, 2011; LANGLOIS THIERRY *et al.*, 2014; MORAN-CRUSIO *et al.*, 2011). Dentro do contexto mielóide, o silenciamento de *TET2* em CTH humanas favorece a mielopoese, com expansão da população granulocítica, associada a expansão e perda de diferenciação eritróide, o que, em parte, mimetiza modelos de NMP e SMD, respectivamente (MADZO *et al.*, 2014; PRONIER *et al.*, 2011; YAN *et al.*, 2017).

De todos os marcadores descritos nas neoplasias mielóides, as mutações em genes do spliceossoma talvez venham a ser as alterações mais intrigantes. Muito se discutiu sobre a relação entre *splicing* e câncer, com ênfase na dinâmica de edição do RNA mensageiro (mRNA) e como isoformas oncogênicas poderiam levar ao fenótipo tumoral (SINGH; EYRAS, 2016). Entretanto, somente em 2011, Yoshida e

colaboradores descreveram a presença de mutações somáticas em sete genes codificantes para proteínas do complexo do spliceossoma (*U2AF1*, *SRSF2*, *ZRSR2*, *U2AF65*, *SF3B1*, *SF3A1* e *SF1*), responsável pela excisão de íntrons e junção dos éxons da molécula de mRNA (YOSHIDA *et al.*, 2011) (Figura 6). A frequência com que as mutações do spliceossoma ocorrem na SMD é relativamente alta (45 – 80% dos casos) e ao que parece, podem ser comumente encontradas também em pacientes com leucemia linfocítica crônica (LLC) (QUESADA *et al.*, 2011; ROSSI *et al.*, 2011) e LMMC (MEGGENDORFER *et al.*, 2012). Esses achados moleculares impulsionaram o rastreamento de mutações nesses mesmos marcadores em tumores sólidos, que por sua vez, se mostraram infrequentes (BEJAR, 2016).

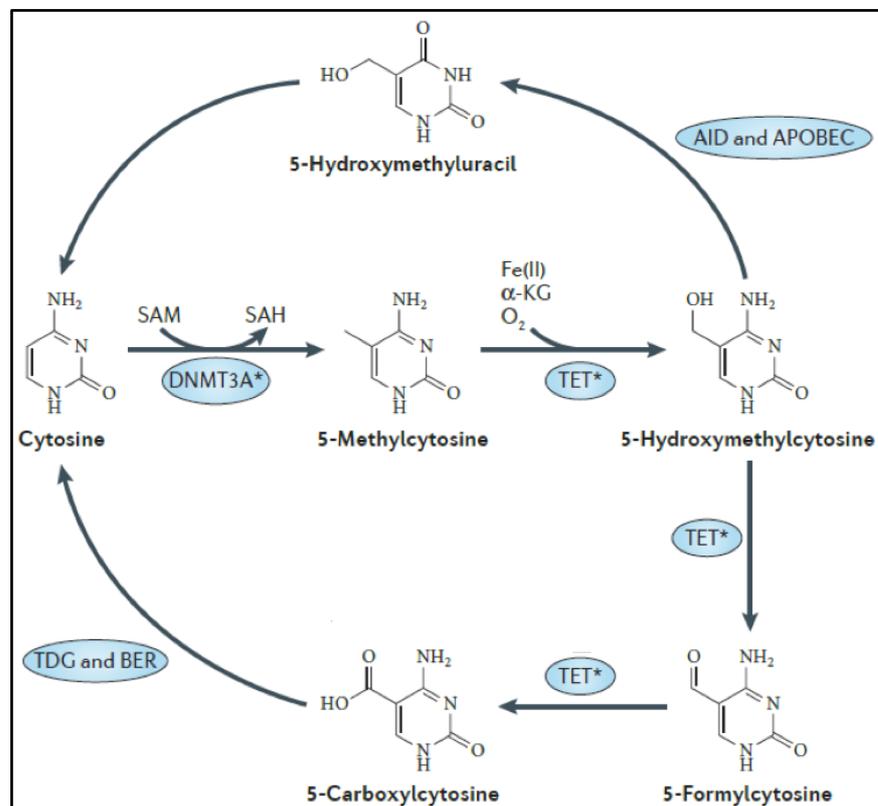


Figura 5 – Metilação e desmetilação do DNA. As enzimas DNMTs convertem as citosinas não-metiladas das ilhas CpG do genoma em 5-metilcitosina (5-mC), um marcador de repressão gênica localizado na região promotora. As enzimas TETs, por sua vez, convertem 5-mC em 5-hidroximetilcitosina (5-hmC), que por demetilação ativa, dependente de reparo do DNA, é oxidado em 5-formilcitosina (5-fC) e 5-carboxilcitosina (5-caC), respectivamente. [Fonte: (SHIH *et al.*, 2012)].

As mutações do spliceossoma são mutualmente exclusivas e ocorrem necessariamente em heterozigose. As tentativas de geração de modelos homozigóticos celulares e murinos foram frustradas, isso porque as mutações bi-

alélicas são uma condição letal (JOSHI; HALENE; ABDEL-WAHAB, 2017). O gene *SF3B1* é o mais frequentemente mutado na SMD (20 – 28%), em especial na SMD-SA, já tendo sido relatada frequência >80% neste subtipo da doença (MALCOVATI *et al.*, 2011). Estudos posteriores realizados com coortes exuberantes de SMD-SA comprovaram a forte relação genótipo-fenótipo existente entre mutações em *SF3B1* e SMD-SA, o que estimulou a OMS a integrar a análise molecular deste gene como um dos critérios diagnósticos maior para esse subtipo da doença (ARBER *et al.*, 2016). Além de direcionar o diagnóstico da SMD, as mutações em *SF3B1* atribuem valor prognóstico. Clinicamente, os pacientes cursam com citopenias mais brandas e sobrevida livre de eventos mais prolongada (PAPAEMMANUIL *et al.*, 2011). Na análise multivariada, incluindo fatores prognóstico já estabelecidos para a doença, as mutações em *SF3B1* foram associadas com maior sobrevida global e menor risco de evolução para LMA (MALCOVATI *et al.*, 2011, 2015). A análise de transcriptoma por RNA-seq revelou um padrão de expressão diferencial de alvos já relacionados as neoplasias mieloides, como *ASXL1* e *CBL*, além de genes importantes na homeostase do ferro e metabolismo mitocondrial (*ALAS2*, *ABCB7* e *SLC25A37*) em amostras de pacientes com mutações em *SF3B1* (DEL REY *et al.*, 2015; DOLATSHAD *et al.*, 2015, 2016).

Nos últimos anos, diferentes grupos tentaram desvendar os mecanismos moleculares subjacentes às mutações do spliceossoma, sobretudo, como essas variantes patogênicas impactavam a edição do mRNA. De fato, as mutações em *SRSF2*, *U2AF1* e *SF3B1* alteram estruturalmente a molécula de RNA madura, porém, curiosamente, os mecanismos pelos quais essas alterações ocorrem são gene-dependente (INOUE; BRADLEY; ABDEL-WAHAB, 2016).

SRSF2 normalmente reconhece elementos ESE (*exonic splicing enhancer*) com um motivo consenso de 5`-SSNG-3` (onde, S = C/G) dentro do pré-mRNA, sendo esse um sinal molecular de que essa se trata de uma região exônica (DAUBNER *et al.*, 2012). Ao reconhecer, a proteína então se liga ao elemento ESE, com a mesma avidéz de interação apara ambos motivos (CCNG e GGNG). A análise de transcritos obtidos de K562 superexpressando *SRSF2* P95H, a mutação mais frequente deste gene, exibem enriquecimento dos motivos CCNG, o que demonstra, claramente, uma maior afinidade da proteína mutante por sequências deste tipo (KIM *et al.*, 2015; ZHANG *et al.*, 2015).

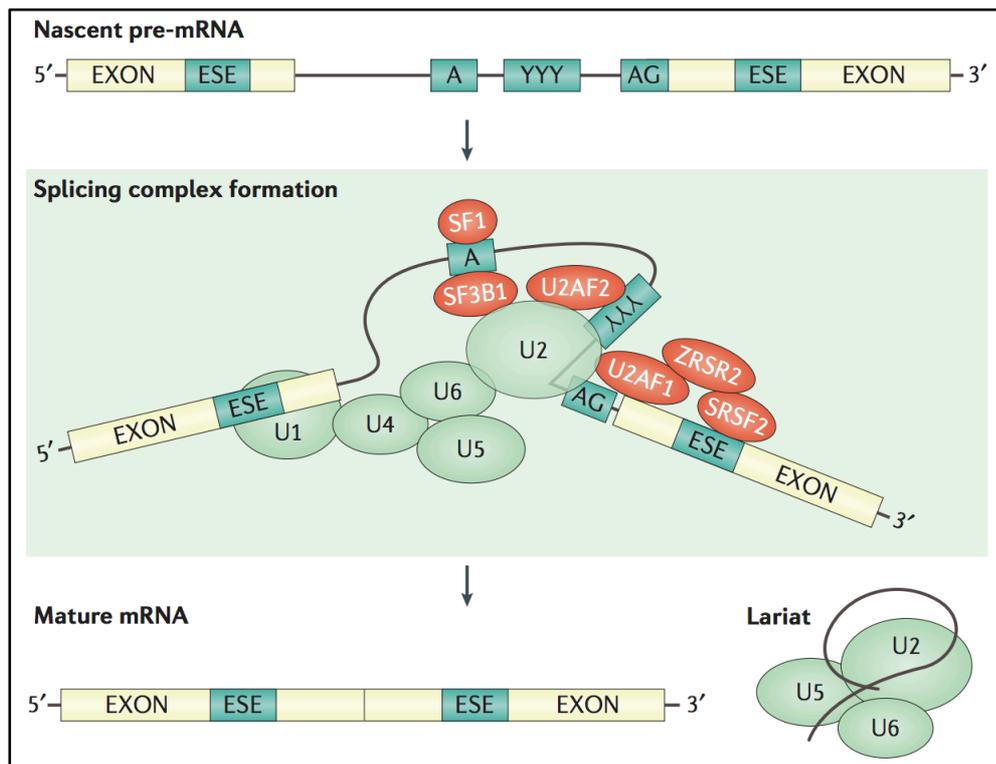


Figura 6 – Edição do RNA mensageiro (*splicing*). Ilustração simplificada das etapas da edição do RNAm (*splicing*) e das proteínas envolvidas no processo. Proteínas codificadas por genes mutados na SMD estão marcadas em vermelho [Fonte: (SPERLING; GIBSON; EBERT, 2017)].

Apesar das mutações em *SF3B1* serem as mais frequentes na categoria de genes do spliceossoma, os mecanismos moleculares pelos quais as variantes patogênicas levam ao distúrbio na edição do RNA não são tão claros quanto as alterações de *SRSF2*. *SF3B1* é um membro do complexo ribonucleoproteico (snRNP) U2, que é responsável pelo reconhecimento do terminal 3' da sequência intrônica (3'SS). U2 snRNP é direcionado para as sequências 3'SS graças ao reconhecimento prévio de sequências do tipo *branchpoint* (BPS) – sequência motivo degenerada localizada, geralmente, 21-34 pares de bases montante de 3'SS (WAHL; LÜHRMANN, 2015). Aproximadamente metade dos pacientes mutados para *SF3B1* apresentam a alteração missense K700E, embora existam outros *hotspots* próximos (R625, H662 e K666), todos localizados entre os éxons 14 e 15 do gene, responsáveis por codificarem o domínio HEAT da porção C-terminal da proteína (ARMSTRONG *et al.*, 2018). Diferentes modelos celulares mutantes para *SF3B1* mostraram que a presença da mutação leva ao reconhecimento equivocado do sítio de clivagem intrônica. Os dinucleotídeos AG críticos, localizados a 10 – 30 pb montante dos dinucleotídeos AG canônicos, são reconhecidos preferencialmente e garantem por

sua vez a retenção de uma porção intrônica no mRNA maduro (ALSAFADI *et al.*, 2016; DARMAN *et al.*, 2015; OBENG *et al.*, 2016). Embora alguns desses modelos funcionais não tenham sido testados em células hematopoiéticas, o transcriptoma por RNA-seq de pacientes com SMD portadores de mutação em *SF3B1* apresentam isoformas de mRNA com o mesmo padrão (KESARWANI *et al.*, 2017).

A forte correlação entre a mutação SF3B1 K700E e a SMD com sideroblastos em anel sugere uma relação causal entre a alteração genética e esta característica displásica tão comum na doença. Cinco grupos independentes desenvolveram modelos murinos de haplosuficiência em *SF3B1*, ou por deleção mono-alélica do gene (*sf3b1^{+/-}*) (MATSUNAWA *et al.*, 2014; VISCONTE *et al.*, 2012; WANG *et al.*, 2014) ou por *knock-in* da mutação K700E (MUPO *et al.*, 2017; OBENG *et al.*, 2016). O primeiro estudo publicado em 2012, por Visconte e colaboradores, demonstrou que o modelo gerado apresentava sideroblastos em anel na MO e um quadro de linfopenia periférica com taxas normais de hemoglobinas e plaquetas. Outros dois estudos relataram anemia periférica com ausência de sideroblastos em anel medulares (MUPO *et al.*, 2017; OBENG *et al.*, 2016). Matsunawa *et al.* e Wang *et al.* descrevem alterações proliferativas nas CTH, porém sem fenótipo compatível com SMD. Em síntese, nenhum dos modelos gerados foi compatível com a doença de fato, de forma a reproduzir citopenias periféricas da linhagem mieloide associadas a figuras displásicas na MO, o que demonstra, em parte, a limitação de sistemas murinos para modelagem de doenças humanas, sobretudo, malignas.

2. JUSTIFICATIVA

A compreensão sobre as bases genéticas das neoplasias mieloides e, mais recentemente, da hematopoese clonal e condições relacionadas, foi bastante ampliada com o emprego de abordagens laboratoriais de avaliação genômica em larga escala, em especial, o NGS. Isso não apenas permitiu o estabelecimento de um arcabouço molecular e o monitoramento clonal dessas doenças, mas também a implementação de novos marcadores na prática clínica.

As mutações em genes de função epigenética e edição do RNAm exercem um papel fundador nas malignidades mieloides, o que por sua vez, induz expansão do clone leucêmico, resultando em hematopoese clonal e posteriormente, neoplasia. Quando comparadas ao panorama genético dos tumores sólidos, as neoplasias hematológicas são menos heterogêneas. O melanoma, cânceres colorretal, de pulmão e de pâncreas, por exemplo, carregam de centenas a milhares de mutações somáticas, enquanto as leucemias não exibem um repertório maior que dez, atestando que a heterogeneidade genética destas doenças é significativamente menor quando comparada a outras condições malignas. Essa característica facilita, por sua vez, a modelagem das neoplasias sanguíneas, sobretudo na era da edição genômica com o advento da ferramenta CRISPR/Cas9. A utilização deste sistema biotecnológico no âmbito das doenças clonais do sangue permitiria investigar o real impacto das alterações moleculares relacionadas à hematopoese clonal e neoplasias na biologia da célula.

Estudos funcionais clássicos utilizando modelos experimentais de doenças malignas mostraram o efeito patogênico das alterações somáticas subjacentes às respectivas doenças ao comprovarem o impacto das mesmas na homeostase celular e/ou tecidual. Em geral, oncogenes e genes supressores tumorais, quando alterados, atribuem aumento na proliferação e/ou perda de sensibilidade a estímulos apoptóticos. Além disso, algumas dessas alterações, quando associadas a um fenótipo mais agressivo, podem levar ao aumento de motilidade, característica de células com potencial metastático, e em alguns casos, perturbam a diferenciação. Pouco se sabe como as mutações em *TET2*, *DNMT3A* e de genes do spliceossoma (*SF3B1* e *SRSF2*) impactam na biologia celular, sobretudo, em eventos relevantes à carcinogênese.

A edição gênica associada à estudos funcionais que avaliem aspectos biológicos importantes da carcinogênese, tais como, proliferação, diferenciação e morte celular, poderiam ajudar a entender, em parte, a relevância dos eventos fundadores na leucemogênese humana.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar o impacto funcional das mutações frequentemente observadas na hematopoese clonal e em neoplasias mieloides, com enfoque nos eventos fundadores (genes de regulação epigenética e do spliceossoma), através do estabelecimento de modelos celulares geneticamente editados por CRISPR/Cas9.

3.2 Objetivos específicos

- Estabelecer uma linhagem matriz para o desenvolvimento de modelos neoplásicos a partir da edição genética do(s) alvo(s) de interesse;
- Determinar o impacto das mutações em *DNMT3A*, *TET2*, *SF3B1* e *SRSF2* na proliferação e morte por apoptose utilizando clones celulares WT e mutantes para os respectivos genes alvos;
- Investigar se a presença de mutações em genes do spliceossoma compromete a viabilidade celular frente ao estresse genotóxico;
- Avaliar a dinâmica de competição clonal *in vitro* e *in vivo* entre as células WT e mutadas;
- Identificar as citocinas diferencialmente expressas nas diferentes condições (selvagem e mutada) e avaliar seu papel *in vitro*;
- Avaliar o impacto proliferativo dos diferentes clones gerados sob influência de células estromais hematopoéticas normais e neoplásicas; e
- Investigar o impacto de mutações co-ocorrentes em genes do spliceossoma e de regulação epigenética na proliferação, apoptose e diferenciação hematopoética *in vitro*.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Estratégias para edição gênica por CRISPR/Cas9

Duas linhagens celulares distintas foram utilizadas para geração dos modelos baseados em edição genética estabelecidos ao longo deste estudo. Para isso, essas células foram modificadas com dois plasmídeos independentes. O primeiro, permite a expressão indutível da enzima endonuclease eCas9 e gene repórter fluorescente mediante o tratamento com antibiótico da família das tetraciclina. O segundo, carrega o gRNA específico que direciona à região de edição do genoma, além de gene repórter. Essa estratégia permite que um mesmo clone possa ser utilizado para todas as estratégias de edição de DNA, independente do sítio do genoma (Figura 7).

4.1.1 Linhagens celulares

Os ensaios funcionais executados neste estudo foram realizados com clones celulares editados geneticamente a partir da linhagem hematopoética K562, célula eritroleucêmica estabelecida da amostra de SP de uma paciente com LMC em crise blástica. Células K562 apresentam a alteração citogenética t(9;22), e portanto, expressam o gene de fusão BCR-ABL. Alterações cromossômicas adicionais, tais como, aberrações derivativas dos cromossomos 5 e 7, dissomia do X e mutações em *CDKN2A* e *TP53* já foram relatadas em subclones minoritários desta linhagem. Essas células foram cultivadas em meio IMDM (Thermo Fisher Scientific) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) (Thermo Fisher Scientific) e antibióticos [penicilina/streptomicina 10 U/mL] (Thermo Fisher Scientific).

Paralelamente, algumas das edições do DNA foram realizadas também em células HEK 293T, célula epitelial estabelecida a partir tecido renal embrionário humano. Para isso, estas foram cultivadas em meio DMEM (Thermo Fisher Scientific) suplementado com 10% de SFB e antibióticos [10 U/mL]. Ambas as linhagens foram cultivadas a 37°C em estufa de CO₂ a 5% e saturação de umidade atmosférica.

4.1.2 Desenho dos RNA guias (gRNA)

Os gRNA utilizados neste estudo foram desenhados através da análise *in silico* com o programa CRISPR Design, disponibilizado gratuitamente pelo *Massachusetts Institute of Technology* (MIT) (<http://crispr.mit.edu/>). As sequências referências de DNA dos éxons 23 do gene *DNMT3A* (NG_029465.2), éxon 15 de *SF3B1* (NG_032903.2), éxon 1 de *SRSF2* (NG_032905.1) e éxon 3 de *TET2* (NG_028191.1), foram obtidas através do banco de dados genômicos *Genome Browser* (<https://genome.ucsc.edu/>) e então carregadas no programa *online*. Todas as sequências gênicas possuíam, aproximadamente, 200 nucleotídeos de extensão. Para os genes cujo o interesse era a inserção de mutação pontual, para o desenvolvimento de um modelo do tipo *knock-in*, as sequências fornecidas apresentavam cerca de 100 nucleotídeos a montante, e 100, a jusante ao sítio da mutação. Para cada gene alvo foi selecionado apenas uma sequência de gRNA com aproximadamente 18 nucleotídeos de extensão, cujos critérios de seleção foram maior proximidade do sítio mutacional e maior pontuação, que diz respeito à especificidade da região alvo. A seguir, oligonucleotídeos complementares referentes aos gRNA selecionados foram confeccionados. Para confecção de oligonucleotídeos sense (S), a sequência CACC foi inserida na porção 5' das sequências de gRNA iniciadas com nucleotídeo guanina (G), ao passo que, para sequências iniciadas com nucleotídeos diferente de G, foi atribuído CACCG à região 5'. Para confecção das sequências antisense (AS), foi gerada a sequência complementar do gRNA fornecido pelo CRISPR Design e a sequência foi adicionada AAAC na porção 5'. As sequências dos oligonucleotídeos utilizados para a síntese dos gRNA estão disponibilizadas na Tabela 2.

Tabela 2 – Oligonucleotídeos utilizados para a confecção dos gRNA.

Gene alvo	Éxon	Oligonucleotídeos	
		Orientação	Sequencia (5' → 3')
DNMT3A	23	S	CACCGAGACGTCAGTATAGTGGAC
		AS	AAACGTCCACTATACTGACGTCTCC
SF3B1	15	S	CACCGGTGGATGAGCAGCAGAAAGTT
		AS	AAACAACCTTTCTGCTGCTCATCCACC
SRSF2	1	S	CACCGGGACTCACACCACAGCCGCC
		AS	AAACGGCGGCTGTGGTGTGAGTCCC
TET2	3	S	CACCGCAGGACTCACACGACTATTC
		AS	AAACGAATAGTCGTGTGAGTCCTGC

Abreviatura(s): S, sense; AS, antisense.

4.1.3 Construções plasmidiais

Os vetores pCW-Cas9 (Addgene), eSpCas9(1.1) (Addgene), pSpCas9(BB)-2A-GFP (PX458) (Addgene), pGL4.22[luc2CP/Puro] (Promega) e pRetroX-IRES-DsRedExpress (Clontech) foram adquiridos comercialmente e utilizados nas estratégias de clonagem a seguir. O vetor lentiviral pCW-Cas9 codifica a proteína Cas9 sob regulação de promotor responsivo à tetraciclina (promotor TRE), além de gene de resistência à puomicina. O gene Cas9 foi retirado do seu vetor original por restrição enzimática com *NheI*-HF e *FseI* (New England BioLabs), e o produto de digestão de aproximadamente 7,7 Kb foi recuperado por purificação de fragmento em gel de agarose 0,8% (p/v) utilizando o kit comercial *QIAquick Gel Extraction* (Qiagen). Um fragmento de 4,2 Kb referente ao gene eCas9 (*enhanced Cas9*) foi obtido por meio de digestão enzimática do plasmídeo eSpCas9(1.1) com *FseI* e *AgeI*-HF (New England BioLabs), e posteriormente, clonado no *backbone* de pCW-Cas9, agora nomeado pCW-eCas9. Além do gene Cas9, o gene de resistência à puomicina

também foi extraído do seu vetor original (pCW-eCas9) e substituído pelo fragmento gênico T2A-EGFP, obtido a partir do plasmídeo PX458, garantindo assim a transcrição conjunta de eCas9 e proteína verde fluorescente (EGFP). Esse plasmídeo resultante foi nomeado de pCW-eCas9-EGFP (~ 12 Kb) e permite a expressão indutível de eCas9 quando as células são tratadas com antibiótico da família das tetraciclinas, além da expressão do gene repórter EGFP, regulado pelo mesmo promotor.

Os gRNA utilizados neste estudo foram clonados no plasmídeo pGL4.22-dsRED-gRNA. Para confecção deste plasmídeo, o gene de resistência à puromicina foi retirado do pGL4.22[luc2CP/Puro] por digestão com as enzimas *BamHI* e *Sall* (New England BioLabs), e substituído pelo ds-RED, obtido do plasmídeo pRetroX-IRES-DsRedExpress, previamente digerido com *KpnI* (New England BioLabs). Por fim, o gene codificante para luciferase (luc2CP) foi também excisado do plasmídeo original (pGL4.22[luc2CP/Puro]), resultando no plasmídeo pGL4.22-dsRED-gRNA (~ 4,4 Kb).

Os oligonucleotídeos obtidos para a síntese dos gRNA (gRNA_DNMT3A, _SF3B1, _SRSF2 e _TET2) foram submetidos ao protocolo de hibridização. As reações foram preparadas em um volume final de 50 μ L, contendo, NEB Buffer [10X] (New England BioLabs), 100 μ M de cada oligonucleotídeo fita-simples (S + AS) e água ultrapura. A solução final foi submetida a diminuição gradativa de temperatura (95°C - 25°C) em termociclador, com queda de 10°C a cada minuto. O produto de reação foi clonado no plasmídeo pGL4.22-dsRED-gRNA previamente digerido com a enzima *BsmBI* (New England BioLabs).

Os ensaios de ligação entre fragmentos de DNA foram realizados com tampão T4 DNA ligase [10X], 400 U de DNA ligase, 100 ng de DNA [vetor (1) : inserto (3)] e água ultrapura, q.s.p 20 μ L. Os quimeras moleculares obtidos foram utilizados em protocolo de transformação bacteriana, homogeneizando 0,5 μ L do produto de ligação com 20 μ L de células competentes *E. coli* XL Gold ou Blue (Stratagene). As células foram incubadas a 4°C por 30 minutos, e logo em seguida, transferidas a banho seco a 42°C por 45 segundos. Após, foram retornadas a 4°C por 2 minutos, então solubilizadas em meio líquido SOC (Thermo Fisher Scientific) e mantidas em agitação contínua a 37°C por 1 hora. Cerca de 100 μ L da solução bacteriana foi plaqueada em meio sólido LB agar devidamente suplementado com ampicilina. As placas

bacterianas foram então mantidas *overnight* em estufa climatizada a 37°C. As colônias obtidas foram transferidas para 5 mL de meio líquido LB localizado em tubo Falcon 15 mL e mantidas em agitação contínua a 37°C *overnight*. As bactérias foram centrifugadas a 4000 rpm por 5 minutos e o *pellet* celular direcionado para a extração de DNA plasmidial em pequena escala com o kit QIAprep Spin Mini (Qiagen). Posteriormente, após a seleção da(s) colônia(s) positivas para a clonagem de interesse, as bactérias foram inoculadas em 1L de meio líquido LB e mantidas nas mesmas condições de crescimento anteriores. Após a obtenção do *pellet* bacteriano, as células foram submetidas a extração de DNA plasmidial em larga escala utilizando o kit comercial MaxiPrep (Qiagen). Os protocolos de mini e maxiprep utilizados foram os recomendados pelo fabricante.

4.1.4 Transfecção e transdução celulares

Ensaio de transdução celular foram executados com partículas lentivirais produzidas a partir do plasmídeo pCW-eCas9-EGFP. A produção das partículas virais foi realizada em um dos laboratórios de suporte técnico localizado nas instalações do *Columbia University Medical Center* (CUMC). Resumidamente, células empacotadoras HEK 293T foram transfectadas com plasmídeos estruturais para partícula lentiviral, além do vetor de interesse (pCW-eCas9-EGFP). O sobrenadante celular foi descartado 24h após a transfecção, substituído por meio fresco, e recolhido 24h após este procedimento. O material obtido foi filtrado em membrana 0,22 µm. O título viral foi determinado através da transdução de células HEK 293T utilizando diferentes volumes do sobrenadante com partículas virais e posterior avaliação da expressão de GFP por citometria de fluxo. Todas as partículas virais utilizadas nos experimentos deste estudo apresentavam título viral superior a 2×10^8 TU/mL.

Em nosso laboratório, células K562 e HEK 293T foram transduzidas com os vetores lentivirais pCW-eCas9-EGFP para geração de linhagens estáveis para eCas9. A expressão de eCas9 foi induzida pela adição de doxiciclina (DOXI), antibiótico do grupo das tetraciclinas, no meio de cultura. Para a célula HEK 293T, 5×10^5 células foram plaqueadas em placa de seis poços e mantidas em cultura por 24h. No dia seguinte, o sobrenadante foi substituído por meio fresco contendo $4,8 \times 10^6$ TU

(partículas virais), brometo de hexadimetrina (Polybrene; 4 µg/mL) e DOXI (150 µM). As placas foram centrifugadas a 2000 rpm por 90 minutos e incubadas por 48h. Células K562 (5×10^5) foram semeadas em placas de seis poços previamente tratadas com fibronectina 1X. O meio de cultura foi suplementado com $4,8 \times 10^6$ TU, brometo de hexadimetrina (Polybrene; 4 µg/mL) e DOXI (150 µM), centrifugadas sob as mesmas condições da HEK 293T e mantidas em incubadora por 48h.

Os ensaios de transfecção foram realizados com as células eCas9+ utilizando o plasmídeo pGL4.22-dsRED-gRNA carreando o gRNA de interesse (gDNMT3A, gTET2, gSF3B1 ou gSRSF2). Células HEK 293T foram transfectadas com Lipofectamina 3000 (Thermo Fisher Scientific) segundo as orientações do fabricante. Cerca de 5×10^5 células foram plaqueadas por poço em placa de seis poços e mantidas em cultura por 24h. No dia seguinte, uma solução contendo 125 µL de meio Opti-MEM (Thermo Fisher Scientific) e 7,5 µL de reagente lipofectamina 3000, foi preparada e incubada por 5 minutos. Em paralelo, uma segunda solução contendo 125 µL de meio Opti-MEM, 2 µg do plasmídeo pGL4.22-dsRED-gRNA e reagente P3000 (2 µL/µg de DNA), também foi preparada e incubada por 5 minutos. Após, ambas as soluções foram misturadas, vortexadas e incubadas por 30 minutos. A solução final foi adicionada sobre as células e então incubadas por 48h. As células K562 foram transfectadas com auxílio do sistema de eletroporação Neon (Thermo Fisher Scientific). Cerca de 10^6 células foram lavadas com tampão fosfato-salino (PBS) 1X livre de Mg^{2+} e Ca^{2+} e ressuspensas em 100 µL do tampão R e 5 µg do plasmídeo com o gRNA de interesse. Para as condições *knock-in*, 100 µM do oligonucleotídeo fita-simples (ssODN) (Tabela 3) contendo a mutação de interesse também foi adicionado à célula para eletroporação. A célula K562 foi eletroporada nas seguintes condições: 3 pulsos a 10 ms e 1450 V. A seguir, foi adicionado meio IMDM devidamente suplementado e as células foram semeadas em placa de 6 poços e cultivadas por 48h. A verificação do sucesso de transdução e transfecção foi feita, em um primeiro momento, pela análise da expressão dos genes repórteres (EGFP e dsRED) em microscópio invertido de fluorescência Nikon Ti Eclipse (Nikon).

Tabela 3 – Oligonucleotídeos fita-simples (ssOND) utilizados para a geração de modelos *knock-in*.

Gene alvo	Mutação		Sequência (5' → 3')
	RNA	Proteína	
<i>DNMT3A</i>	c.2645G>A	R882H	GCAGCCTGGTCTGGCCAGCACTCACCCCTGCCCTCT CTGCCTTTTCTCCCCAGGGTATTTGGTTTCCCAGT CCACTATACTGACGTCTCCAACATGAGCC[G]CTTGG CGAGGCAGAGACTGCTGGGCCGGTTCATGGAGCGTG CCAGTCATCCGCCACCTCTTCGCTCCGCTGAAGGAG TATTTTGCCTGTGTGTAAGGGACA
<i>SF3B1</i>	c.2098A>G	K700E	ATATATTGAGAGAATCTGGATGATATTGTGTA ACTTA GGTAATGTTGGGGCATAGTTAAAACCTGTGTTTGGT TTTGTAGGTCTTGTGGATGAGCAGCAG[A]AAGTTCG GACCATCAGTGCTTTGGCCATTGCTGCCTTGGCTGA AGCAGCAACTCCTTATGGTATCGAATCTTTTGATTCT GTGTTAAAGCCTTTATGGAA
<i>SRSF2</i>	c.284C>A	P95H	CTGCCTGAGAGGCGCGGCGTCGCACCGCCCAGAGC TGAGGAAGCCGGCGCCAGTTCGCGGGGCTCCGGGC CGCCACTCAGAGCTATGAGCTACGGCCGCC[C]CCCT CCCGATGTGGAGGGTATGACCTCCCTCAAGGTGGAC AACCTGACCTACCGCACCTCGCCCGACACGCTGAGG CGCGTCTTCGAGAAGTACGGGCGCG

4.1.5 Citometria de fluxo

A eficiência de transfecção e transdução foi mensurada por citometria de fluxo através do equipamento BD Fortessa (BD Biosciences) cerca de 48h após os ensaios de transferência gênica. As células foram centrifugadas a 1500 rpm por 5 minutos e então ressuspensas em PBS 1X. O material foi submetido ao citômetro para avaliação da expressão dos genes repórteres utilizados nas estratégias de transdução (EGFP) e transfecção (dsRED). Células K562 e HEK 293T não transduzidas e/ou transfectadas foram utilizadas como respectivos controles para configuração do equipamento. Quando necessário, as células positivas para o(s) marcador(es) de interesse foram recuperadas por *sorting*, nesse momento operadas na plataforma BD FACS Aria Cell Sorter (BD Biosciences). O material recuperado foi adicionado em meio

de cultura devidamente suplementado com SFB e antibióticos e mantido em cultivo para a expansão clonal da população de interesse.

4.1.6 Sequenciamento de DNA

O sequenciamento direto de DNA foi utilizado para confirmação do sucesso da clonagem de DNA e para a análise dos genes-alvos editados pelo sistema CRISPR/Cas9. Em um primeiro momento, 1 μg do plasmídeo pGL4.22-dsRED-gRNA foi misturado a 5 μM do oligonucleotídeo iniciador universal U6 (5'-GGGCAGGAAGAGGGCCTA-3') e água ultrapura q.s.p. 10 μL . Esse material foi fornecido ao laboratório de suporte técnico do CUMC para o sequenciamento dos plasmídeos.

Para confirmação do sucesso de edição genética, o DNA do *pool* de células obtidas por *sorting* foi extraído com o kit *Blood & Cell Culture DNA Mini Kit* (Qiagen), seguindo as recomendações do fabricante, quantificados por método fluorimétrico com Qubit 3.0 (Thermo Fisher Scientific) e armazenados a 4°C. As amostras foram amplificadas utilizando 1X de EconoTaq PLUS GREEN Master Mix (Lucigen), 1 μM de cada oligonucleotídeo iniciador (Tabela 4), 100ng de DNA template e água ultrapura q.s.p. 25 μL de reação. Todas as reações foram realizadas sob as seguintes condições de ciclagem térmica: (I) 94°C por 5 minutos; (II) 35 ciclos a 94°C por 30 segundos, 55°C por 30 segundos, 72°C por 45 segundos; (III) 72°C por 10 minutos; e (IV) 4°C *overnight*. Ensaios de sequenciamento direto utilizando cDNA foram realizados para avaliar se o(s) alelo(s) mutado(s) estava(m) sendo efetivamente transcritos. O RNA foi extraído com o kit comercial *RNeasy Mini Handbook* (Qiagen), seguindo o protocolo fornecido pelo fabricante. O RNA total obtido foi submetido a síntese de DNA complementar (cDNA) utilizando transcriptase reversa SuperScript IV (Thermo Fisher Scientific). 2 μg de RNA total foram homogeneizados a 50 μM de Oligo d(T), 10 mM de dNTP (10 mM/cada) e água DEPC q.s.p. 13 μL de reação. A solução final foi incubada a 65°C por 5 minutos e então transferida para o gelo e incubada por 1 minuto. Posteriormente, foram adicionados na solução contendo o RNA, 1X de SSIV Buffer, 2 mM de DTT, 40 U de RNase OUT e 200 U de transcriptase reversa SuperScript IV. A solução final foi incubada a 50°C por 10 minutos, e após,

transferidas para banho seco a 80°C por 10 minutos para inativação enzimática. O material foi armazenado a -20°C. Para amplificação do cDNA, foram utilizados oligonucleotídeos específicos (Tabela 4) para as regiões de junção exon-exon, de forma a impedir a amplificação inespecífica de DNA genômico (gDNA). As condições de amplificação foram as mesmas mencionadas anteriormente. Os fragmentos de DNA amplificados foram purificados com o kit QIAquick PCR (Qiagen) e fornecidos ao laboratório de suporte técnico do CUMC, para o sequenciamento de DNA, juntamente com 5 µM dos oligonucleotídeos utilizados na PCR. Os eletroferogramas gerados foram analisados nos programas Chromas (Techelysium), para leitura das sequências, e a edição de DNA foi determinada por análise *in silico* no programa TIDE (<https://tide.nki.nl/>).

Tabela 4 – Oligonucleotídeos iniciadores utilizados para a confirmação da edição genética.

Gene alvo	Éxon	Template	Fragmento (pb)	Orientação	Sequência (5' → 3')
DNMT3A	23	gDNA	276	S	TGCACTTCGGGTGGCTGCTGG
				AS	ACCTCAGTTTGCCCCCATGTC
SF3B1	15	gDNA	384	S	TGAACATATTCTGCAGTTTGGCTGA
				AS	CCCAATAGCCTTCAAGAAAGCAGC
		cDNA	273	S	CAAGAAGTCCTGGCAAGCGAGAC
				AS	GCAGCCAAACCCTTTCCTCTGTG
SRSF2	1	gDNA	540	S	CCACGCGGAAGGCAACTGCCTG
				AS	CGCCGCGGACCTTTGTGAGGTC
TET2	3	gDNA	266	S	TGCCTGAGAGAGCTCATCCAG
				AS	GCTTACCCCGAAGTTACGTCT
		cDNA	482	S	GACGAGAACGAGGCTGGCAAAC
				AS	CCTCCATTTTGCAAACACTTGGAATACC

Abreviatura(s): gDNA, DNA genômico; cDNA, DNA complementar; S, sense; AS, antisense.

4.1.7 Diluição limitante

A obtenção de clones celulares com o mesmo *background* genético foi feita por diluição limitante realizada em placas de 96 poços. As células recuperadas por *sorting* e retornadas à cultura foram diluídas de forma a se obter a concentração de 10^4 células/mL. Desta solução final, 100 μ L (= 10^3 células) foram adicionadas nos poços

da primeira coluna da placa com auxílio de micropipeta multicanal. As células foram então diluídas em série, na proporção de 1:10 (v/v), nas colunas seguintes, de forma a obter uma célula por poço. Todos os clones obtidos a partir de uma única célula foram expandidos gradualmente, e então direcionados a extração e sequenciamento de DNA para caracterização genotípica de *DNMT3A*, *SF3B1*, *SRSF2* e *TET2*.

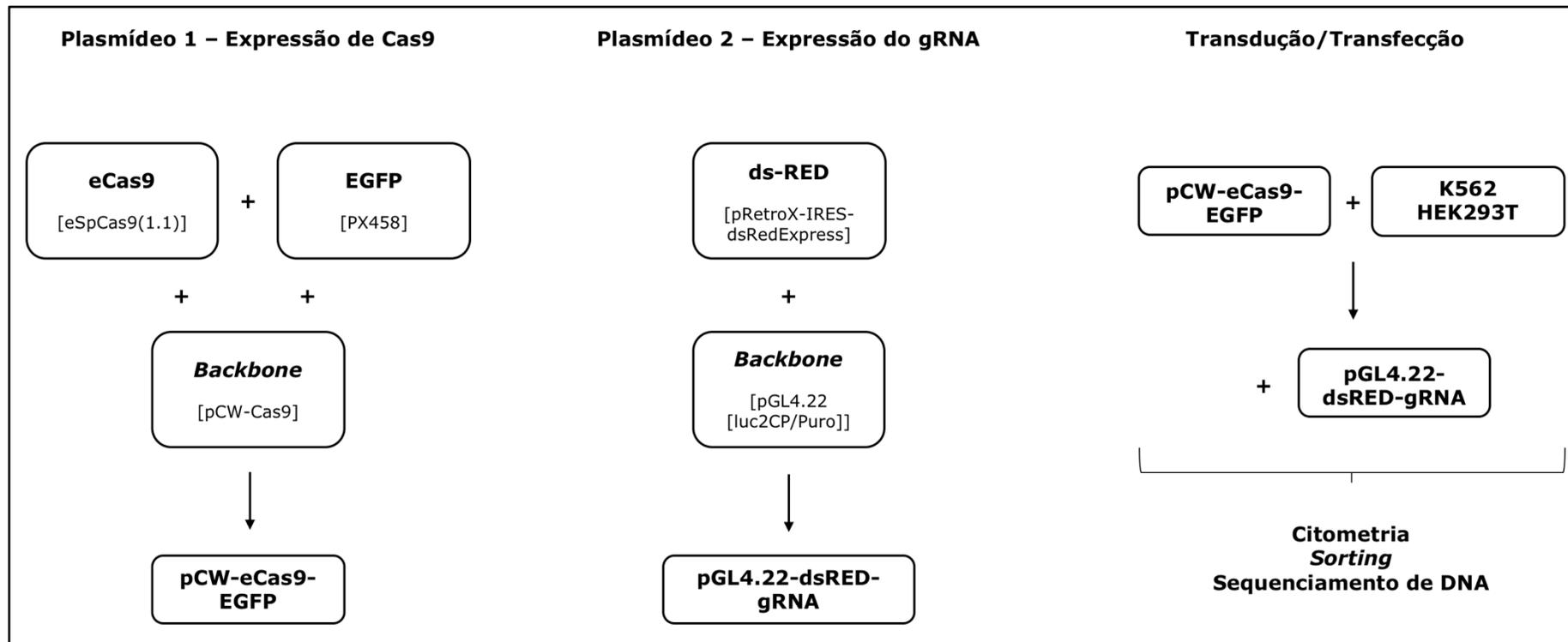


Figura 7 – Estratégias para edição gênica por CRISPR/Cas9, geração e caracterização de linhagens celulares para expressão indutível de eCas9.

4.2 Ensaios funcionais

Os clones K562 editados para os genes de interesse (*DNMT3A*, *SF3B1*, *SRSF2* e *TET2*) foram submetidos a ensaios de (I) proliferação e ciclo celular, (II) estresse genotóxico por radiação gama, (III) apoptose, (IV) análise morfológica, (V) competição clonal *in vitro*, *in vivo*, na presença de citocinas e em co-cultura com estroma medular, (VI) expressão de marcadores de superfície e (VII) expressão de citocinas humanas a níveis transcricionais e traducionais. Todos os experimentos foram realizados em triplicata utilizando mais de um clone para cada condição e tendo como controle as células WT para o(s) respectivo(s) gene(s) de análise.

4.2.1 Viabilidade celular

A viabilidade dos clones celulares gerados foi inferida pelo número de células viáveis detectadas por ensaio colorimétrico do tipo MTT através do kit comercial CellTiter 96 (Promega). As células foram semeadas em placas de 96 poços (10^4 células / 100 μ L de meio / poço) e mantidas em cultura por até 7 dias. A cinética de crescimento celular foi avaliada a cada 24 horas. Para a avaliação celular, 20 μ L da solução de coloração foi adicionada nos respectivos poços e mantidas a 37°C por 2 horas em incubadora. A placa foi lida em leitor de ELISA a 570 nm e a curva de crescimento celular foi elaborada mediante a seguinte fórmula: (absorbância amostral – absorbância de referência ou branco) / absorbância da condição no D0.

4.2.2 Ciclo celular

A análise de ciclo celular foi realizada através da quantificação de DNA por citometria de fluxo no equipamento BD Fortessa (BD Biosciences). Clones K562 SF3B1 WT (n=3), SF3B1 K700E (n=4) e clones duplo-mutados SF3B1^{WT/K700E}TET2^{+/-} (n=5) foram lavados com PBS 1X e centrifugados a 1500 rpm por 5 minutos para obtenção de *pellet* celular. Logo, as amostras foram fixadas com 1 mL de etanol 70% (v/v) frio. A solução etanólica foi adicionada gota a gota enquanto as amostras eram vortexadas de forma a evitar a aglutinação. As células foram incubadas por a 4°C por

30 minutos e então lavadas duas vezes com PBS 1X. Posteriormente, 100 µg de RNase A (BioRad), iodeto de propídeo (PI) [1X] e PBS [1X] q.s.p. 300 µL foram adicionadas as amostras e logo após encaminhadas ao citômetro.

4.2.3 Estresse genotóxico

A análise de estresse genotóxico por radiação gama (γ) foi realizado com clones K562 *SF3B1* WT (n=3) e K700E (n=4), e *SRSF2* WT (n=3) e P95H (n=3) foram irradiados a 1, 2, 4, 8 e 16 Gy no equipamento Gammacell 40 (Best Theratronics). Os respectivos clones celulares foram semeados em placa de 6 poços a 5×10^5 células/mL, irradiados nas condições mencionadas e cultivados por 4 dias. A avaliação de viabilidade celular foi aferida por ensaio de MTT.

4.2.4 Apoptose

A avaliação da morte celular por apoptose dos clones *SF3B1* WT (n=3), *SF3B1* K700E (n=4), *SRSF2* WT (n=3) e *SRSF2* P95H (n=3) foi realizada por marcação de anexina V e DNA, e posterior análise no citômetro de fluxo BD Fortessa (BD Biosciences). Aproximadamente, 5×10^5 células foram lavadas com 1 mL de PBS [1X], vortexadas e centrifugadas a 1500 rpm por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado e o processo de lavagem repetido nas mesmas condições. O *pellet* celular foi ressuspensão em 25 µL de PBS contendo 1X anti-Anexina V (Pacific Blue) (BioLegend) e 1X do intercalante de DNA 7-amino-actinomicina D (7-AAD) (BioLegend). As células foram incubadas em ausência de luz a temperatura ambiente por 20 minutos, lavadas com PBS 1X, vortexadas e centrifugadas a 1500 rpm por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* ressuspensão em 400 µL de PBS 1X. Logo após, as amostras foram analisadas no citômetro.

4.2.5 *Análise morfológica*

Células K562 SF3B1 WT (n=3) e K700E (n=3) foram examinadas morfológicamente para avaliação de estruturas de grânulos de ferro em torno do núcleo, denominados sideroblastos em anel. As células foram lavadas duas vezes com PBS 1X e então processadas em citocentrífuga Shandon (Shandon Scientific) de forma que, 5×10^4 células distribuídas em 50 μ L fossem submetidas a 800 rpm por 5 minutos. As lâminas foram retiradas cuidadosamente do equipamento e mantidas a temperatura ambiente sobre a bancada para secagem completa.

A avaliação de sideroblastos em anel foi realizada com protocolo de coloração do Azul de Prússia (ou Perls) para precipitação de ferro livre. O material das lâminas foi fixado com metanol 40% por 1 minuto, seguido de lavagem com água deionizada. As amostras foram então coradas com ferrocianeto de potássio 5% e ácido clorídrico 10% por 1 hora, e contracoradas com safranina 0,05%. As lâminas foram lavadas com água deionizada e analisadas em microscópio óptico.

4.2.6 *Competição clonal*

Os ensaios de competição clonal entre clones K562 SF3B1 WT (n=3) e K700E (n=3) foram realizados para determinação da dominância clonal entre as células selvagens e mutantes para o gene *SF3B1*. Todos os clones foram transduzidos com partículas lentivirais obtidas a partir dos plasmídeos pHIV-EGFP e pHIV-dTomato, carreando genes repórteres para expressão de proteínas fluorescentes verde e vermelha, respectivamente. Ambos plasmídeos foram obtidos comercialmente (Addgene) e submetidos a produção viral no laboratório de suporte técnico do CUMC, seguindo as mesmas condições de síntese viral e protocolo de transdução anteriormente mencionados.

4.2.6.1 *Ensaio in vitro*

Três clones de cada condição (WT e K700E) expressando genes repórteres EGFP ou dTomato foram semeados em placa de 6 poços (5×10^3 células WT e 5×10^3 células *SF3B1* K700E; 1:1) e co-cultivados por até 14 dias. Os ensaios de competição clonal *in vitro* foram realizados em três condições distintas: (I) apenas com células

K562 SF3B1 WT e K700E, (II) na presença das citocinas humanas recombinantes IL-1 α e/ou IL-8 e (III) em co-cultivo com células de estroma obtido de medula óssea de indivíduos saudáveis e pacientes com SMD.

Para os ensaios envolvendo a adição direta das citocinas hrIL-1 α (Thermo Fisher Scientific) e/ou hrIL-8 (Thermo Fisher Scientific), foi realizada a co-cultura entre os diferentes clones WT e mutados, seguida da adição de 1 ng/mL de cada citocina, ou de ambas, a cada 24h ou 72h de cultura durante 14 dias.

Para as condições envolvendo co-cultivo com células estromais obtidas de MO humana, foram recolhidas amostras de MO de dois pacientes com SMD e células estromais de um indivíduo saudável obtidas comercialmente do *New York Blood Center* (Nova York, EUA). As espécimes dos pacientes, ambos acompanhados pela Dr. Azra Raza do Centro de SMD do CUMC, foram encaminhadas ao laboratório e foram utilizadas mediante a assinatura de termo de consentimento devidamente registrado no Comitê de Ética do CUMC (No. #AAAL5907). Pequenos fragmentos de origem ósseo-cartilaginosa foram obtidos dos pacientes com SMD durante a coleta de material para biópsia de MO, e processados para enriquecimento das células estromais. O material foi fragmentado com auxílio de bisturi e homogeneizado em 5 mL de PBS 1X. A amostra foi centrifugada a 1500 rpm por 5 minutos para obtenção do *pellet* celular e as células obtidas foram cultivadas em meio seletivo MEM Alpha 1X (Cellgro) suplementado com 20% de soro fetal bovino (SFB) e antibióticos [penicilina/streptomomicina 10 U/mL]. Células estromais de doadores saudáveis foram descongeladas seguindo protocolo padrão, e cultivadas em meio MEM Alpha 1X (Cellgro), devidamente suplementado nas mesmas condições. Após atingirem confluência superior ou igual a 80%, as células flutuantes foram descartadas, e as aderidas, digeridas com Tripsina-EDTA 0,25% (Gibco) e mantidas em cultura até a quinta passagem. Para o ensaio de competição clonal, 5×10^4 células estromais foram semeadas em placas de 6 poços na véspera da realização do ensaio. No dia seguinte, foram adicionadas as células K562 SF3B1 WT e K700E, de acordo com as condições já mencionadas, e cultivadas em meio MEM Alpha 1X devidamente suplementado.

Para todas as condições do ensaio de competição clonal, a proporção entre os clones mutantes e selvagens foi determinada através da razão entre células verdes e

vermelhas, detectadas por citometria de fluxo na plataforma BD Fortessa (BD Biosciences).

4.2.6.2 Ensaios *in vivo*

Os ensaios de competição clonal *in vivo* foram realizados em camundongos imunodeficientes NOD.Cg-Prkdc^{scid}//2rg^{tm1Wjl}/SzJ (NSG) (The Jackson Laboratory) fêmeas com 7 semanas (n = 5). O uso de animais de experimentação neste estudo foi aprovado pelo Comitê Institucional para Uso e Cuidados com Animais do CUMC (No. # AG032959). Aproximadamente, 2x10⁶ células (10⁶ SF3B1 WT (n=3) e 10⁶ SF3B1 K700E (n=3); 1:1) foram lavadas duas vezes e mantidas em suspensão em 50 µL de PBS 1X sob gelo. O mesmo volume de Matrigel Matrix High Concentration (Corning) foi adicionado às células (1:1) e homogeneizado repetidamente com auxílio de micropipeta. A solução final foi coletada com seringa de insulina 29G e injetada subcutaneamente nos dorsos esquerdo e direito de cada animal. Os animais foram monitorados semanalmente e os tumores extraídos cirurgicamente 30 dias após a injeção. A massa tumoral foi lavada em tampão HBSS 1X, dissociada com auxílio de bisturi cirúrgico e, posteriormente, digerida com 200 U/mL de colagenase tipo I (Gibco), suplementada com 3 mM de CaCl₂. O material foi incubado a 37°C por 6 horas e transpassado em filtro de 40 µm. O material final foi avaliado por citometria de fluxo para quantificação de células EGFP e dTomato positivas no equipamento BD Fortessa (BD Biosciences).

4.2.7 Expressão de marcadores de superfície

A avaliação da diferenciação eritropoética *in vitro* foi realizada em células K562 SF3B1 WT (n=3), SF3B1 K700E (n=3) e SF3B1^{WT/K700E}TET2^{+/-} (n=5). As células foram lavadas com PBS 1X e centrifugadas a 1500 rpm por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado e ao *pellet* celular foi adicionado 1 µL de anti-GPA monoclonal humano (PE) (BD Biosciences), 1 µL de anti-CD71 monoclonal humano (FITC) (ABCAM) e 25 µL de PBS (1X). As células foram incubadas por 20 minutos em ausência de luz. Após

a incubação, as células foram lavadas com PBS 1X, ressuspensas em 300 μ L da mesma solução e por fim encaminhadas ao citômetro.

4.2.8 Expressão de citocinas

4.2.8.1 Expressão proteica

A quantificação das citocinas humanas IL-1 α , IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-6, IL-8, IFN- γ e TNF α foi realizada na plataforma Luminex (Merck) utilizando amostras de sobrenadante celular de clones K562 SF3B1 WT (n=3) e K700E (n=3). O kit comercial HCYTOMAG-60K (Millipore) foi customizado para a análise das citocinas de interesse. As amostras de sobrenadante fresco foram submetidos ao laboratório de suporte técnico do CUMC para realização do ensaio. A confirmação da expressão da citocina IL-8 foi realizada por ensaio imunoenzimático de ELISA para os mesmos clones K562 SF3B1 e clones SRSF2 WT (n=3) e P95H (n=3). Placas e reagentes para o ensaio foram adquiridos comercialmente (Thermo Fisher Scientific) e os protocolos experimentais foram executados de acordo com as orientações do fabricante. 100 μ L das amostras e respectivos controles foram adicionados nas placas de 96 poços e mantidos em incubação a temperatura ambiente por 2 horas. Após, as amostras foram descartadas por inversão e as placas lavadas quatro vezes com tampão de lavagem. O anticorpo de detecção foi adicionado (100 μ L) e mantido em incubação por 1 hora. O descarte do volume e lavagem das placas foram realizados como já descrito anteriormente. O mesmo procedimento de adição, descarte e lavagem foram executados com a enzima peroxidase (HRP), substrato cromogênico e solução de parada, respectivamente. Por fim, a placa de ELISA foi lida em espectrofotômetro AgileReader (Thomas Scientific) a 450 nm. A quantificação das citocinas por Luminex e ELISA foi determinada por quantificação absoluta mediante a construção de curva padrão.

4.2.8.2 Expressão de transcritos

Os níveis de transcritos de IL-8 foram avaliados por quantificação relativa em PCR em tempo real (qRT-PCR) por sistema TaqMan (Thermo Fisher Scientific), tendo como gene constitutivo ACTB. Neste experimento foram utilizadas amostras de cDNA obtidas de clones WT (n=2) e mutantes para os genes do spliceossoma (*SF3B1* (n=2), *SRSF2* (n=2) e *U2AF1* (n=2)). Oligos e sondas utilizados foram adquiridos comercialmente (Cat. No. 4331182; Thermo Fisher Scientific). A reação de amplificação foi elaborada com 1X *TaqMan Gene Expression Assay* (oligos e sonda), 1X *Taqman Gene Expression Master Mix*, 25 ng de cDNA template e água ultra-pur q.s.p. 20 µL de reação. Todas as amostras foram analisadas em triplicatas e submetidas ao programa padrão de amplificação (50°C por 2 minutos; 95°C por 10 minutos; 40 ciclos a 95°C por 15 segundos e 60°C por 60 segundos) no equipamento QuantStudio 5 Real-Time PCR System (Thermo Fisher Scientific). A quantificação relativa dos transcritos foi determinada através método $2^{-\Delta\Delta Ct}$.

4.3 Análises estatísticas

Todas as análises estatísticas neste estudo foram realizadas no programa estatístico Prism 7.0 (GraphPad). Os testes não-paramétricos, teste de Mann-Whitney e teste de Kruskal-Wallis, foram empregados para todos os conjuntos de dados, sendo considerado estatisticamente significativo quando $p < 0,05$. Teste Mann-Whitney foi utilizado para comparar três ou mais grupos, ao passo que, o teste de Kruskal-Wallis, para comparar dois grupos distintos.

5. RESULTADOS

5.1 Células K562 podem ser utilizadas para a modelagem das mutações em genes das neoplasias mieloides

Atualmente, há diferentes plasmídeos de expressão para a endonuclease Cas9 disponíveis comercialmente, alguns, inclusive, estruturados para a produção de partículas retro e lentivirais. Entretanto, nenhum destes correspondeu ao nosso interesse no presente estudo – o estabelecimento de uma linhagem celular com expressão indutível de eCas9 e gene repórter codificante para proteína fluorescente. Para este fim, nós otimizamos o plasmídeo lentiviral pCW-Cas9, de forma que ele pudesse expressar eCas9, proteína com especificidade elevada e efeito *off-targets* diminuídos, quando comparada à sua versão selvagem (SLAYMAKER et al., 2016), junto da proteína EGFP; ambos regulados por promotor gênico responsivo a tetraciclina (Figura 8). Durante todas as etapas da estratégia de clonagem, os produtos de digestão e ligação de DNA foram confirmados por eletroforese e sequenciamento de DNA. O plasmídeo final pCW-eCas9-EGFP não previu, intencionalmente, a clonagem dos gRNA. Uma construção desse tipo permitiu que uma mesma célula pudesse ser utilizada como matriz para o desenvolvimento de diferentes modelos mutacionais, independente do sítio de edição. Dessa forma, os gRNA para *DNMT3A*, *TET2*, *SF3B1* e *SRSF2* foram clonados no vetor pGL4.22-dsRED-gRNA, que expressa um segundo repórter fluorescente, o dsRED (Figura 9).

A avaliação da concentração ótima de DOXI foi estimada através da transdução das células HEK 293T com o vetor lentiviral obtido a partir do plasmídeo pCW-eCas9-EGFP. As células transduzidas foram acrescidas ao meio de cultura em ausência ou presença do antibiótico, adicionado em diferentes concentrações (50, 150 e 300 μ M). A avaliação da população GFP+ foi realizada por microscopia de fluorescência 24h, 48h e 72h após a transdução. O percentual de células GFP+ foi maior em células cultivadas por 48h na presença de DOXI em relação ao controle e demais tempos de análise, logo, essas células mantidas em cultura por 48h após a transdução foram avaliadas por citometria de fluxo.

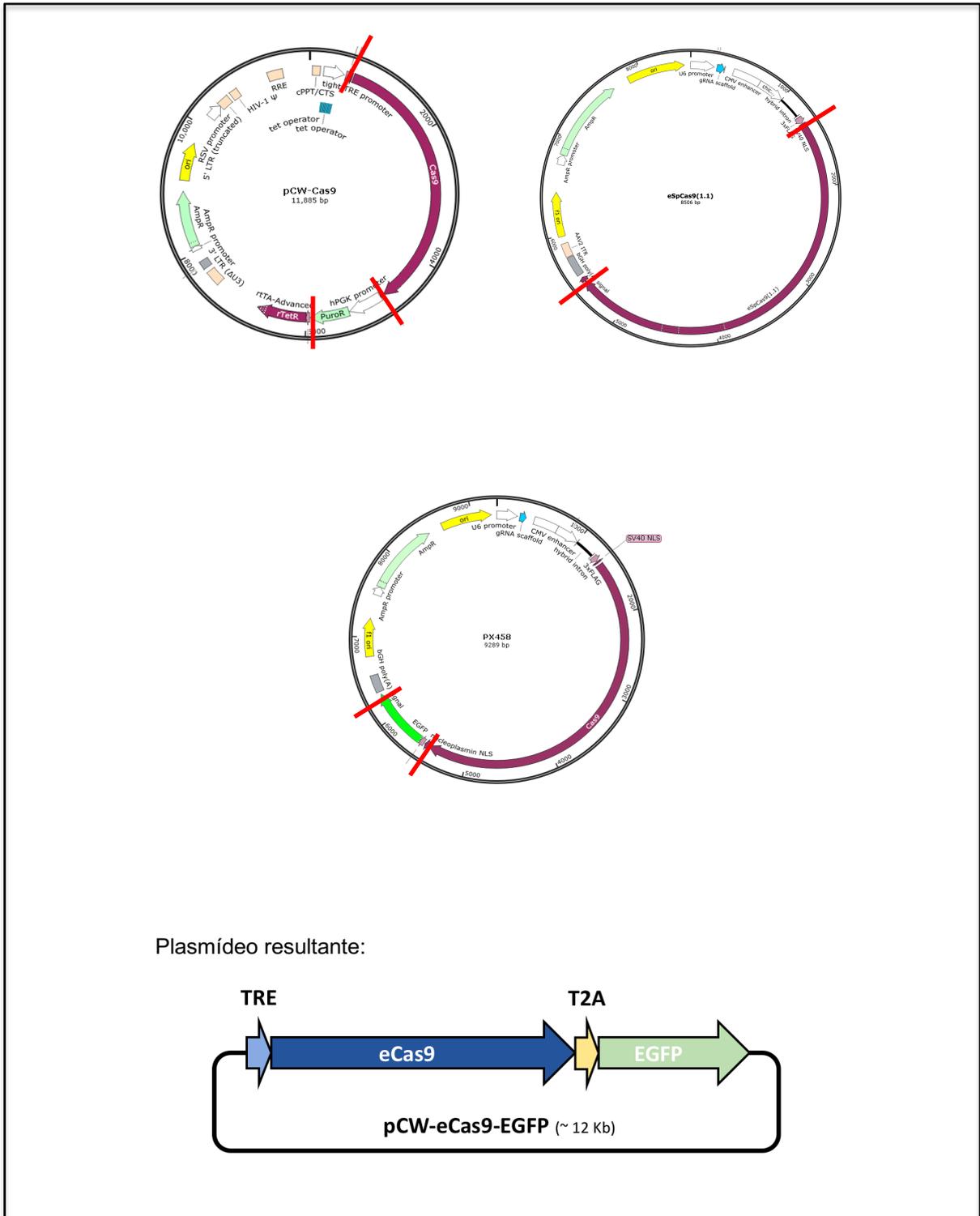


Figura 8 – Esquemas de clonagem molecular para geração do plasmídeo pCW-eCas9-EGFP. Plasmídeos comerciais utilizados para a construção do plasmídeo lentiviral utilizado na transdução de eCas9 e EGFP.

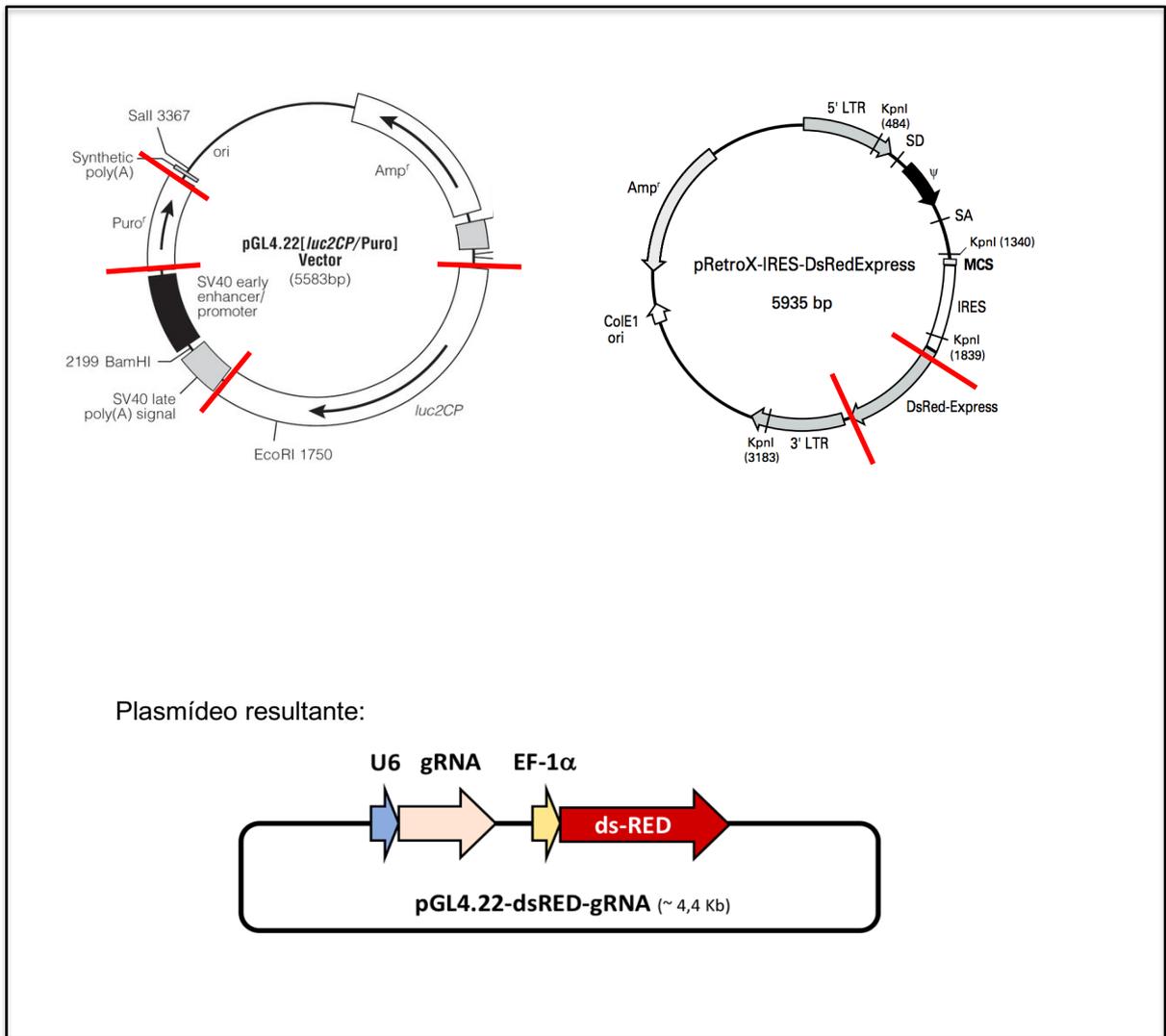


Figura 9 – Esquemas de clonagem molecular para geração do plasmídeo pGL4.22-dsRED-gRNA. Plasmídeos comerciais utilizados para a construção do plasmídeo utilizado na transfecção dos gRNA e ds_RED.

Cerca de 40% das células na condição com 150 μ M de DOXI eram GFP+, ao passo que, as condições com 50 e 300 μ M do antibiótico apresentavam 26% e 32,5% de positividade, respectivamente (Figura 10). Sendo assim, todos os ensaios de transdução e transfecção subsequentes foram realizados na concentração de 150 μ M de DOXI e recuperação das células por *sorting* 48h após a transferência gênica.

A linhagem celular K562 também foi transduzida com o vetor lentiviral pCW-eCas9-EGFP e a recuperação de células GFP⁺ foi realizada sob as mesmas condições anteriormente mencionadas. Após a obtenção das populações GFP⁺ de ambas as linhagens, a partir de agora nomeadas como eCas9⁺, as células foram retornadas para a expansão *in vitro* e logo utilizadas para os ensaios de transfecção com o plasmídeo pGL4.22-dsRED-gRNA carreando os gRNA para os respectivos genes de interesse. Células K562 eCas9⁺ foram transfectadas com o plasmídeo carreando gRNA para a edição dos genes *DNMT3A*, *SF3B1*, *SRSF2* e *TET2*, enquanto células HEK 293T eCas9⁺ foram transfectadas apenas com o plasmídeo para a edição de *SF3B1*. As transfecções efetuadas para *DNMT3A*, *SF3B1* e *SRSF2* foram realizadas juntamente com ssODN específico, caracterizados pela presença de alteração nucleotídica de interesse para o desenvolvimento de modelos do tipo *knock-in*. As células eCas9⁺ ds-RED⁺, geradas após a transfecção (Figura 11) foram então sorteadas e mantidas em cultura para a expansão *in vitro*, e uma parte das células (0,5 – 10⁵ células, aproximadamente) foi submetida à extração de DNA. O material genético extraído foi utilizado como template para amplificação por PCR das regiões de interesse, e posterior análise por sequenciamento direto de DNA.

Os resultados de sequenciamento de DNA demonstraram o sucesso de edição dos respectivos genes alvos (Figura 12). As células sorteadas e mantidas em cultura foram então submetidas à diluição limitante em placa de 96 poços para a obtenção de clones com o mesmo *background* genético. Após 30 dias em cultura, aproximadamente, as células expandidas clonalmente foram então sequenciadas, e assim, confirmado o estado mutacional para os respectivos marcadores editados. A eficiência de edição foi estimada pela proporção entre clones mutados e o total de clones obtidos isoladamente. Nas células K562 foram observadas eficiências de edição de 33% (4/12) e 21% (3/14) para os genes *SF3B1* e *SRSF2*, respectivamente. *DNMT3A* e *TET2* apresentaram 60% (6/10) de eficiência. Em relação as células HEK 293T, foram obtidos 6 clones ao total, dentre os quais, 2 apresentavam a mutação K700E (33%). Ao total, foram isolados 36 clones distintos: 9 clones K562 editados para *DNMT3A*, 7 para *SF3B1*, 6 para *SRSF2*, 10 para *TET2* e 4 HEK 293T para *SF3B1*. As características de todos os clones gerados podem ser encontradas na Tabela 5.

Além de avaliar a edição genética por meio de sequenciamento de DNA, também foi analisado se os clones expressavam o(s) alelo(s) editado(s). Para isso, foi realizado sequenciamento utilizando oligonucleotídeos específicos para os genes *SF3B1* e *TET2*, porém, tendo como molde o cDNA. Todos os clones gerados a partir de células K562 (*SF3B1* e *TET2*) apresentaram eletroferogramas com sequências compatíveis aos achados no DNA, ou seja, foi observada a expressão de alelos WT e/ou mutados, quando presentes. Em contrapartida, nenhum dos clones HEK 293T *SF3B1* com a mutação K700E (HEK 293T *SF3B1* C.10 e C.13) apresentaram a mutação a nível transcricional, e por essa razão, não foram mais utilizadas nos experimentos seguintes (Figura 13).

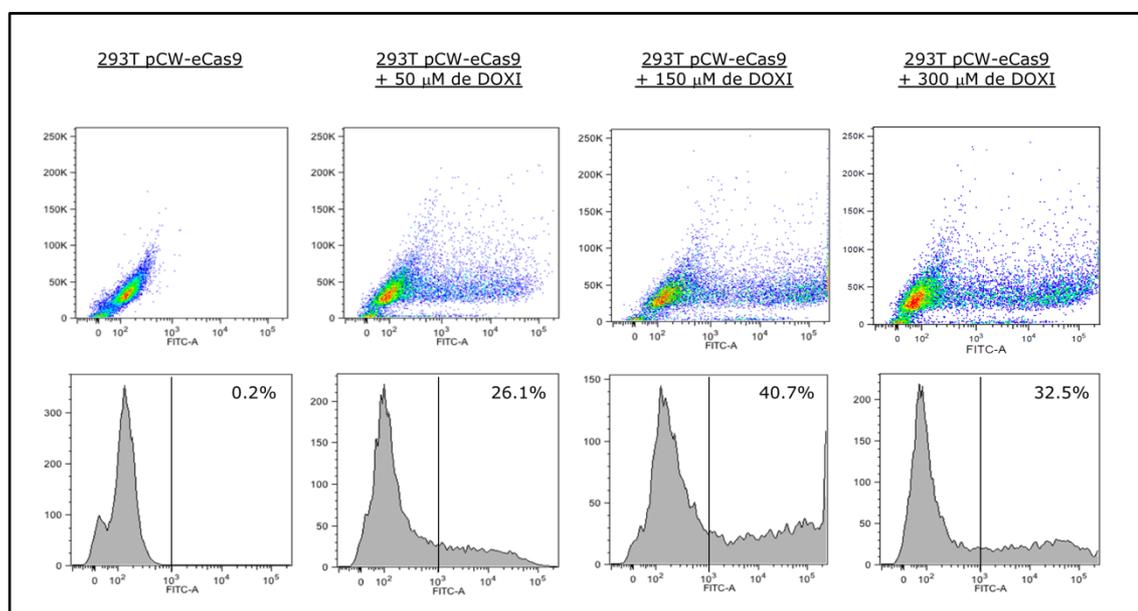


Figura 10 – Avaliação da expressão de GFP em células HEK 293T após 48h de transdução. Células HEK293T transduzidas com pCW-eCas9-EGFP na ausência ou presença de DOXI (50 – 300 μ M). Parte superior da figura: Dot- plot mostrando os parâmetros granularidade (SSC) vs fluorescência (FITC). Parte inferior da figura: Histograma com intensidade de fluorescência (X) vs número de eventos (Y).

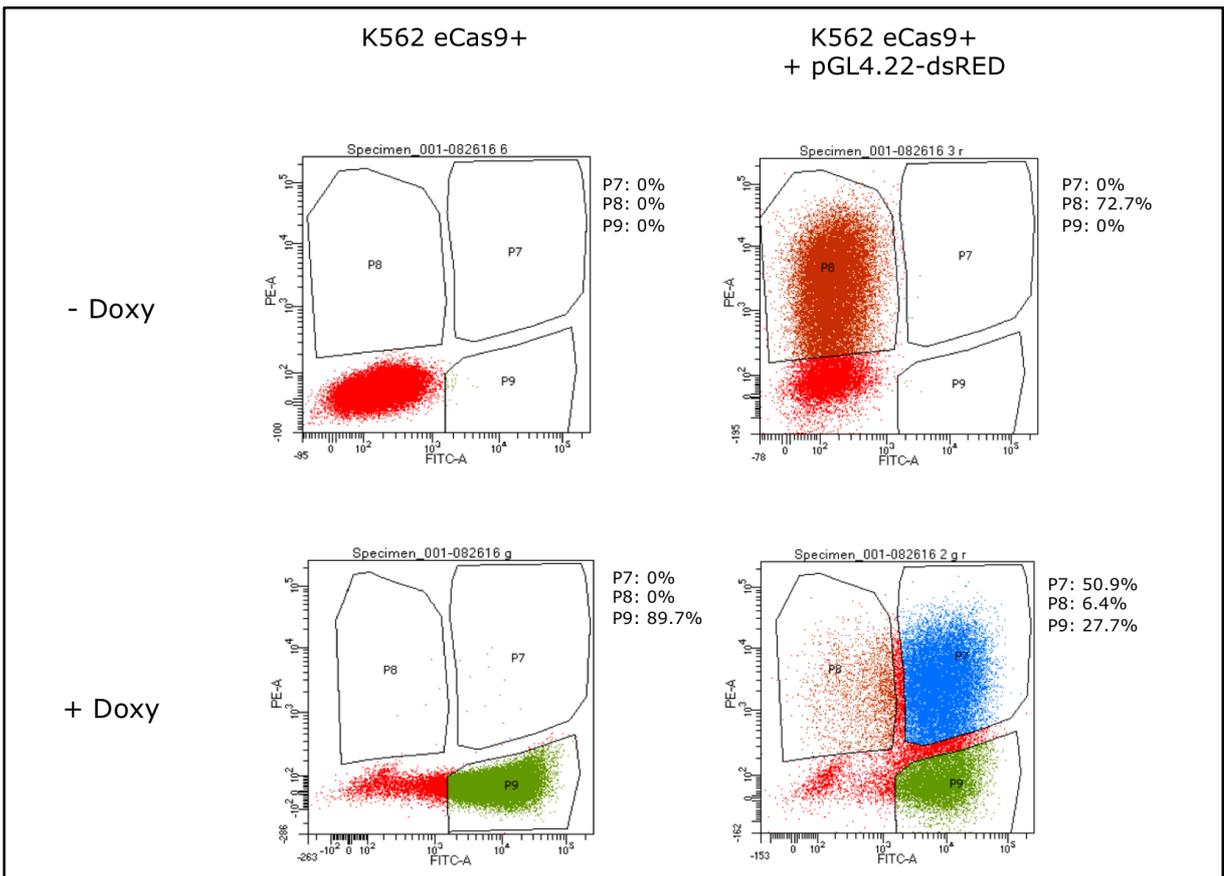


Figura 11 – Avaliação da transfecção de células K562 eCas9+ com pGL4.22-dsRED-gRNA. Os dot-plots na parte superior da figura mostram células K562 eCas9+ transfectadas ou não com o plasmídeo pGL4.22-dsRED-gRNA em ausência de DOXI. Na parte inferior, as mesmas condições foram avaliadas, porém em presença de DOXI. A presença do antibiótico leva a um *cluster* de eventos positivos FITC (verde), reflexo da expressão de GFP. Células K562 eCas9+ e pGL4.22-dsRED-gRNA+, em presença de DOXI apresentam eventos positivos para FITC e PE (vermelho), reflexo do sucesso de transfecção. A população duplo-positiva em azul (P7)(51%) foi sorteada e expandida *in vitro* para obtenção de clones geneticamente editados.

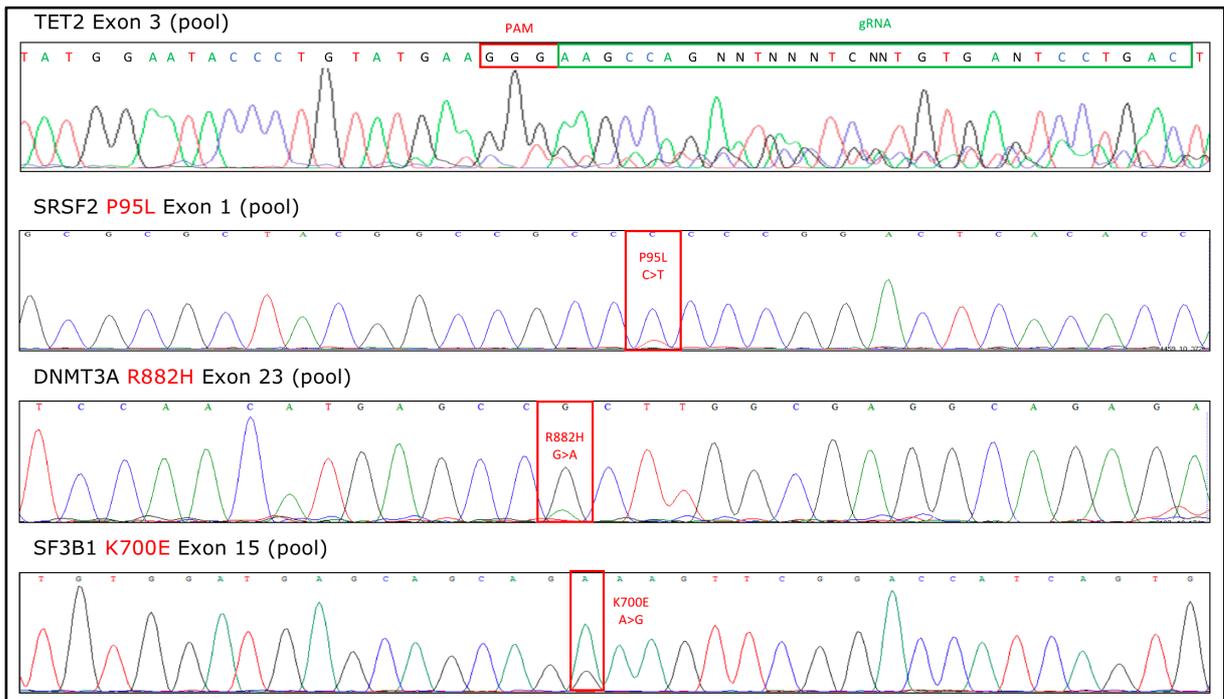


Figura 12 – Confirmação da edição genética. Mutações pontuais nos genes *DNMT3A*, *SF3B1* e *SRSF2* foram inseridas através de DNA template fita-simples (ssODN). O gene *TET2* apresenta alteração no *frame* de leitura, demonstrando o estabelecimento de um modelo *knock-out* para o gene.

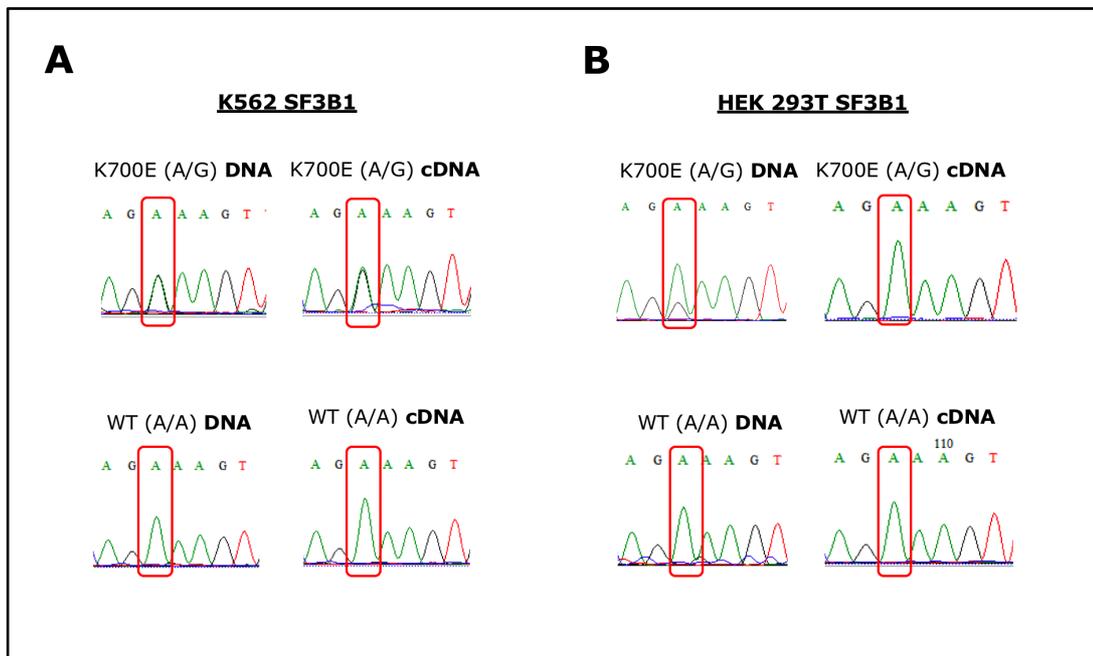


Figura 13 – Análise de transcritos *SF3B1* para confirmação da expressão de alelos editados. (A) Os clones gerados a partir da linhagem K562 expressam ambos os alelos, WT e K700E. (B) Clones HEK 293T expressam apenas o alelo WT do gene.

Tabela 5 – Clones celulares gerados com mutações em genes de regulação epigenética e do spliceossoma.

Linhagem	Gene	Éxon	Nome / No. do clone	Genótipo	Zigossidade	Mutação			Sequência (5' - 3')
						Tipo	Tamanho da deleção (nts)	Frame de leitura	
K562	DNMT3A	23	C.2	WT/ut	HT	deleção	39	<i>in frame</i>	TCTCT[GCCTTTTCTCCCCAGGGTATTTGGTTTCCCAGTCCA]ATACTGACGTCTCCAACATGAGCCGCTTGG
			C.9	WT/WT	HM	-	-	-	TCTCTGCTTTTCTCCCCAGGGTATTTGGTTTCCCAGTCCAATACTGACGTCTCCAACATGAGCCGCTTGG
			C.19	mut/mut	HM	deleção	7	<i>frameshift</i>	TCTCTGCTTTTCTCCCCAGGGTATTTGGTTTCCCAGTCCAATACTGACGTCTCCAACATGAGCCGCTTGG
			C.21	WT/mut	HT	deleção	26	<i>frameshift</i>	TCTCTGCTTTTCTCCCCAGGGTATTTGGTTTCCCAGTCCAATACTGACGTCTCCAACATGAGCCGCTTGG
			C.42	WT/mut	HT	deleção	33	<i>in frame</i>	TCTCTGCTTTTCTCCCCAGGGTATTTGGTTTCCCAGTCCAATACTGACGTCTCCAACATGAGCCGCTTGG
			C.47	mut/mut	HM	R882H	-	-	TCTCTGCTTTTCTCCCCAGGGTATTTGGTTTCCCAGTCCAATACTGACGTCTCCAACATGAGCCGCTTGG
			C.63	WT/WT	HM	-	-	-	TCTCTGCTTTTCTCCCCAGGGTATTTGGTTTCCCAGTCCAATACTGACGTCTCCAACATGAGCCGCTTGG
			C.68	WT/mut	HT	deleção	21	<i>in frame</i>	TCTCTGCTTTTCTCCCCAGGGTATTTGGTTTCCCAGTCCAATACTGACGTCTCCAACATGAGCCGCTTGG
			C.70	WT/WT	HM	-	-	-	TCTCTGCTTTTCTCCCCAGGGTATTTGGTTTCCCAGTCCAATACTGACGTCTCCAACATGAGCCGCTTGG
	SF3B1	15	W1	WT/WT	HM	-	-	-	AGCAGAAAGTT
			W2	WT/WT	HM	-	-	-	AGCAGAAAGTT
			W3	WT/WT	HM	-	-	-	AGCAGAAAGTT
			K1	WT/mut	HT	K700E	-	-	AGCAG[G]AAGTT
			K2	WT/mut	HT	K700E	-	-	AGCAG[G]AAGTT
			K3	WT/mut	HT	K700E	-	-	AGCAG[G]AAGTT
			K4	WT/mut	HT	K700E	-	-	AGCAG[G]AAGTT
	SRSF2	1	W19	WT/WT	HM	-	-	-	CCGCCCCCGG
			W33	WT/WT	HM	-	-	-	CCGCCCCCGG
			W42	WT/WT	HM	-	-	-	CCGCCCCCGG
			P15	WT/mut	HT	P95H	-	-	CCGCC[A]CCCGG
			P22	WT/mut	HT	P95H	-	-	CCGCC[A]CCCGG
			P38	WT/mut	HT	P95H	-	-	CCGCC[A]CCCGG
	TET2	3	C.2	WT/mut	HT	deleção	28	<i>frameshift</i>	CCCTG[TATGAAGGGAAGCCAGAATAGTCGTGTG]AGTCCTGA
			C.3	WT/mut	HT	deleção	5	<i>frameshift</i>	CCCTGTATGAAGGGAAGCCAG[AATAG]TCGTGTGAGTCCTGA
			C.7	WT/mut	HT	deleção	21	<i>in frame</i>	CCCTGTATGAAGGG[AAGCCAGAATAGTCGTGTGAG]TCCTGA
			C.18	WT/mut	HT	deleção	12	<i>in frame</i>	CCCTGTATGAAGGG[AAGCCAGAATAG]TCGTGTGAGTCCTGA
			C.33	WT/WT	HM	-	-	-	CCCTGTATGAAGGGAAGCCAGAATAGTCGTGTGAGTCCTGA
			C.35	WT/WT	HM	-	-	-	CCCTGTATGAAGGGAAGCCAGAATAGTCGTGTGAGTCCTGA
			C.40	WT/WT	HM	-	-	-	CCCTGTATGAAGGGAAGCCAGAATAGTCGTGTGAGTCCTGA
			C.41	WT/WT	HM	-	-	-	CCCTGTATGAAGGGAAGCCAGAATAGTCGTGTGAGTCCTGA
			C.44	WT/mut	HT	deleção	30	<i>in frame</i>	CCCTGT[ATGAAGGGAAGCCAGAATAGTCGTGTGAGT]CCTGA
	C.55	WT/mut	HT	deleção	28	<i>frameshift</i>	CCCTGTAT[GAAGGGAAGCCAGAATAGTCGTGTGAGT]CCTGA		
	HEK 293T	SF3B1	3	C.3	WT/WT	HM	-	-	-
C.5				WT/WT	HM	-	-	-	AGCAGAAAGTT
C.10				WT/mut	HT	K700E	-	-	AGCAG[G]AAGTT
C.13				WT/mut	HT	K700E	-	-	AGCAG[G]AAGTT

Abreviatura(s): WT, selvagem; mut, mutado; HM, homocigoto; HT heterocigoto; nts, nucleotídeos.

5.2 A mutação SF3B1 K700E confere perda do potencial proliferativo

Os clones celulares editados para os respectivos genes de interesse foram caracterizados funcionalmente por ensaio de MTT, para avaliação da proliferação celular, e ensaio de apoptose por citometria de fluxo através da marcação de anexina V e de DNA por 7-AAD. A habilidade proliferativa dessas células foi determinada pela comparação da cinética de crescimento entre os clones WT e mutados para um mesmo gene. Mutações nos genes *DNMT3A*, *SRSF2* e *TET2* não tiveram impacto na proliferação das células K562. Quando avaliado se o tipo de mutação em *TET2* teria efeito na proliferação dessas células, observou-se que o crescimento de clones portadores de mutações *in-frame* ou *frameshift* não foi diferente dos clones WT. Já os clones celulares portadores da mutação SF3B1 K700E apresentaram capacidade proliferativa diminuída quando comparados aos WT (Figura 14).

Os clones com mutações nos genes *SF3B1* e *SRSF2* e os clones WT foram submetidos à radiação gama e após 4 dias em cultura, analisados por MTT. O objetivo deste experimento foi avaliar o efeito do estresse genotóxico induzido por radiação na viabilidade dessas células. Nas doses de radiação testadas, observou-se uma queda na viabilidade de até 50%, tanto para as células K562 SRSF2 P95H quanto para as WT. Entretanto, quando analisados os clones portadores da mutação SF3B1 K700E observou-se que, nas maiores doses de radiação testadas, as células mutadas sobreviveram mais quando comparadas as células WT, ainda que esse resultado não tenha sido estatisticamente significativo (Figura 15).

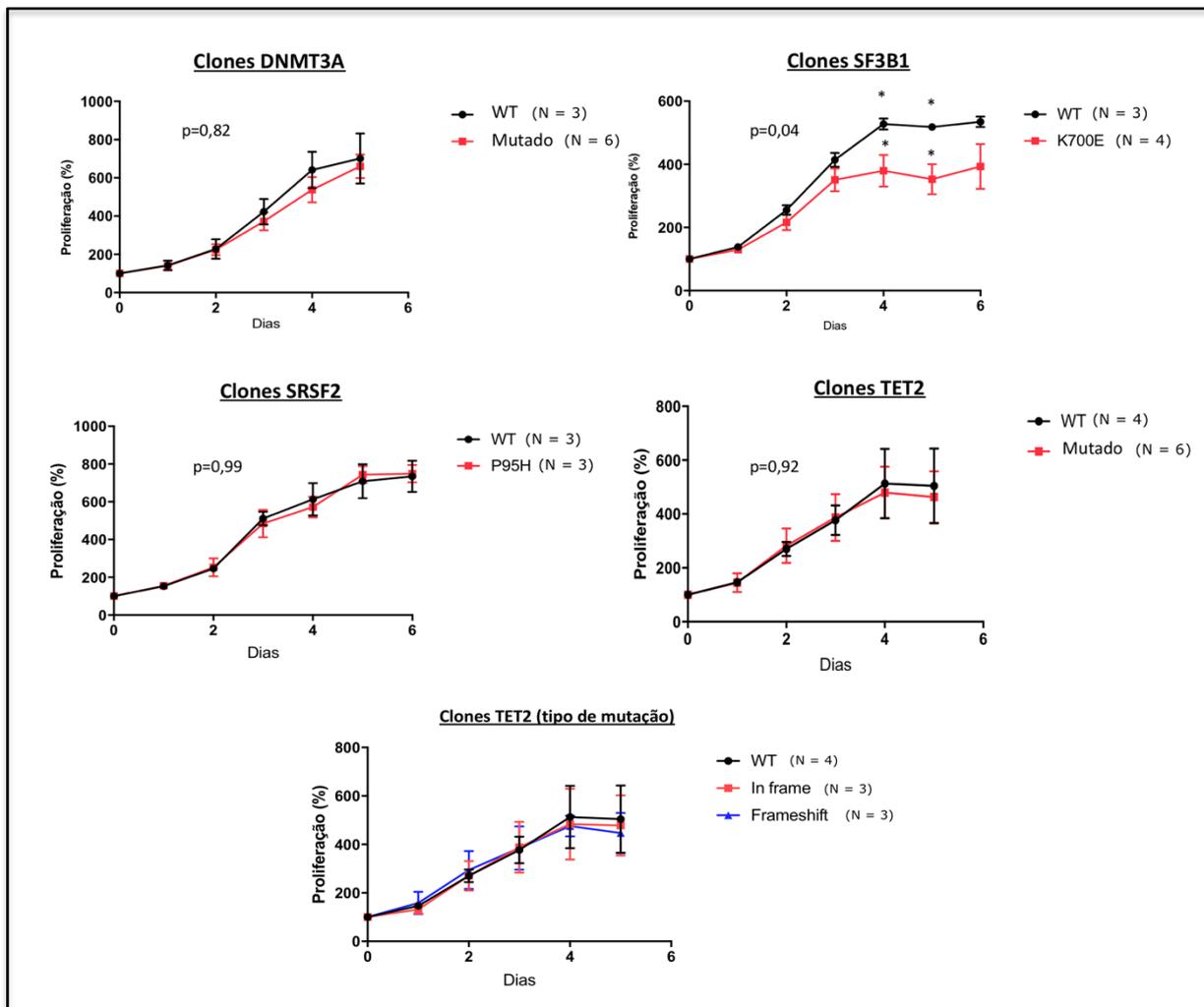


Figura 14 – Cinética de proliferação celular dos clones editados. Células K562 WT ou mutadas para os genes *DNMT3A*, *SRSF2*, *SF3B1* e *TET2* foram cultivadas *in vitro* por 7 dias e avaliadas por ensaio de MTT.

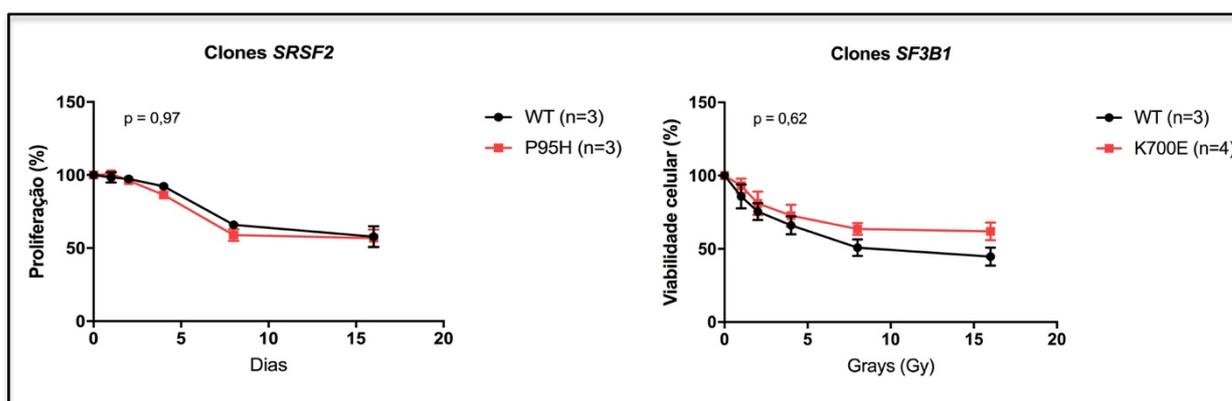


Figura 15 – Viabilidade celular após estresse genotóxico por radiação gama. As células K562 WT mutadas para os genes do spliceossoma (*SF3B1* e *SRSF2*) não apresentam sobrevida aumentada quando expostas à radiação gama (1 – 16 Gy).

Diferentemente das demais alterações, a mutação K700E no gene *SF3B1* conferiu perda na capacidade proliferativa celular. Frente a este resultado, foi realizado um ensaio de competição clonal *in vitro* estabelecido pela co-cultura entre as células K562 SF3B1 WT (n=3) e K700E (n=3). Essas linhagens foram transduzidas com lentivírus pHIV-EGFP ou pHIV-dTomato de forma que agora pudessem expressar, constitutivamente, as proteínas fluorescentes verde e vermelha. As células foram quantificadas e então misturadas na proporção 1:1 e a análise por citometria de fluxo permitiu aferir o percentual de cada população nos diferentes tempos de análise (D0, D+4, D+7, D+10 e D+14). Mesmo em co-cultura, as células SF3B1 K700E cresceram mais lentamente do que as WT, o que demonstra que a presença de ambos os clones no mesmo compartimento não foi capaz de alterar o comportamento proliferativo anteriormente observado para cada linhagem isoladamente (Figura 16).

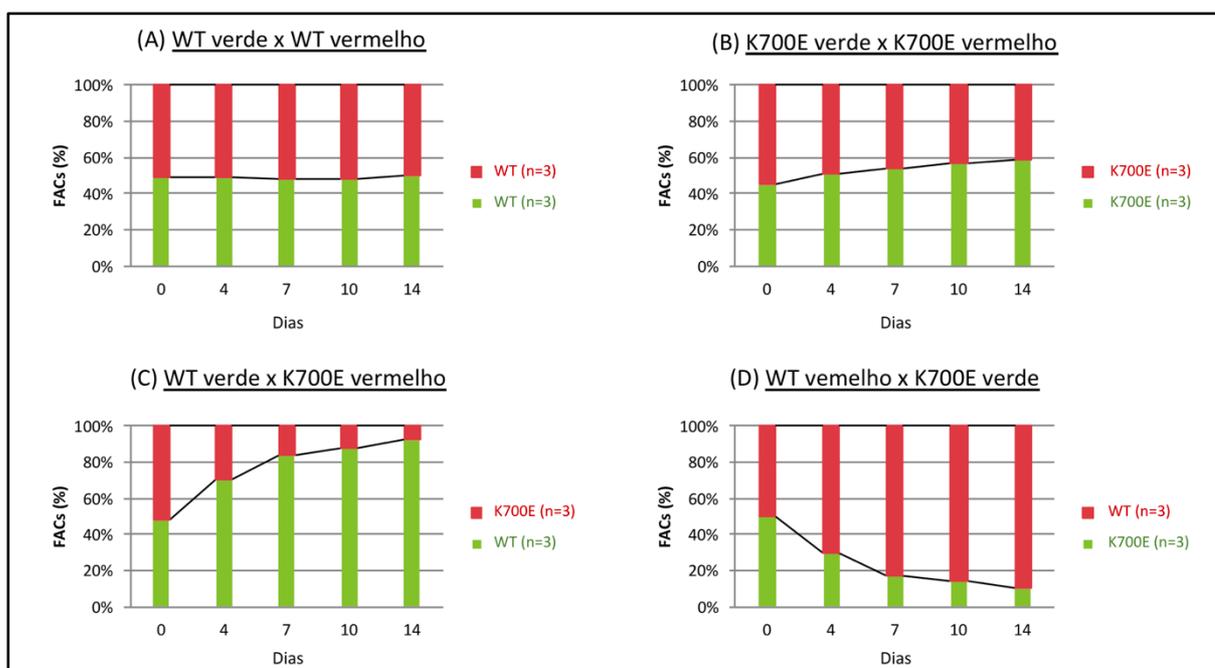


Figura 16 – Competição clonal *in vitro* entre clones selvagens e mutados para *SF3B1*. As células K562 SF3B1^{WT/WT} e apresentam vantagem proliferativa sobre os clones SF3B1^{WT/K700E} mesmo em experimentos de co-cultura WT:MT. As células foram cultivadas nas condições controles – (A) WT e (B) K700E, apenas, e em co-cultura (C e D) WT:K700E (1:1).

Ensaio *in vivo* com camundongos NSG também foram realizados para avaliação do crescimento celular dos clones com alterações em *SF3B1*. As células foram injetadas no dorso dos animais (n=5) via subcutânea na proporção 1:1 e mantidas por 30 dias até a formação do tumor visível. Nenhum dos animais morreu

durante esse período. A quantificação dos diferentes clones por citometria de fluxo demonstrou que, em todas as condições experimentais, após os 30 dias de incubação dos animais, só foi possível detectar células WT (Figura 17). Esses resultados são sugestivos de que as células K562 SF3B1 WT apresentam dominância clonal *in vivo* sobre as células SF3B1 K700E.

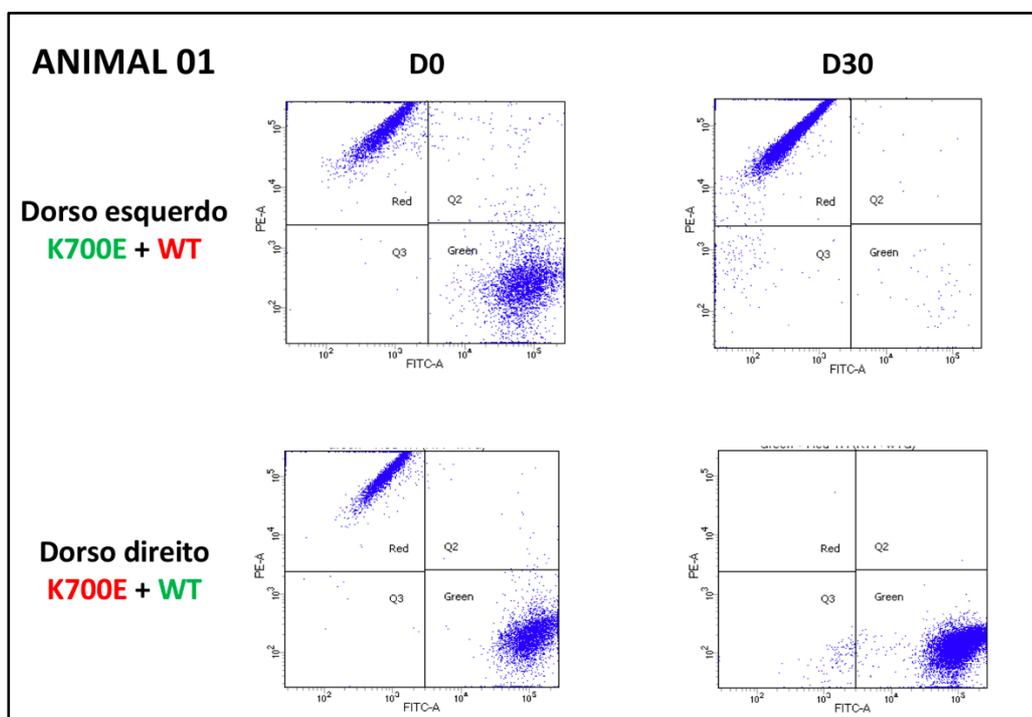


Figura 17 – Análise por citometria de fluxo do ensaio de competição clonal *in vivo* realizado com o animal NSG #01 – clones W1 + K1. As células K562 SF3B1^{WT/WT} (W1) e SF3B1^{WT/K700E} (K1) ambas EGFP e dsTomato positivas obtidas do tumor gerado em camundongos NSG via subcutânea. O dot-plot mostra células verdes (FITC) e vermelhas (PE) no início (D0) e ao fim do experimento (D30).

Além da viabilidade celular, foi avaliado o impacto das mutações pontuais em genes do spliceossoma na morte celular por apoptose. As mutações SF3B1 K700E e SRSF2 P95H não tiveram impacto significativo na morte celular, ainda que possa ser observado um aumento discreto da população apoptótica nos clones mutantes para SF3B1, quando comparadas ao controle (Figura 18).

Por fim, as células K562 SF3B1 WT (n=3) e K700E (n=3) foram submetidas à citocentrifugação, seguida de coloração das lâminas com Azul de Prússia para observação de figuras displásicas do tipo sideroblastos em anel. Nenhuma diferença morfológica foi observada nos clones analisados. As células mutantes para SF3B1

não apresentaram precipitação de ferro em torno do núcleo, característico de sideroblastos em anel presentes na medula de pacientes com SMD (Figura 19).

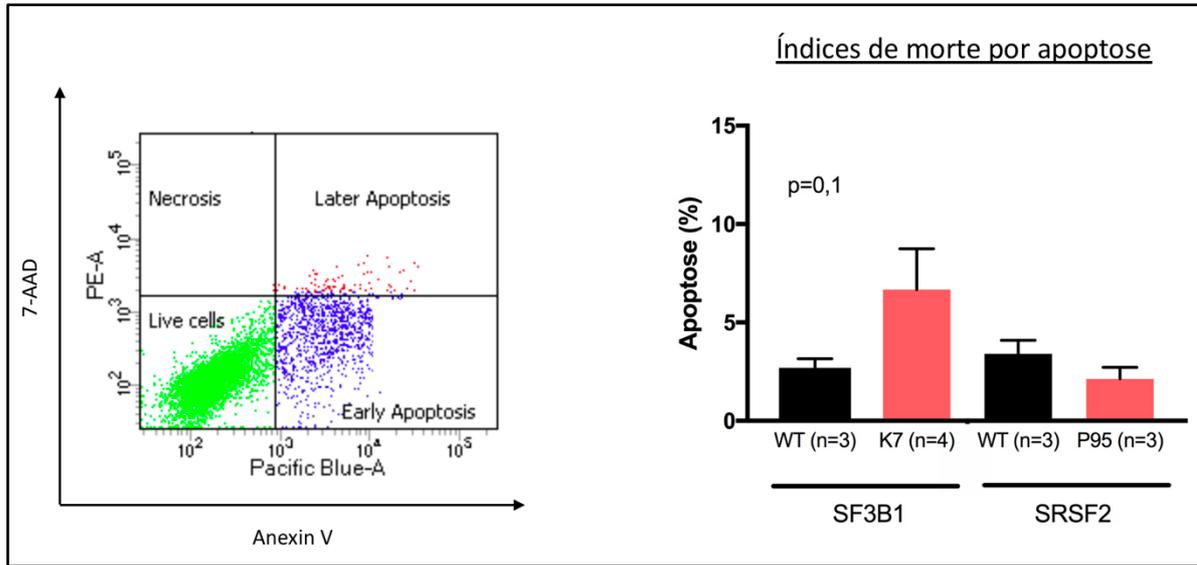


Figura 18 – Avaliação de morte celular por apoptose. Dot-plot parte inferior do quadrante esquerdo observam-se as células viáveis [Pacific Blue (-) vs PE (-)], no quadrante direito inferior um *cluster* de eventos positivos para Pacific blue (azul) indicativo de apoptose precoce e no quadrante direito superior células inviáveis, duplamente marcadas pelos corantes de viabilidade [Pacific Blue (+) vs PE (+)]. À direita é possível observar que a presença de mutações nos genes *SF3B1* e *SRSF2* não impactam na apoptose.

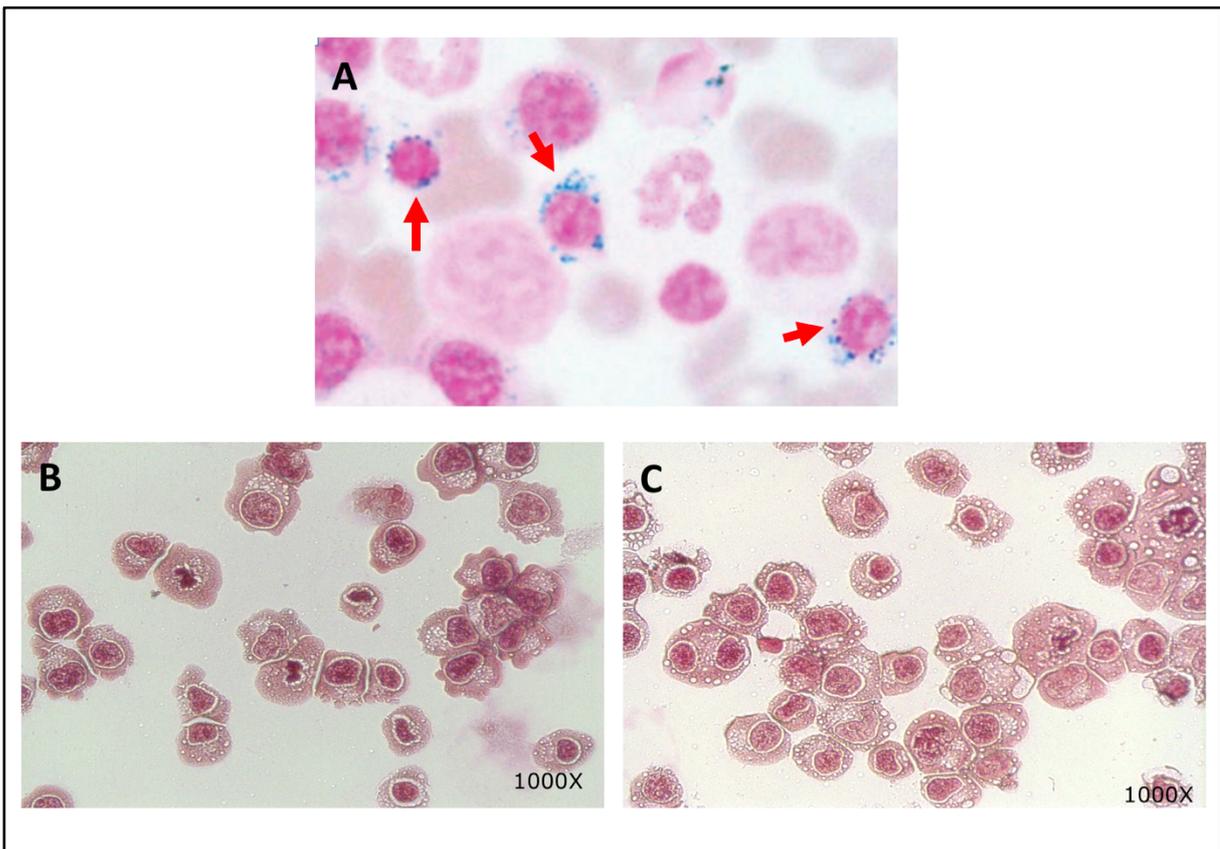


Figura 19 – Observação de sideroblastos em anel por coloração de lâminas com Azul da Prússia. (A) células marcadas para ferro reativo em torno do núcleo são realçadas por setas vermelhas [Fonte: (CAZZOLA; INVERNIZZI, 2011)]. (B) Clones K562 WT e (C) K700E foram citocentrifugados e corados para marcação de ferro reativo (aumento 1000X), porém não foram observados sideroblastos em anel.

5.3 Células com mutações em genes do spliceossoma secretam mais IL-8

Diferentes grupos de pesquisa já demonstraram que pacientes com neoplasias mieloides apresentam níveis alterados de citocinas em amostras de soro e plasma derivados de MO. Frente a isso, nós investigamos se os clones celulares com mutações em genes do spliceossoma apresentavam alguma diferença de expressão para oito citocinas humanas (IL-1 α , IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-6, IL-8, IFN- γ e TNF α), algumas, inclusive, já investigadas no contexto da SMD. Nesse trabalho, a quantificação proteica foi realizada por ensaio de alta performance do tipo multiplex na plataforma Luminex (Merck) utilizando sobrenadante das células K562 SF3B1 WT (n=3) e K700E (n=3). As citocinas detectadas em maiores quantidades no sobrenadante foram IL-1 β (18,4 – 18,8 pg/mL), IL-6 (6,9 – 45,6 pg/mL) e IL-8 (45,2 – 103,7 pg/mL), enquanto as demais não ultrapassaram 10 pg/mL. Os níveis de IL-8 foram maiores nas amostras coletadas dos clones K562 SF3B1 K700E, quando

comparadas às WT, o que sugere que a presença da mutação em *SF3B1* poderia afetar, de alguma forma, a expressão desta citocina ($p < 0,0001$) (Figura 20).

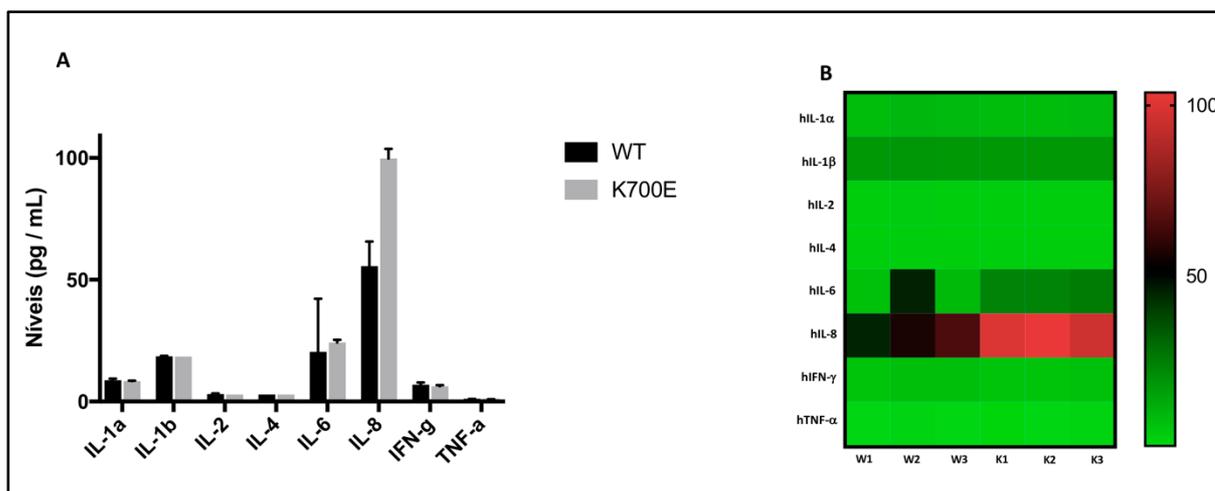


Figura 20 – Expressão de citocinas humanas por Luminex. O sobrenadante celular coletado dos clones *SF3B1* WT e K700E foram submetidos as análises de expressão proteica. (A) Níveis das citocinas humanas (pg/mL) analisadas nos clones *SF3B1* WT e K700E. (B) *Heatmap* mostra expressão aumentada para hIL-8 nos clones mutados.

A expressão de IL-8 foi avaliada também por ensaio de ELISA e por qRT-PCR. Foram avaliadas as amostras de sobrenadante celular de K562 *SF3B1* e *SRSF2*, ambas geradas neste estudo, além de clones K562 *U2AF1* WT e *S34F*, gentilmente, cedidos pela Dr. Yen K. Lieu do Departamento de Biologia Celular e Molecular da *Columbia University*. Clones com mutações em genes do spliceossoma apresentaram expressão aumentada para IL-8, entretanto, esses dados foram estatisticamente significantes apenas para o gene *U2AF1* ($p = 0,03$) (Figura 21a). A quantificação de transcritos de IL-8 por qRT-PCR mostrou um aumento da expressão em clones *SRSF2* ($p = 0,003$) e *U2AF1* ($p = 0,02$) mutados, com *fold change* de 1,5 e 1,3x, respectivamente, e um aumento discreto na expressão nos clones *SF3B1* K700E, embora esse dado não tenha sido estatisticamente significativo ($p = 0,19$) (Figura 21b).

Como a expressão de IL-8 se mostrou aumentada nos clones mutados para os genes do spliceossoma, foi avaliado se adição dessa citocina, combinada ou não, com IL-1α, poderia alterar a cinética de proliferação celular no ensaio de competição clonal *in vitro*. A concentração ótima das citocinas foi determinada por ensaio de viabilidade por MTT em quadruplicata com as células K562 não-editadas. A viabilidade celular foi

avaliada após 3 dias de incubação, na ausência ou na presença de cada citocina em concentrações crescentes entre 10 pg/mL e 10 µg/mL (7 condições experimentais que variavam de 1:10). Foi observado que as células ainda apresentavam crescimento exponencial a 1 ng/mL, e portanto, ambas as citocinas foram utilizadas nesta concentração para os ensaios futuros (Figura 22).

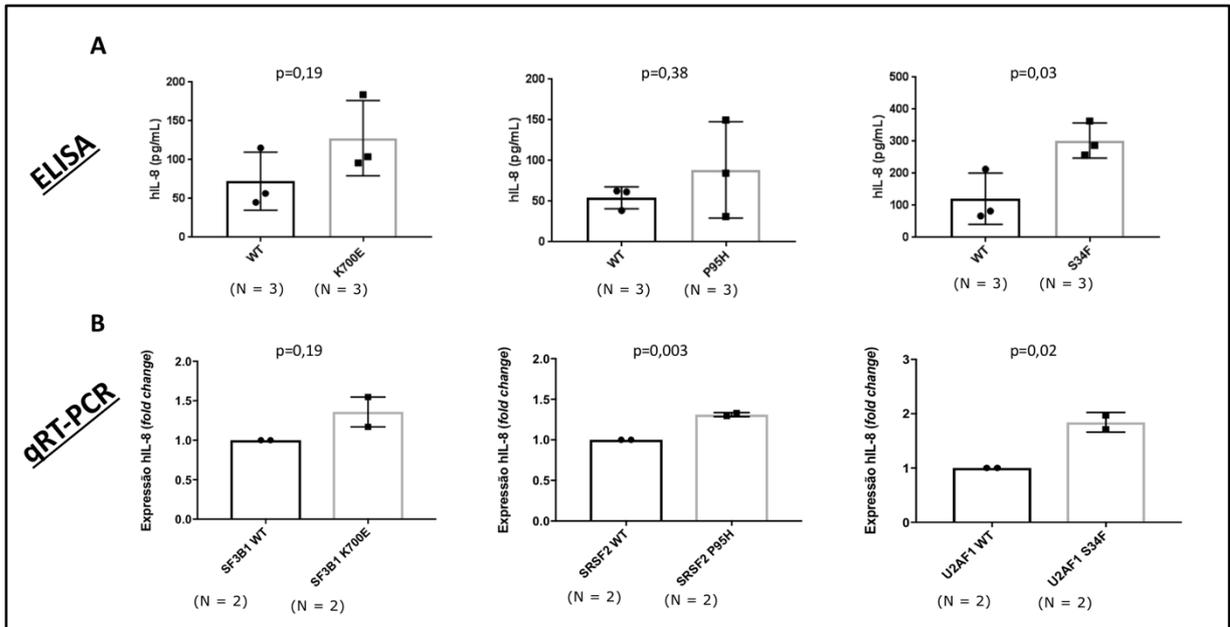


Figura 21 – Expressão de IL-8 nos diferentes clones celulares gerados. (A) O sobrenadante celular foi submetido a análise por ELISA, e o mRNA extraído dos respectivos clones, ao qRT-PCR. (A) A presença de mutações em genes do spliceossoma está relacionada ao aumento de IL-8 a nível proteico e (B) transcricional (mRNA).

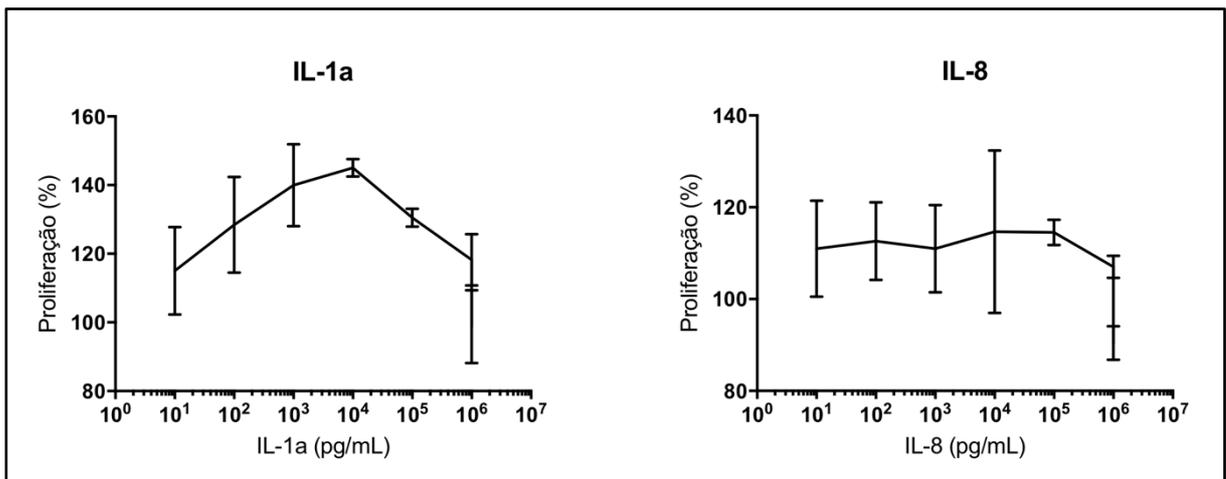


Figura 22 – Concentração ótima de citocinas para os ensaios de competição clonal. Células K562 foram cultivadas em diferentes concentrações das citocinas IL-1α e IL-8. Para ambas as citocinas humanas foi utilizada a concentração de 10³ pg/mL (= 1 ng/mL) para os experimentos seguintes.

Os ensaios de competição clonal foram realizados com as células K562 SF3B1 WT (n=3) e K700E (n=3) transduzidas com pHIV-EGFP ou pHIV-dTomato na presença de IL-1 α ou IL-8 ou ambas citocinas. No D0, as células foram plaqueadas e o meio de cultura, devidamente suplementado com citocinas, foi substituído a cada 4 dias. A avaliação dos clones celulares foi realizada por citometria de fluxo após 7 e 14 dias. Nesta ocasião, nenhuma diferença foi observada no perfil de crescimento celular, como já determinado em experimentos anteriores – clones SF3B1 K700E cresceram mais lentamente que os WT. Logo, o experimento foi realizado nas mesmas condições, mas agora com adição de citocina a cada 24h. Ainda assim, nenhuma diferença no comportamento dos clones foi observada (Figura 23).

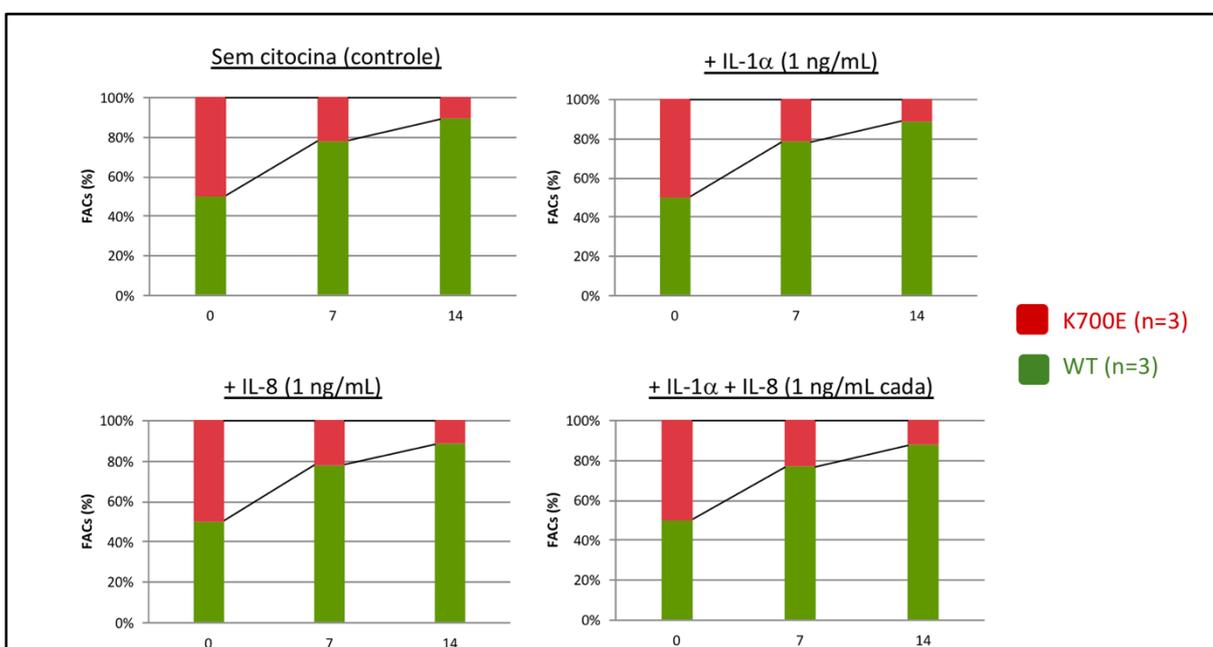


Figura 23 – Ensaio de competição clonal *in vitro* em presença de citocinas. Clones WT e mutados para SF3B1 foram co-cultivados na presença das citocinas humanas recombinantes IL-1 α e/ou IL-8 suplementadas diariamente. Células SF3B1 WT apresentam vantagem proliferativa sobre células mutantes.

5.4 Células estromais da MO não conferem dominância clonal às células K562 SF3B1^{WT/K700E}

Nossos achados demonstraram que a presença da mutação K700E no gene SF3B1 implicou em perda de viabilidade na linhagem celular K562 e que o co-cultivo entre células WT e mutantes não atribuiu dominância clonal às células SF3B1^{K700E}. Esses resultados foram consistentes em modelo *in vivo* e em ensaios de competição

clonal *in vitro* realizados na presença de citocinas já relacionadas às malignidades mieloides. Entretanto, modelos desse tipo não consideraram o *crosstalk* entre as células hematopoéticas e o nicho medular no qual residem. Diferentes estudos experimentais já demonstraram a importância do microambiente leucêmico na fisiopatologia das doenças malignas. Tendo em vista a relevância dessa interação entre os diferentes repertórios celulares, nós estabelecemos a co-cultura entre as células K562 SF3B1 WT (n=3) e K700E (n=3) expressando as proteínas fluorescentes EGFP e dTomato na presença de células estromais da MO de um indivíduo normal e de dois pacientes com SMD, um com del(5q) e outro com SMD-DM.

O co-cultivo entre as células K562 SF3B1 WT e K700E e o estroma proveniente do indivíduo saudável não alterou o perfil proliferativo dos clones – as células mutadas proliferaram menos que as células WT. Todavia a presença do estroma proveniente dos pacientes com SMD potencializou ainda mais a habilidade proliferativa dos clones WT, tornando ainda mais drástica a diferença quantitativa entre clones SF3B1^{WT/WT} e SF3B1^{WT/K700E} após 7 dias em cultura (p<0,0001) (Figura 24).

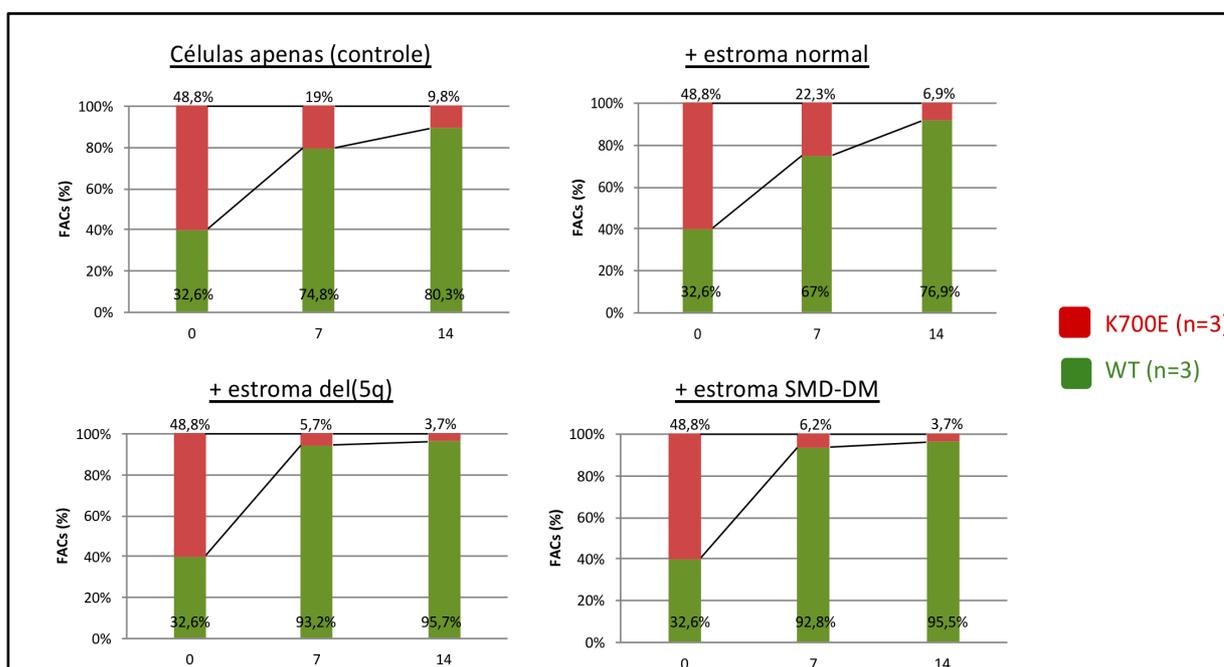


Figura 24 – Ensaio de competição clonal *in vitro* em presença de estroma. As células estromais foram cultivadas em meio seletivo e posteriormente co-cultivadas com clones SF3B1 WT e K700E. Células SF3B1 WT apresentam vantagem proliferativa ainda maior sobre células mutantes quando comparadas a condição controle.

5.5 Co-ocorrência de mutações nos genes *TET2* e *SF3B1* potencializam a perda de viabilidade celular no modelo de K562

Recentemente, uma série de estudos genômicos desvendaram a arquitetura clonal das SMD. Na ocasião, observou-se que aproximadamente 1/3 dos pacientes com mutação em *SF3B1* apresentavam alterações co-ocorrentes no gene *TET2*. Esses dados sugerem uma possível cooperação entre as mutações somáticas nestes marcadores para o estabelecimento das condições neoplásicas do sangue. Por isso, nós investigamos o impacto de mutações sucessivas no gene *TET2* em células K562 *SF3B1* K700E, gerando assim um modelo duplo-mutado para um gene da categoria do spliceossoma e um gene de regulação epigenética. O clone K562 *SF3B1* K700E K1 foi transfectado com o plasmídeo pGL4.22-dsRED-g*TET2* nas condições estabelecidas ao longo do estudo. Ao total foram gerados seis clones distintos *SF3B1*^{WT/K700E}*TET2*^{mut}, um com uma deleção (del_TAGTCGTGT) em homozigose (*SF3B1*^{WT/K700E}*TET2*^{-/-}) e cinco com mutações na condição heterozigótica (*SF3B1*^{WT/K700E}*TET2*^{+/-}). De todas as alterações geradas em *TET2*, três foram do tipo *in-frame* e outras três do tipo *frameshift*.

Inicialmente, foi investigado se a presença de uma mutação secundária em *TET2* seria capaz de alterar a viabilidade das células previamente mutadas para *SF3B1*. Para isso, foi realizado ensaio de MTT com clones WT para ambos os genes [*SF3B1*^{WT/WT}*TET2*^{+/+}] (n=3), mutados apenas para *SF3B1* [*SF3B1*^{WT/K700E}*TET2*^{+/+}] (n=4) e mutado para os dois genes-alvos [*SF3B1*^{WT/K700E}*TET2*^{mut}] (n=6). A presença da uma mutação em *TET2* diminuiu ainda mais o crescimento *in vitro* das células (p = 0,004) e parece ser ainda mais dramático para os clones com mutações com alteração no quadro de leitura (*frameshift*), embora esse dado não tenha sido estatisticamente significativo (p = 0,06) (Figura 25).

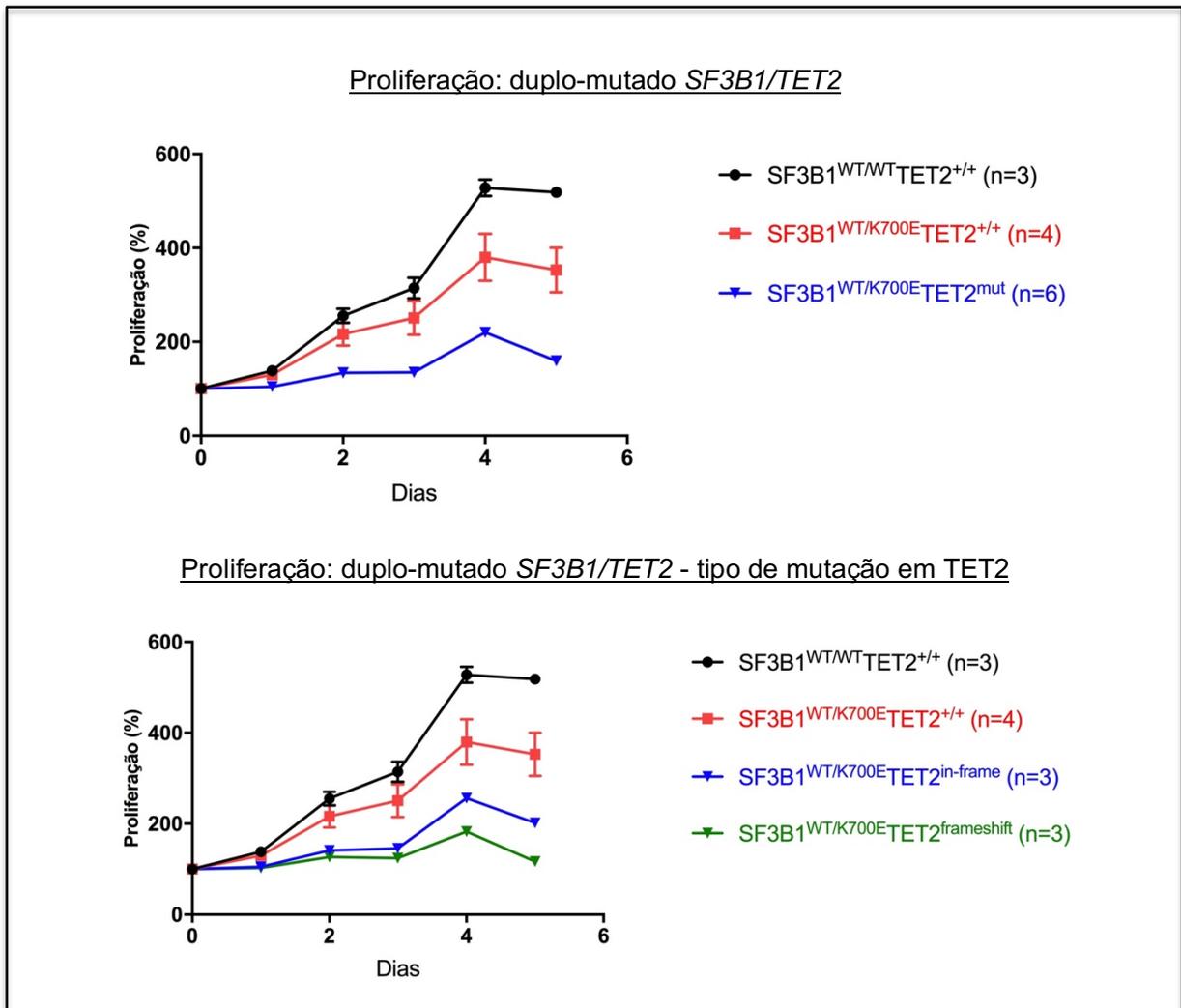


Figura 25 – Ensaio de viabilidade celular com células duplo mutadas [*SF3B1/TET2*]. Células duplo mutadas apresentam proliferação celular diminuída quando comparadas as células mutadas apenas para *SF3B1* ou WT para ambos os genes.

Tendo em vista que a mutação *SF3B1* K700E, associada ou não a outras alterações genéticas, levou a diminuição proliferativa das células K562, quando comparadas as *SF3B1*^{WT/WT}, foi investigado então se essa(s) mutação(ões) seria(m) capaz(es) de alterar o perfil do ciclo celular da linhagem. Os clones *SF3B1*^{WT/WT}*TET2*^{+/+} (n=3), *SF3B1*^{WT/K700E}*TET2*^{+/+} (n=4) e *SF3B1*^{WT/K700E}*TET2*^{+/-} (n=5) foram marcados com intercalante de DNA (PI) e então analisados por citometria de fluxo para identificação dos diferentes estágios do ciclo celular. A proporção de eventos detectados em cada estágio da ciclagem das células foi semelhante para os três grupos de análise, G0/G1 (46,8% ± 3,2), S (37,1% ± 1,7) e G2/M (2,4% ± 0,6)

(Figura 26), sugerindo assim que a presença das mutações em *SF3B1* e *TET2* não afetaram diretamente a proliferação dessas células.

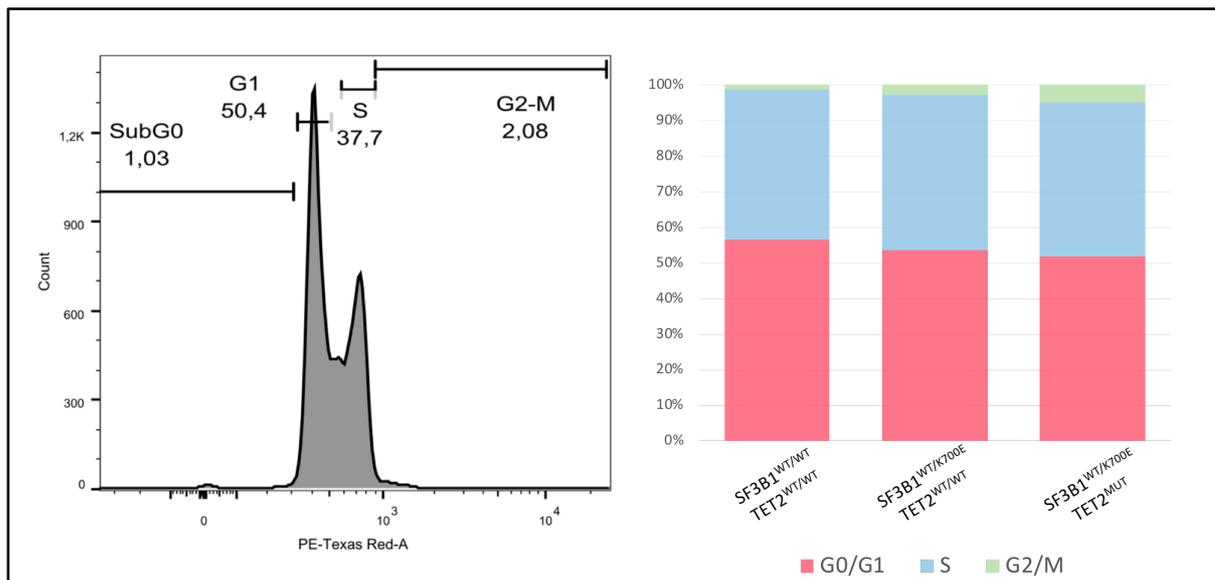


Figura 26 – Avaliação do ciclo celular em células geneticamente editadas. A esquerda, o histograma de conteúdo de DNA (PE) realizado com células não sincronizadas dos clones WT, SF3B1 K700E e duplo-mutados (SF3B1/TET2). Células marcadas com o corante intercalante de DNA. O gráfico em barras (direita da figura) apresenta as fases G0/G1, S, G2/M nas células testadas, evidenciando que não há diferença dos estágios de ciclagem celular nos diferentes clones.

Uma vez observado que mutações co-ocorrentes em *SF3B1* e *TET2* não impactavam diretamente na proliferação das células editadas, foi investigado os níveis de morte por apoptose dos mesmos clones. Embora observado uma tendência de morte maior para os clones duplo-mutados em relação ao controle, esse dado não foi estatisticamente significativo ($p=0,13$) (Figura 27).

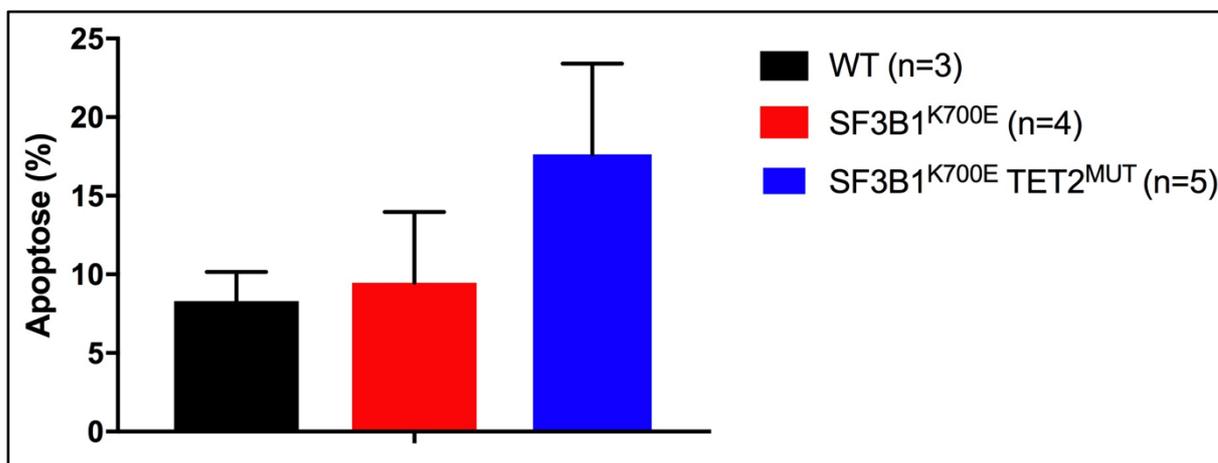


Figura 27 – Avaliação de morte celular por apoptose. As células K562 WT, SF3B1^{K700E} e duplo-mutadas não apresentaram diferença estatisticamente significativa nos níveis de apoptose celular.

5.6 Clones duplo-mutados (SF3B1^{K700E}/TET2^{+/-}) apresentam diferenciação eritróide espontânea *in vitro*

Diferentes modelos que resultam em perda de função de *SF3B1*, quer seja por silenciamento ou por mutações pontuais no gene, demonstraram alterações ao longo da diferenciação eritropoética. Nós então investigamos a diferenciação à série vermelha *in vitro* dos clones geneticamente editados através da expressão de dois marcadores de superfície presentes em progenitores comprometidos com a população eritrocitária, o receptor de transferrina (CD71) e glicoforina A (GPA). Para isso foram utilizados os clones WT (n=3), SF3B1 K700E (n=3) e duplo-mutados SF3B1/TET2 (n=5). Os ensaios de expressão antigênica evidenciaram elevada expressão de CD71 em todos os clones, independente do *status* mutacional. Entretanto, a expressão da proteína GPA estava aumentada em clones SF3B1^{K700E}/TET2^{+/-} em relação as demais, sugerindo que células K562 duplo-mutadas para *SF3B1* e *TET2* apresentam diferenciação espontânea à série vermelha espontaneamente (Figura 28).

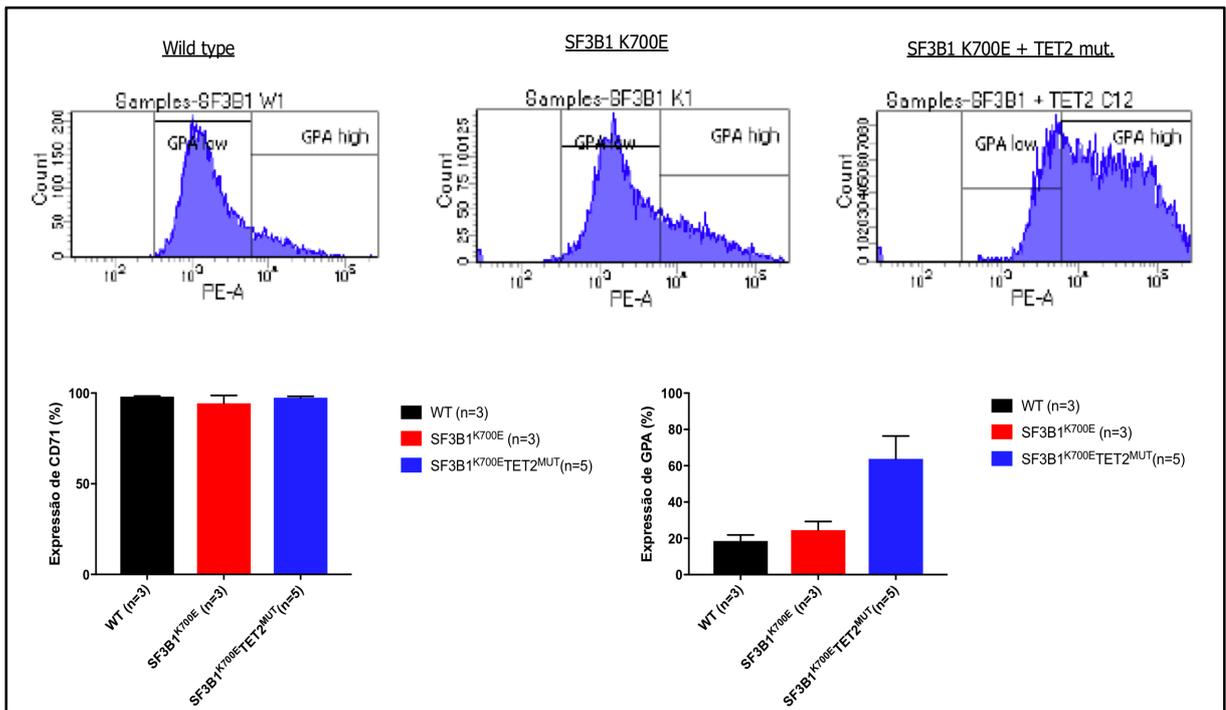


Figura 28 – Análise da diferenciação eritróide em clones editados para *SF3B1* e *TET2*. Os clones celulares foram marcados com anticorpos específicos anti-71 e anti-GPA para avaliação da expressão dos antígenos de superfície subjacentes à diferenciação eritróide. Células duplo-mutantes apresentam expressão aumentada de GPA quando comparadas as condições WT e SF3B1^{K700E}.

6. DISCUSSÃO

O processo de leucemogênese, em especial, o que acomete a linhagem mieloide, decorre da transformação maligna de uma CTH, em geral, ocasionado por alterações na molécula de DNA (WISEMAN; GREYSTOKE; SOMERVILLE, 2014). Nesta etapa, a CTH maligna, ou CTH leucêmica (CTH-L), quando em um microambiente propício, sofre expansão clonal, e com isso, suprime a hematopoese normal de forma a induzir o processo (pré)maligno, como discutido na introdução deste manuscrito. Os primeiros indícios da existência de uma CTH-L apareceram há aproximadamente cinco décadas, tendo-se como modelos de estudo a LMA (BONNET; DICK, 1997; GOLDMAN; TH'NG; LOWENTHAL, 1974; LAPIDOT *et al.*, 1994; METCALF; MOORE; WARNER, 1969) e LMC (HOLYOAKE; VETRIE, 2017; PETZER *et al.*, 1996). Lapidot e colegas reportaram a existência de CTH-L ao estabelecerem leucemia em um modelo de xenotransplante, tendo como material de enxerto uma população imunofenotipicamente atípica de CTH provindas do SP de pacientes com LMA. Essas células foram capazes de estabelecer leucemia aguda nos animais transplantados, exibindo propriedades de autorrenovação, quiescência do ciclo celular e quimiorresistência.

Na SMD, a existência de uma CTH-L foi discutida e teorizada por muitos anos, entretanto, apenas em 2010 foi publicada a primeira evidência da existência desse repertório de células. Na ocasião, foi observado que virtualmente todas as células progenitoras CD34⁺CD38⁺ e CTH CD34⁺CD90⁺, com expressão baixa ou indetectável de CD38, apresentavam del(5q). Embora o tratamento com lenalidomida tenha sido capaz de reduzir eficientemente esses progenitores, uma fração dessas CTH ainda foi capaz de ser detectada em pacientes em remissão completa, levando a crer que essa poderia ser uma população de CTH-L resistente ao tratamento (TEHRANCHI *et al.*, 2010). Mais tarde, um estudo publicado pelo mesmo grupo demonstrou que a del(5q) é uma alteração fundadora na SMD e que a aquisição de outros eventos genéticos (mutações em *JAK2*, *TP53* e *IKZF1*) pode levar a progressão da doença à LMA secundária (WOLL *et al.*, 2014).

Além de alterações genéticas fundadoras, como a del(5q), a leucemogênese depende de eventos não-genéticos, como alterações epigenéticas e um

microambiente propício para o desenvolvimento do tumor ou leucemia, além de mutações genéticas adicionais (ASADA, 2018; CHATTERJEE; RODGER; ECCLES, 2017; DUARTE; HAWKINS; LO CELSO, 2018; HANAHAN; WEINBERG, 2011). A transformação celular é um processo de múltiplas etapas caracterizado pela aquisição sequencial de mutações somáticas que afetam genes de diferentes categorias. O surgimento de alterações subsequentes no genoma da “célula iniciada”, como mutações condutoras, que atribuem vantagem proliferativa e, com isso, expansão do(s) clone(s) maligno(s), e mutações passageiras, que não conferem vantagem na proliferação, e ao que parece, são reflexo da instabilidade genética observada no câncer, são eventos necessários para as demais etapas da carcinogênese: promoção, progressão, e em alguns casos, manifestação ou metástase (RISQUES; KENNEDY, 2018; VOGELSTEIN *et al.*, 2013). Esse modelo de progressão do câncer em decorrência da aquisição de alterações genéticas sequenciais é bem estabelecido para tumores sólidos, como por exemplo, câncer de cólon (MARKOWITZ; BERTAGNOLLI, 2009), pâncreas (IACOBUZIO-DONAHUE *et al.*, 2012) e melanoma (SOO *et al.*, 2011). Para as leucemias e demais malignidades do sangue, alguns estudos de evolução clonal *in vivo* sugerem que este modelo de aquisição de mutações somáticas de forma hierarquizada (mutações fundadoras, condutoras e passageiras) compõe um processo biológico importante para a progressão dessas doenças (HOSONO *et al.*, 2017; JACOBY *et al.*, 2018; MARTÍNEZ-LOSADA *et al.*, 2018; SATO *et al.*, 2018; SCHANZ *et al.*, 2018; WALTER *et al.*, 2012), entretanto, não há relatos na literatura que demonstrem isso experimentalmente.

Dentre os modelos mutacionais já estabelecidos para as malignidades mieloides, as alterações JAK2 V617F e BCR-ABL (t(9;22)), biomarcadores para NMP e LMC, respectivamente, talvez sejam os melhores estabelecidos como condição causal para o desenvolvimento de doença. Em 2006, Lacout e colaboradores demonstraram que camundongos transplantados com células de MO transduzidas com retrovírus expressando JAK2^{V617F} desenvolveram policitemia vera (PV), um tipo de NMP (LACOUT *et al.*, 2006). Esses animais cursavam com hiperplasia das três linhagens mieloides (eritróide, mega e granulocítica), fibrose medular e esplenomegalia com amplificação de progenitores mieloides (hematopoese extramedular) – um fenótipo consistente de PV com evolução para mielofibrose, compatível com a doença em humanos. Na mesma época, outros dois grupos

publicaram o desenvolvimento de modelos murinos *knock-in* condicional (LI *et al.*, 2010) e constitutivo (MARTY *et al.*, 2010) para a mutação JAK2 V617F. Em ambos os casos, foram relatados fenótipo compatível com NMP, evidenciando novamente que JAK2 V617F é condição única e suficiente para o desenvolvimento da doença.

Ainda no contexto da oncohematologia, a estreita relação genótipo-fenótipo já havia sido demonstrada anteriormente por McLaughlin e colegas ao constatarem que células murinas obtidas a partir da MO, quando transduzidas com retrovírus expressando a isoforma p210 do gene quimera *BCR-ABL*, apresentavam dominância clonal *in vitro* e eram capazes de induzir leucemia quando reinjetadas em camundongos (MCLAUGHLIN; CHIANESE; WITTE, 1987). Esse foi o primeiro indício experimental do potencial oncogênico de *BCR-ABL*, que mais tarde foi corroborado por outros grupos ao demonstrarem que esse marcador de LMC regulava proliferação e apoptose celular através de diferentes vias de sinalização (PENDERGAST *et al.*, 1993; PUILL *et al.*, 1994; SÁNCHEZ-GARCÍA; GRÜTZ, 1995; STEWART *et al.*, 1995). Isso explicaria, em parte, nossos resultados de proliferação obtidos com as células K562 mutadas para os genes *DNMT3A*, *SRSF2* e *TET2*. Aparentemente, alterações nesses marcadores não impactaram na capacidade proliferativa dessas células. Uma possível explicação é que a K562 é uma célula *BCR-ABL+*, e por isso, já exibe hiperativação de vias de sinalização que culminam em proliferação celular aumentada. Todavia, isso não explicaria o fenótipo observado para os clones *SF3B1* K700E, tendo em vista que para esses casos foi observado diminuição da proliferação celular. Mutações em *TET2* associadas a alteração em *SF3B1* levaram a uma diminuição ainda mais drástica no número de K562 células viáveis, apesar de não impactarem na viabilidade celular quando avaliadas isoladamente. Esse dado sugere que essas mutações somáticas podem potencializar danos à biologia da célula quando co-ocorrem no mesmo clone. Um outro fator importante é que nem todos os genes implicados na etiopatogênese das malignidades mieloides regulam proliferação celular. Diferentemente das mutações JAK2 V617F e *BCR-ABL*, nem todos esses marcadores genéticos representam eventos condutores, necessariamente. Cabe salientar que os clones K562 *SF3B1* K700E foram analisados por RNA-seq e mostraram distúrbios no processo de *splicing* de genes alvos importantes, o que corrobora com o sucesso do modelo e mostrando assim que a modelagem da K562 para essa mutação funcionou devidamente.

Independente das limitações experimentais subjacentes ao uso de células K562 para a modelagem de doenças complexas, é importante ressaltar a facilidade e os elevados índices de sucesso da edição genética dessa linhagem, sobretudo, quando comparados às células primárias. Células animais *ex vivo* requerem protocolos mais apurados de transferência gênica e manutenção. A escolha do melhor modelo de análise deve ser determinada, sobretudo, de acordo com as questões da pesquisa, mas de uma forma geral, células imortalizadas já estabelecidas em cultura são plataformas extremamente úteis para a execução dos experimentos. A eficiência de edição genética em nosso estudo foi bastante alta quando comparada a outros sistemas mais convencionais de edição por CRISPR/Cas9. Isso pode ser resultado de uma série de fatores, mas cabe mencionar a qualidade do desenho dos gRNA e a estratégia de expressão indutível da eCas9 utilizada nesse estudo. Além do que, essa abordagem experimental não só possibilitou eficiência aumentada de edição, mas também a geração de uma linhagem K562 matriz passível de modelagem para diferentes genes alvos. A reprodução da edição genética e posteriores ensaios funcionais em células CD34⁺ obtidas de MO e/ou cordão umbilical possibilitaria inferir o impacto dessas alterações em células hematopoiéticas não comprometidas com qualquer *hit* oncogênico, e em parte, poderiam atribuir resultados distintos, porém mais fidedignos à origem leucemogênica.

A célula HEK 293T não foi capaz de expressar o alelo mutado (K700E) para o gene *SF3B1*, ainda que essa mutação pudesse ser observada no DNA. Uma análise do número de cópias (CNV) desta linhagem foi realizada por um de nossos colaboradores do estudo que observou ganho de material genético de 1,5X para o *locus* 2q33.1, região de localização de *SF3B1*. Esse resultado revelou que a célula HEK 293T possivelmente apresenta três alelos do gene, e isso poderia explicar porque não houve proporcionalidade entre os picos WT e mutado para os clones gerados a partir dessa linhagem. A priori, os clones HEK 293T seriam utilizados para a investigação proteômica, entretanto, a ausência de expressão do alelo mutado levou a interrupção desta abordagem. Muito se discute sobre o impacto das mutações do spliceossoma na regulação e edição transcricional, porém pouco se sabe como as mutações afetam a estrutura deste complexo. Portanto, a investigação de proteínas parceiras das versões WT e mutantes da proteína é bastante relevante. Em suma, os mecanismos moleculares responsáveis pela regulação da expressão do gene *SF3B1*

não foram investigados no nosso modelo, e portanto, não foi possível determinar as razões pelos quais o alelo mutado não foi expresso nessa célula. Dois estudos independentes demonstraram a expressão de SF3B1^{K700E} em células HEK 293T por abordagens de transferência genética com vetores de expressão (HAN *et al.*, 2017; WANG *et al.*, 2016). Mais recentemente, um outro grupo gerou por edição de DNA mediada por CRISPR/Cas9 uma linhagem HEK 293T com a mutação K666T no gene *SF3B1* (ALSAFADI *et al.*, 2016). Este último trabalho comprovou a expressão do alelo mutado através dos dados gerados por RNA-seq, evidenciando que a HEK 293T poderia ser utilizada para eventual modelagem deste gene.

A mutação SF3B1 K700E não apenas mostrou impacto na viabilidade celular, como também foi capaz de induzir resistência aumentada à radiação gama. Não se sabe ao certo qual a relação entre a subunidade 1 do fator de splicing 3B, proteína codificada pelo gene *SF3B1*, e os mecanismos de resistência associados ao dano de DNA. Entretanto, estudos baseados em ensaios de expressão gênica demonstraram alterações em *KLF8*, *ATM*, *FANCD2*, *CDKN2A*, *LRWD1*, *SKP2*, *NME1* e outros genes; todos implicados na resposta ao dano de DNA, alguns, inclusive, regulados pelo eixo ATM/p53 (DOLATSHAD *et al.*, 2015; TE RAA *et al.*, 2015; WANG *et al.*, 2016). Um outro estudo realizado por Savage *et al.* descreveu a interação proteica entre SF3B1 e o complexo BRCA1–BCLAF1, em resposta a radiação ionizante (SAVAGE *et al.*, 2014). Esse dado sugere uma possível função não-canônica da proteína SF3B1. Contraditoriamente, um outro estudo demonstrou que células K562 SF3B1 K700E geradas por CRISPR/Cas9 exibiram aumento significativo na sensibilidade ao tratamento com etoposídeo, quando comparadas as células WT, o que pressupõe que a presença da mutação compromete o sistema de reparo de DNA dessas células (LAPPIN *et al.*, 2017).

O ensaio de MTT utilizando nos experimentos de proliferação ao longo deste estudo permite a detecção de células viáveis devido a expressão de enzimas mitocondriais do tipo desidrogenases, que são capazes de clivar a estrutura de anel tetrazólico encontrado no corante (MTT) em formazan. Essa reação culmina em mudança de cor do reagente e, portanto, é uma reação colorimétrica quantitativa que permite inferir a razão de células viáveis no meio. Por se tratar de um método bioquímico dependente do metabolismo enzimático, alterações na bioenergética da

célula podem afetar os resultados do ensaio. Já é sabido que a mutação SF3B1^{K700E} induz alterações no perfil bioenergético mitocondrial e, portanto, isso poderia influenciar sobre o resultado de viabilidade por MTT.

De todas as alterações fenotípicas promovidas pelas mutações em SF3B1, a presença de sideroblastos em anel na MO é a que possui a melhor relação causal. Sideroblastos em anel refere-se a um grupo de células precursoras da série eritróide (eritroblastos) que exibem mitocôndrias saturadas com ferro e que assumem posição perinuclear, que por analogia, assemelham-se a estruturas de anéis em torno do núcleo (CAZZOLA, 2003). Diferentes estudos sugerem que a disfunção no metabolismo mitocondrial é uma peça chave para o desenvolvimento de SMD-SA, entretanto, os mecanismos moleculares relacionados à esse subtipo da doença são ainda desconhecidos (BOULTWOOD *et al.*, 2008; PELLAGATTI *et al.*, 2006). O desenvolvimento do primeiro modelo *in vivo* de haploinsuficiência para SF3B1 (camundongo C57BL/6 *sf3b1*^{+/-}) mostrou distribuição aberrante de ferro citoplasmático detectado por microscopia eletrônica, sugerindo que a deleção mono-alélica do gene implicaria no metabolismo mitocondrial desses animais (VISCONTE *et al.*, 2012). Entretanto, ao analisarmos os clones K562 SF3B1 K700E gerados neste estudo, nenhuma alteração estrutural compatível com a formação de cristais de ferro foi observada. Nenhum estudo prévio relatou a presença de estruturas citoplasmáticas semelhantes as observadas em sideroblastos em anel em células K562.

O nicho da MO exerce uma função primordial na regulação da hematopoese normal, desencadeando uma série de processos moleculares nas células hematopoéticas via fatores extrínsecos. Contudo, há relatos na literatura que discutem o papel do microambiente medular na leucemogênese, quer seja como agente indutor ou promotor de câncer (BHAGAT *et al.*, 2017; KODE *et al.*, 2014). Na SMD, os pacientes acometidos pela doença, em sua grande maioria, cursam com hiperplasia medular, em decorrência da expansão clonal das células comprometidas, e citopenias no SP. Raza *et al.* publicaram os primeiros indícios de que essa transição de uma medula cheia para a periferia vazia era consequência da hiperativação da apoptose, observada nas células desses pacientes ainda na MO (RAZA *et al.*, 1995a, 1995b). Estudos posteriores demonstraram que a apoptose exacerbada na SMD era dependente de TNF- α (RAZA *et al.*, 1996). Mais recentemente, dois estudos relataram

o aumento de IL-8 em amostras medulares obtidas de pacientes com SMD (DE MATOS *et al.*, 2017; SCHINKE *et al.*, 2015). Entretanto, até o momento, não há dados na literatura que mostrem a relação entre as mutações em genes do spliceossoma e a expressão dessa citocina. IL-8 é um mediador de resposta imune inata secretado por células fagocíticas ativadas e células dendríticas, porém, há relatos da sua expressão por diferentes linhagens celulares, inclusive, K562 (REUTER *et al.*, 2009; SRIVASTAVA; SRIVASTAVA; SRIVASTAVA, 1993; TERUI *et al.*, 1998). Em relação a citocina IL-1 α , embora ela não tenha apresentado expressão diferenciada entre as células SF3B1 WT e K700E, há relatos na literatura que correlacionam sua expressão aberrante com a SMD, além de descreverem seu potencial como alvo terapêutico na doença e o aumento proliferativo de células leucêmicas mediado por essa citocina (DE MOOIJ *et al.*, 2017; KORNBLAU *et al.*, 2010). Ainda assim, no nosso modelo de estudo, a presença das citocinas IL-1 α e IL-8, isoladas ou conjuntamente, não alterou o comportamento de proliferação já descrito – células SF3B1 K700E cresceram menos que as WT. Ainda sobre o aspecto inflamatório da SMD, foi demonstrado recentemente o papel da proteína NLRP3 e da cascata de inflamassoma na doença (BASIORKA *et al.*, 2016). O aumento nos níveis séricos da alarmina S100A9, aparentemente, secretada por algumas células mielóides, induz a ativação da via de sinalização NF- κ B via receptores do tipo TLR4 e CD33, que culmina na ativação do inflamassoma nessas células. Mutações em genes de regulação epigenética e spliceossoma também são capazes de ativarem intrinsecamente essa cascata inflamatória.

Em relação a diferenciação celular, diferentes estudos mostraram que as alterações em genes de regulação epigenética (*TET2*, *DNMT3A*, *ASXL1*, etc.) são capazes de alterar a hematopoese humana (*in vitro*) e murina. O mesmo em relação aos genes *SF3B1*, *SRSF2* e *U2AF1*, implicados no complexo do spliceossoma. Na SMD, especificamente, as anemias são as citopenias periféricas mais comuns na doença e comumente acompanham eritropoese aberrante. HUANG *et al.*, 2018 documentaram que o *knock-down* de *SF3B1* em células CD34+ humanas levou ao aumento da apoptose e parada do ciclo celular de células eritróides precursoras com diferenciação anormal. Em nosso estudo, foi observado uma indução da diferenciação eritróide nas células K562 mutadas para *SF3B1* e *TET2*, avaliando a expressão das proteínas CD71 e GPA, ao passo que, nenhuma alteração foi observada nos clones

mutados apenas para o gene do spliceossoma. Isso reforça que essas alterações quando co-ocorrentes são capazes de induzir alterações fenotípicas (ainda) mais marcantes.

Considerando os achados do nosso estudo, foi possível observar que mutações no spliceossoma, em especial, em *SF3B1*, leva a alterações na viabilidade celular e capacidade de diferenciação *in vitro* quando associada a mutações genéticas implicados em outras vias já contextualizadas com as doenças clonais do sangue. A geração de modelos geneticamente editados permite responder outras questões relacionadas ao impacto das mutações patogênicas das malignidades mieloides e condições clonais do idoso.

7. CONCLUSÃO

- Os plasmídeos gerados neste estudo para a expressão de componentes do sistema CRISPR/Cas9 permitiram o estabelecimento de linhagens celulares *knock-in* e *-out* para os genes relacionados à etiopatogênese das neoplasias mieloides.
- Mutações nos genes *DNMT3A*, *SRFS2* (P95H) e *TET2* não alteram a viabilidade celular *in vitro* e *in vivo* de linhagens celulares hematopoéticas.
- Células mutadas para o gene *SF3B1* não apresentam dominância clonal sobre os clones WT, mesmo na presença de citocinas implicadas com a SMD, como IL-1 α e IL-8, ou em co-cultivo com células estromais normais ou malignizadas.
- Células K562, mesmo portadoras da mutação *SF3B1* K700E, não apresentam estruturas citoplasmáticas compatíveis com figuras displásicas observadas na SMD-SA.
- A presença de mutações em genes do spliceossoma induz o aumento de expressão de IL-8 à níveis transcricional e traducional.
- A co-ocorrência de mutações em genes de função epigenética é capaz de induzir diferenciação eritropoética espontaneamente.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDEL-WAHAB, O. et al. Genetic Analysis of Transforming Events That Convert Chronic Myeloproliferative Neoplasms to Leukemias. **Cancer Research**, v. 70, n. 2, p. 447–452, 15 jan. 2010.

ADEMA, V.; BEJAR, R. What lies beyond del(5q) in myelodysplastic syndrome? **Haematologica**, v. 98, n. 12, p. 1819–1821, 1 dez. 2013.

ALEXANDROV, L. B. et al. Signatures of mutational processes in human cancer. **Nature**, v. 500, n. 7463, p. 415–421, ago. 2013.

ALSAFADI, S. et al. Cancer-associated SF3B1 mutations affect alternative splicing by promoting alternative branchpoint usage. **Nature Communications**, v. 7, p. 10615, 4 fev. 2016.

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. 2391–2405, 19 maio 2016.

ARMSTRONG, R. N. et al. Splicing factor mutations in the myelodysplastic syndromes: target genes and therapeutic approaches. **Advances in Biological Regulation**, v. 67, p. 13–29, jan. 2018.

ASADA, N. Regulation of Malignant Hematopoiesis by Bone Marrow Microenvironment. **Frontiers in Oncology**, v. 8, p. 119, 2018.

AVECILLA, S. T. et al. Chemokine-mediated interaction of hematopoietic progenitors with the bone marrow vascular niche is required for thrombopoiesis. **Nature Medicine**, v. 10, n. 1, p. 64–71, jan. 2004.

BASIORKA, A. A. et al. The NLRP3 inflammasome functions as a driver of the myelodysplastic syndrome phenotype. **Blood**, v. 128, n. 25, p. 2960–2975, 22 2016.

BEERMAN, I. et al. Quiescent Hematopoietic Stem Cells Accumulate DNA Damage during Aging that Is Repaired upon Entry into Cell Cycle. **Cell Stem Cell**, v. 15, n. 1, p. 37–50, 3 jul. 2014.

BEJAR, R. et al. TET2 mutations predict response to hypomethylating agents in myelodysplastic syndrome patients. **Blood**, v. 124, n. 17, p. 2705–2712, 23 out. 2014.

BEJAR, R. Splicing Factor Mutations in Cancer. In: **RNA Processing**. Advances in Experimental Medicine and Biology. [s.l.] Springer, Cham, 2016. p. 215–228.

BEJAR, R. CHIP, ICUS, CCUS and other four-letter words. **Leukemia**, v. 31, n. 9, p. 1869–1871, set. 2017.

BEJAR, R.; ABDEL-WAHAB, O. The importance of subclonal genetic events in MDS. **Blood**, v. 122, n. 22, p. 3550–3551, 21 nov. 2013.

BENNETT, J. M. et al. Proposals for the Classification of the Acute Leukaemias French-American-British (FAB) Co-operative Group. **British Journal of Haematology**, v. 33, n. 4, p. 451–458, 1 ago. 1976.

BENNETT, J. M. et al. Proposals for the classification of the myelodysplastic syndromes. **British Journal of Haematology**, v. 51, n. 2, p. 189–199, jun. 1982.

BENNETT, J. M. World Health Organization classification of the acute leukemias and myelodysplastic syndrome. **International Journal of Hematology**, v. 72, n. 2, p. 131–133, ago. 2000.

BHAGAT, T. D. et al. Epigenetically Aberrant Stroma in MDS Propagates Disease via Wnt/ β -Catenin Activation. **Cancer Research**, v. 77, n. 18, p. 4846–4857, 15 2017.

BONNET, D.; DICK, J. E. Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell. **Nature Medicine**, v. 3, n. 7, p. 730–737, jul. 1997.

BOULTWOOD, J. et al. The role of the iron transporter ABCB7 in refractory anemia with ring sideroblasts. **PloS One**, v. 3, n. 4, p. e1970, 9 abr. 2008.

BOYES, J.; BIRD, A. DNA methylation inhibits transcription indirectly via a methyl-CpG binding protein. **Cell**, v. 64, n. 6, p. 1123–1134, 22 mar. 1991.

BUSQUE, L.; GILLILAND, D. X-inactivation analysis in the 1990s: promise and potential problems. **Leukemia**, v. 12, n. 2, p. 128–135, fev. 1998.

CALVI, L. M. et al. Osteoblastic cells regulate the haematopoietic stem cell niche. **Nature**, v. 425, n. 6960, p. 841–846, out. 2003.

CARGO, C. A. et al. Targeted sequencing identifies patients with preclinical MDS at high risk of disease progression. **Blood**, v. 126, n. 21, p. 2362–2365, 19 nov. 2015.

CARMEL, R. Anemia and aging: an overview of clinical, diagnostic and biological issues. **Blood Reviews**, v. 15, n. 1, p. 9–18, mar. 2001.

CAZZOLA, M. Mitochondrial ferritin expression in erythroid cells from patients with sideroblastic anemia. **Blood**, v. 101, n. 5, p. 1996–2000, 1 mar. 2003.

CAZZOLA, M.; INVERNIZZI, R. Ring sideroblasts and sideroblastic anemias. **Haematologica**, v. 96, n. 6, p. 789–792, jun. 2011.

CHAMBERS, S. M.; GOODELL, M. A. Hematopoietic stem cell aging: wrinkles in stem cell potential. **Stem Cell Reviews**, v. 3, n. 3, p. 201–211, 2007.

CHATTERJEE, A.; RODGER, E. J.; ECCLES, M. R. Epigenetic drivers of tumourigenesis and cancer metastasis. **Seminars in Cancer Biology**, 11 ago. 2017.

CHRISTENSEN, J. L.; WEISSMAN, I. L. Flk-2 is a marker in hematopoietic stem cell differentiation: a simple method to isolate long-term stem cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 98, n. 25, p. 14541–14546, 4 dez. 2001.

CHUNG, S. S.; PARK, C. Y. Aging, hematopoiesis, and the myelodysplastic syndromes. **Hematology. American Society of Hematology. Education Program**, v. 2017, n. 1, p. 73–78, 8 dez. 2017.

COGLE, C. R. Incidence and Burden of the Myelodysplastic Syndromes. **Current Hematologic Malignancy Reports**, v. 10, n. 3, p. 272–281, 2015.

COMPSTON, J. E. Bone marrow and bone: a functional unit. **The Journal of Endocrinology**, v. 173, n. 3, p. 387–394, jun. 2002.

CORCES-ZIMMERMAN, M. R. et al. Preleukemic mutations in human acute myeloid leukemia affect epigenetic regulators and persist in remission. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 111, n. 7, p. 2548–2553, 18 fev. 2014.

COREY, S. J. et al. Myelodysplastic syndromes: the complexity of stem-cell diseases. **Nature Reviews Cancer**, v. 7, n. 2, p. 118–129, fev. 2007.

CORTELLINO, S. et al. Thymine DNA Glycosylase Is Essential for Active DNA Demethylation by Linked Deamination-Base Excision Repair. **Cell**, v. 146, n. 1, p. 67–79, 8 jul. 2011.

COUTINHO, Diego Ferreira. Caracterização molecular das síndromes mielodisplásicas da infância: uma abordagem genômica e epigenética. 2015. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação Oncologia, Instituto Nacional do Câncer, Rio de Janeiro-RJ, 2015.

DARMAN, R. B. et al. Cancer-Associated SF3B1 Hotspot Mutations Induce Cryptic 3' Splice Site Selection through Use of a Different Branch Point. **Cell Reports**, v. 13, n. 5, p. 1033–1045, 3 nov. 2015.

DAUBNER, G. M. et al. A syn-anti conformational difference allows SRSF2 to recognize guanines and cytosines equally well. **The EMBO journal**, v. 31, n. 1, p. 162–174, 4 jan. 2012.

DE HAAN, G.; LAZARE, S. S. Aging of hematopoietic stem cells. **Blood**, v. 131, n. 5, p. 479–487, 1 fev. 2018.

DE MATOS, A. G. et al. Interleukin-8 and nuclear factor kappa B are increased and positively correlated in myelodysplastic syndrome. **Medical Oncology (Northwood, London, England)**, v. 34, n. 10, p. 168, 30 ago. 2017.

DE MOOIJ, C. E. M. et al. Targeting the interleukin-1 pathway in patients with hematological disorders. **Blood**, v. 129, n. 24, p. 3155–3164, 15 jun. 2017.

DEL REY, M. et al. Deregulation of genes related to iron and mitochondrial metabolism in refractory anemia with ring sideroblasts. **PloS One**, v. 10, n. 5, p. e0126555, 2015.

DELHOMMEAU, F. et al. Mutation in TET2 in Myeloid Cancers. **New England Journal of Medicine**, v. 360, n. 22, p. 2289–2301, 28 maio 2009.

DOLATSHAD, H. et al. Disruption of SF3B1 results in deregulated expression and splicing of key genes and pathways in myelodysplastic syndrome hematopoietic stem and progenitor cells. **Leukemia**, v. 29, n. 5, p. 1092–1103, maio 2015.

DOLATSHAD, H. et al. Cryptic splicing events in the iron transporter ABCB7 and other key target genes in SF3B1-mutant myelodysplastic syndromes. **Leukemia**, v. 30, n. 12, p. 2322–2331, 2016.

DOULATOV, S. et al. Hematopoiesis: A Human Perspective. **Cell Stem Cell**, v. 10, n. 2, p. 120–136, fev. 2012.

DUARTE, D.; HAWKINS, E. D.; LO CELSO, C. The interplay of leukemia cells and the bone marrow microenvironment. **Blood**, v. 131, n. 14, p. 1507–1511, 5 abr. 2018.

DYBEDAL, I. et al. Tumor necrosis factor (TNF)-mediated activation of the p55 TNF receptor negatively regulates maintenance of cycling reconstituting human hematopoietic stem cells. **Blood**, v. 98, n. 6, p. 1782–1791, 15 set. 2001.

EMA, H.; NAKAUCHI, H. Expansion of hematopoietic stem cells in the developing liver of a mouse embryo. **Blood**, v. 95, n. 7, p. 2284–2288, 1 abr. 2000.

ERGEN, A. V.; BOLES, N. C.; GOODELL, M. A. Rantes/Ccl5 influences hematopoietic stem cell subtypes and causes myeloid skewing. **Blood**, v. 119, n. 11, p. 2500–2509, 15 mar. 2012.

FLACH, J. et al. Replication stress is a potent driver of functional decline in ageing haematopoietic stem cells. **Nature**, v. 512, n. 7513, p. 198–202, 14 ago. 2014.

Fundamentos Em Hematologia - 6ª Ed. 2013. Disponível em: <<https://www.saraiva.com.br/fundamentos-em-hematologia-6-ed-2013-4089855.html>>. Acesso em: 25 abr. 2018.

GENOVESE, G. et al. Clonal Hematopoiesis and Blood-Cancer Risk Inferred from Blood DNA Sequence. **New England Journal of Medicine**, v. 371, n. 26, p. 2477–2487, 25 dez. 2014.

GOLDMAN, J. M.; TH'NG, K. H.; LOWENTHAL, R. M. In vitro colony forming cells and colony stimulating factor in chronic granulocytic leukaemia. **British Journal of Cancer**, v. 30, n. 1, p. 1–12, jul. 1974.

GROVE, C. S.; VASSILIOU, G. S. Acute myeloid leukaemia: a paradigm for the clonal evolution of cancer? **Disease Models & Mechanisms**, v. 7, n. 8, p. 941–951, 1 ago. 2014.

GUO, J. U. et al. Hydroxylation of 5-Methylcytosine by TET1 Promotes Active DNA Demethylation in the Adult Brain. **Cell**, v. 145, n. 3, p. 423–434, 29 abr. 2011.

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

- HAN, Q. et al. SF3B1 Mutation Causes Aberrant Splicing and Downregulation of PPP2R5A in Chronic Lymphocytic Leukemia. **Blood**, v. 130, n. Suppl 1, p. 2477–2477, 7 dez. 2017.
- HANAHAH, D.; WEINBERG, R. A. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. **Cell**, v. 144, n. 5, p. 646–674, mar. 2011.
- HARRISON, D. E.; ASTLE, C. M.; LERNER, C. Number and continuous proliferative pattern of transplanted primitive immunohematopoietic stem cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 85, n. 3, p. 822–826, fev. 1988.
- HE, Y.-F. et al. Tet-Mediated Formation of 5-Carboxylcytosine and Its Excision by TDG in Mammalian DNA. **Science**, v. 333, n. 6047, p. 1303–1307, 2 set. 2011.
- HEUSER, M.; THOL, F.; GANSER, A. Clonal Hematopoiesis of Indeterminate Potential. **Deutsches Arzteblatt International**, 113(18):317-22, 6 May. 2016.
- HITZEROTH, H. W. et al. Tentative evidence for 3–4 haematopoietic stem cells in man. **Human Genetics**, v. 35, n. 2, p. 175–183, 11 fev. 1977.
- HOFFBRAND, A. V.; MOSS, P. A. H. **Essential haematology**. 6. ed., repr ed. Chichester: Wiley-Blackwell, 2012.
- HOLYOAKE, T. L.; VETRIE, D. The chronic myeloid leukemia stem cell: stemming the tide of persistence. **Blood**, v. 129, n. 12, p. 1595–1606, 23 2017.
- HOSONO, N. et al. Recurrent genetic defects on chromosome 5q in myeloid neoplasms. **Oncotarget**, v. 8, n. 4, p. 6483–6495, 24 jan. 2017.
- HSIEH, C.-L. In Vivo Activity of Murine De Novo Methyltransferases, Dnmt3a and Dnmt3b. **Molecular and Cellular Biology**, v. 19, n. 12, p. 8211–8218, 12 jan. 1999.
- HUANG, Y. et al. SF3B1 deficiency impairs human erythropoiesis via activation of p53 pathway: implications for understanding of ineffective erythropoiesis in MDS. **Journal of Hematology & Oncology**, v. 11, n. 1, p. 19, 12 fev. 2018.
- IACOBUZIO-DONAHUE, C. A. et al. Genetic Basis of Pancreas Cancer Development and Progression: Insights from Whole-Exome and Whole-Genome Sequencing. **Clinical Cancer Research**, v. 18, n. 16, p. 4257–4265, 15 ago. 2012.
- INOUE, D.; BRADLEY, R. K.; ABDEL-WAHAB, O. Spliceosomal gene mutations in myelodysplasia: molecular links to clonal abnormalities of hematopoiesis. **Genes & Development**, v. 30, n. 9, p. 989–1001, 1 maio 2016.
- ITO, S. et al. Tet Proteins Can Convert 5-Methylcytosine to 5-Formylcytosine and 5-Carboxylcytosine. **Science**, v. 333, n. 6047, p. 1300–1303, 2 set. 2011.
- ITZYKSON, R. et al. Impact of *TET2* mutations on response rate to azacitidine in myelodysplastic syndromes and low blast count acute myeloid leukemias. **Leukemia**, v. 25, n. 7, p. 1147–1152, jul. 2011.

ITZYKSON, R. et al. Clonal architecture of chronic myelomonocytic leukemias. **Blood**, v. 121, n. 12, p. 2186–2198, 21 mar. 2013.

JACOBS, K. B. et al. Detectable clonal mosaicism and its relationship to aging and cancer. **Nature Genetics**, v. 44, n. 6, p. 651–658, 6 maio 2012.

JACOBSON, L. O. et al. Recovery from radiation injury. **Science (New York, N.Y.)**, v. 113, n. 2940, p. 510–511, 4 maio 1951.

JACOBY, M. A. et al. Subclones dominate at MDS progression following allogeneic hematopoietic cell transplant. **JCI insight**, v. 3, n. 5, 8 mar. 2018.

JAISWAL, S. et al. Age-Related Clonal Hematopoiesis Associated with Adverse Outcomes. **New England Journal of Medicine**, v. 371, n. 26, p. 2488–2498, 25 dez. 2014.

JANSSEN, J. W. et al. RAS gene mutations in acute and chronic myelocytic leukemias, chronic myeloproliferative disorders, and myelodysplastic syndromes. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 84, n. 24, p. 9228–9232, 1 dez. 1987.

JJINGO, D. et al. On the presence and role of human gene-body DNA methylation. **Oncotarget**, v. 3, n. 4, p. 462–474, 9 maio 2012.

JOSHI, P.; HALENE, S.; ABDEL-WAHAB, O. How do messenger RNA splicing alterations drive myelodysplasia? **Blood**, v. 129, n. 18, p. 2465–2470, 4 maio 2017.

KAMEDA, T. et al. Loss of TET2 has dual roles in murine myeloproliferative neoplasms: disease sustainer and disease accelerator. **Blood**, v. 125, n. 2, p. 304–315, 8 jan. 2015.

KANEKO, H. et al. TP53 mutations emerge at early phase of myelodysplastic syndrome and are associated with complex chromosomal abnormalities. **Blood**, v. 85, n. 8, p. 2189–2193, 15 abr. 1995.

KELLER, J. R.; ORTIZ, M.; RUSCETTI, F. W. Steel factor (c-kit ligand) promotes the survival of hematopoietic stem/progenitor cells in the absence of cell division. **Blood**, v. 86, n. 5, p. 1757–1764, 1 set. 1995.

KENT, D. G. et al. Steel factor coordinately regulates the molecular signature and biologic function of hematopoietic stem cells. **Blood**, v. 112, n. 3, p. 560–567, 1 ago. 2008.

KESARWANI, A. K. et al. Cancer-associated SF3B1 mutants recognize otherwise inaccessible cryptic 3' splice sites within RNA secondary structures. **Oncogene**, v. 36, n. 8, p. 1123–1133, 23 fev. 2017.

KIEL, M. J. et al. SLAM family receptors distinguish hematopoietic stem and progenitor cells and reveal endothelial niches for stem cells. **Cell**, v. 121, n. 7, p. 1109–1121, 1 jul. 2005.

KIM, E. et al. SRSF2 Mutations Contribute to Myelodysplasia by Mutant-Specific Effects on Exon Recognition. **Cancer Cell**, v. 27, n. 5, p. 617–630, 11 maio 2015.

- KIM, E.-J.; KIM, N.; CHO, S.-G. The potential use of mesenchymal stem cells in hematopoietic stem cell transplantation. **Experimental & Molecular Medicine**, v. 45, n. 1, p. e2, jan. 2013.
- KIM, S. J. et al. A DNMT3A mutation common in AML exhibits dominant-negative effects in murine ES cells. **Blood**, v. 122, n. 25, p. 4086–4089, 12 dez. 2013.
- KIMURA, S. et al. Hematopoietic stem cell deficiencies in mice lacking c-Mpl, the receptor for thrombopoietin. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 95, n. 3, p. 1195–1200, 3 fev. 1998.
- KITAGAWA, M. et al. Overexpression of tumor necrosis factor (TNF)-alpha and interferon (IFN)-gamma by bone marrow cells from patients with myelodysplastic syndromes. **Leukemia**, v. 11, n. 12, p. 2049–2054, dez. 1997.
- KLAMPFL, T. et al. Genome integrity of myeloproliferative neoplasms in chronic phase and during disease progression. **Blood**, v. 118, n. 1, p. 167–176, 7 jul. 2011.
- KO, M. et al. Ten-Eleven-Translocation 2 (TET2) negatively regulates homeostasis and differentiation of hematopoietic stem cells in mice. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 108, n. 35, p. 14566–14571, 30 ago. 2011.
- KO, M.; RAO, A. TET2: epigenetic safeguard for HSC. **Blood**, v. 118, n. 17, p. 4501–4503, 27 out. 2011.
- KODE, A. et al. Leukaemogenesis induced by an activating β -catenin mutation in osteoblasts. **Nature**, v. 506, n. 7487, p. 240–244, 13 fev. 2014.
- KOEFLER, H. P.; LEONG, G. Preleukemia: one name, many meanings. **Leukemia**, v. 31, n. 3, p. 534–542, mar. 2017.
- KONDO, M. Lymphoid and myeloid lineage commitment in multipotent hematopoietic progenitors: Roles of bone marrow microenvironment. **Immunological Reviews**, v. 238, n. 1, p. 37–46, nov. 2010.
- KORNBLAU, S. M. et al. Recurrent expression signatures of cytokines and chemokines are present and are independently prognostic in acute myelogenous leukemia and myelodysplasia. **Blood**, v. 116, n. 20, p. 4251–4261, 18 nov. 2010.
- KOYA, J. et al. DNMT3A R882 mutants interact with polycomb proteins to block haematopoietic stem and leukaemic cell differentiation. **Nature Communications**, v. 7, p. 10924, 24 mar. 2016.
- KREVVATA, M. et al. Inhibition of leukemia cell engraftment and disease progression in mice by osteoblasts. **Blood**, v. 124, n. 18, p. 2834–2846, 30 out. 2014.
- KRISTIANSEN, M. et al. Twin study of genetic and aging effects on X chromosome inactivation. **European journal of human genetics: EJHG**, v. 13, n. 5, p. 599–606, maio 2005.

KWOK, B. et al. MDS-associated somatic mutations and clonal hematopoiesis are common in idiopathic cytopenias of undetermined significance. **Blood**, v. 126, n. 21, p. 2355–2361, 19 nov. 2015.

LACOUT, C. et al. JAK2V617F expression in murine hematopoietic cells leads to MPD mimicking human PV with secondary myelofibrosis. **Blood**, v. 108, n. 5, p. 1652–1660, 1 set. 2006.

LAMBERT, S. A. et al. The Human Transcription Factors. **Cell**, v. 172, n. 4, p. 650–665, 8 fev. 2018.

LANGLOIS THIERRY et al. TET2 Deficiency Inhibits Mesoderm and Hematopoietic Differentiation in Human Embryonic Stem Cells. **STEM CELLS**, v. 32, n. 8, p. 2084–2097, 11 abr. 2014.

LAPIDOT, T. et al. A cell initiating human acute myeloid leukaemia after transplantation into SCID mice. **Nature**, v. 367, n. 6464, p. 645–648, fev. 1994.

LAPPIN, K. et al. Investigating the Role of SF3B1 Mutations in DNA Damage Repair in Myeloid Malignancies. **Leukemia Research**, v. 55, p. S159–S160, abr. 2017.

LAURIE, C. C. et al. Detectable clonal mosaicism from birth to old age and its relationship to cancer. **Nature Genetics**, v. 44, n. 6, p. 642–650, 6 maio 2012.

LEY, T. J. et al. **DNMT3A Mutations in Acute Myeloid Leukemia**. research-article. Disponível em: <https://www.nejm.org/doi/10.1056/NEJMoa1005143?url_ver=Z39.88-2003&rfr_id=ori%3Arid%3Acrossref.org&rfr_dat=cr_pub%3Dwww.ncbi.nlm.nih.gov>. Acesso em: 8 maio. 2018.

LI, J. et al. JAK2 V617F impairs hematopoietic stem cell function in a conditional knock-in mouse model of JAK2 V617F-positive essential thrombocythemia. **Blood**, v. 116, n. 9, p. 1528–1538, 2 set. 2010.

LIN, M.-E. et al. Dynamics of DNMT3A mutation and prognostic relevance in patients with primary myelodysplastic syndrome. **Clinical Epigenetics**, v. 10, p. 42, 2 abr. 2018.

LOGAN, P. C.; MITCHELL, M. D.; LOBIE, P. E. DNA methyltransferases and TETs in the regulation of differentiation and invasiveness of extra-villous trophoblasts. **Frontiers in Genetics**, v. 4, 4 dez. 2013.

LORENZ, E. et al. Modification of irradiation injury in mice and guinea pigs by bone marrow injections. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 12, n. 1, p. 197–201, ago. 1951.

MADZO, J. et al. Hydroxymethylation at gene regulatory regions directs stem/early progenitor cell commitment during erythropoiesis. **Cell Reports**, v. 6, n. 1, p. 231–244, 16 jan. 2014.

MAJETI, R. Clonal Evolution of Pre-Leukemic Hematopoietic Stem Cells in Human Acute Myeloid Leukemia. **Blood**, v. 126, n. 23, p. SCI-11-SCI-11, 3 dez. 2015.

- MALCOVATI, L. et al. Clinical significance of SF3B1 mutations in myelodysplastic syndromes and myelodysplastic/myeloproliferative neoplasms. **Blood**, v. 118, n. 24, p. 6239–6246, 8 dez. 2011.
- MALCOVATI, L. et al. SF3B1 mutation identifies a distinct subset of myelodysplastic syndrome with ring sideroblasts. **Blood**, v. 126, n. 2, p. 233–241, 9 jul. 2015.
- MALCOVATI, L. et al. Clinical significance of somatic mutation in unexplained blood cytopenia. **Blood**, p. blood-2017-01-763425, 19 abr. 2017.
- MANZ, M. G. et al. Dendritic cell development from common myeloid progenitors. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 938, p. 167–173; discussion 173–174, jun. 2001a.
- MANZ, M. G. et al. Dendritic cell potentials of early lymphoid and myeloid progenitors. **Blood**, v. 97, n. 11, p. 3333–3341, 1 jun. 2001b.
- MARKOWITZ, S. D.; BERTAGNOLLI, M. M. Molecular Basis of Colorectal Cancer. **New England Journal of Medicine**, v. 361, n. 25, p. 2449–2460, 17 dez. 2009.
- MARTÍNEZ-LOSADA, C. et al. Clonal genetic evolution at relapse of favorable-risk acute myeloid leukemia with NPM1 mutation is associated with phenotypic changes and worse outcomes. **Haematologica**, 5 abr. 2018.
- MARTY, C. et al. Myeloproliferative neoplasm induced by constitutive expression of JAK2V617F in knock-in mice. **Blood**, v. 116, n. 5, p. 783–787, 5 ago. 2010.
- MATSUNAWA, M. et al. Haploinsufficiency of Sf3b1 leads to compromised stem cell function but not to myelodysplasia. **Leukemia**, v. 28, n. 9, p. 1844–1850, set. 2014.
- MCLAUGHLIN, J.; CHIANESE, E.; WITTE, O. N. In vitro transformation of immature hematopoietic cells by the P210 BCR/ABL oncogene product of the Philadelphia chromosome. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 84, n. 18, p. 6558–6562, set. 1987.
- MEDVINSKY, A.; DZIERZAK, E. Definitive hematopoiesis is autonomously initiated by the AGM region. **Cell**, v. 86, n. 6, p. 897–906, 20 set. 1996.
- MEGGENDORFER, M. et al. SRSF2 mutations in 275 cases with chronic myelomonocytic leukemia (CMML). **Blood**, v. 120, n. 15, p. 3080–3088, 11 out. 2012.
- METCALF, D.; MOORE, M. A.; WARNER, N. L. Colony formation in vitro by myelomonocytic leukemic cells. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 43, n. 4, p. 983–1001, out. 1969.
- MIRANDA, G. M. D.; MENDES, A. DA C. G.; SILVA, A. L. A. DA. Population aging in Brazil: current and future social challenges and consequences. **Revista Brasileira de Geriatria e Gerontologia**, v. 19, n. 3, p. 507–519, jun. 2016.
- MÖHLE, R.; KANZ, L. Hematopoietic growth factors for hematopoietic stem cell mobilization and expansion. **Seminars in Hematology**, v. 44, n. 3, p. 193–202, jul. 2007.

- MONTAGNER, S.; DEHÓ, L.; MONTICELLI, S. MicroRNAs in hematopoietic development. **BMC Immunology**, v. 15, p. 14, 31 mar. 2014.
- MORAN-CRUSIO, K. et al. Tet2 Loss Leads to Increased Hematopoietic Stem Cell Self-Renewal and Myeloid Transformation. **Cancer Cell**, v. 20, n. 1, p. 11–24, 12 jul. 2011.
- MORRISON, S. J. et al. Identification of a lineage of multipotent hematopoietic progenitors. **Development (Cambridge, England)**, v. 124, n. 10, p. 1929–1939, maio 1997.
- MORRISON, S. J.; UCHIDA, N.; WEISSMAN, I. L. The biology of hematopoietic stem cells. **Annual Review of Cell and Developmental Biology**, v. 11, p. 35–71, 1995.
- MORRISON, S. J.; WEISSMAN, I. L. The long-term repopulating subset of hematopoietic stem cells is deterministic and isolatable by phenotype. **Immunity**, v. 1, n. 8, p. 661–673, nov. 1994.
- MÜLLER, A. M. et al. Development of hematopoietic stem cell activity in the mouse embryo. **Immunity**, v. 1, n. 4, p. 291–301, jul. 1994.
- MUPO, A. et al. Hemopoietic-specific Sf3b1-K700E knock-in mice display the splicing defect seen in human MDS but develop anemia without ring sideroblasts. **Leukemia**, v. 31, n. 3, p. 720–727, mar. 2017.
- MURONE, M.; CARPENTER, D. A.; DE SAUVAGE, F. J. Hematopoietic deficiencies in c-mpl and TPO knockout mice. **Stem Cells (Dayton, Ohio)**, v. 16, n. 1, p. 1–6, 1998.
- OBENG, E. A. et al. Physiologic Expression of Sf3b1(K700E) Causes Impaired Erythropoiesis, Aberrant Splicing, and Sensitivity to Therapeutic Spliceosome Modulation. **Cancer Cell**, v. 30, n. 3, p. 404–417, 12 2016.
- OLIVEIRA, F. M. DE et al. FISH analysis for <Emphasis Type="Italic">TET2</Emphasis> deletion in a cohort of 362 Brazilian myeloid malignancies: correlation with karyotype abnormalities. **Medical Oncology**, v. 30, n. 1, p. 483, 1 mar. 2013.
- ORKIN, S. H.; ZON, L. I. Hematopoiesis: An Evolving Paradigm for Stem Cell Biology. **Cell**, v. 132, n. 4, p. 631–644, 22 fev. 2008.
- PANG, W. W. et al. Human bone marrow hematopoietic stem cells are increased in frequency and myeloid-biased with age. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 108, n. 50, p. 20012–20017, 13 dez. 2011.
- PAPAEMMANUIL, E. et al. Somatic *SF3B1* Mutation in Myelodysplasia with Ring Sideroblasts. **New England Journal of Medicine**, v. 365, n. 15, p. 1384–1395, 13 out. 2011.
- PAPAEMMANUIL, E. et al. Clinical and biological implications of driver mutations in myelodysplastic syndromes. **Blood**, v. 122, n. 22, p. 3616–3627, 21 nov. 2013.

PAPAEMMANUIL, E. et al. Genomic Classification and Prognosis in Acute Myeloid Leukemia. **New England Journal of Medicine**, v. 374, n. 23, p. 2209–2221, 9 jun. 2016.

PARK, C. Y. Hematopoiesis in aging: Current concepts and challenges. **Seminars in Hematology**, v. 54, n. 1, p. 1–3, jan. 2017.

PATEL, U. et al. Diagnostic, Prognostic, and Predictive Utility of Recurrent Somatic Mutations in Myeloid Neoplasms. **Clinical Lymphoma Myeloma and Leukemia**, Proceedings of the Society of Hematologic Oncology 2016 Annual Meeting. v. 17, p. S62–S74, 1 jul. 2017.

PELLAGATTI, A. et al. Gene expression profiles of CD34+ cells in myelodysplastic syndromes: involvement of interferon-stimulated genes and correlation to FAB subtype and karyotype. **Blood**, v. 108, n. 1, p. 337–345, 1 jul. 2006.

PENDERGAST, A. M. et al. BCR-ABL-induced oncogenesis is mediated by direct interaction with the SH2 domain of the GRB-2 adaptor protein. **Cell**, v. 75, n. 1, p. 175–185, 8 out. 1993.

PETZER, A. L. et al. Characterization of primitive subpopulations of normal and leukemic cells present in the blood of patients with newly diagnosed as well as established chronic myeloid leukemia. **Blood**, v. 88, n. 6, p. 2162–2171, 15 set. 1996.

PRONIER, 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. 2551–2555, 1 set. 2011.

PUIL, L. et al. Bcr-Abl oncoproteins bind directly to activators of the Ras signalling pathway. **The EMBO journal**, v. 13, n. 4, p. 764–773, 15 fev. 1994.

QUESADA, V. et al. Exome sequencing identifies recurrent mutations of the splicing factor SF3B1 gene in chronic lymphocytic leukemia. **Nature Genetics**, v. 44, n. 1, p. 47–52, 11 dez. 2011.

RAD, A. **This diagram shows the hematopoiesis as it occurs in humans.**, 11 ago. 2006. Disponível em: <[https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Hematopoiesis_\(human\)_diagram.png](https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Hematopoiesis_(human)_diagram.png)>. Acesso em: 9 maio. 2018

RAZA, A. et al. Simultaneous assessment of cell kinetics and programmed cell death in bone marrow biopsies of myelodysplastics reveals extensive apoptosis as the probable basis for ineffective hematopoiesis. **American Journal of Hematology**, v. 48, n. 3, p. 143–154, mar. 1995a.

RAZA, A. et al. Apoptosis in bone marrow biopsy samples involving stromal and hematopoietic cells in 50 patients with myelodysplastic syndromes. **Blood**, v. 86, n. 1, p. 268–276, 1 jul. 1995b.

RAZA, A. et al. Novel insights into the biology of myelodysplastic syndromes: excessive apoptosis and the role of cytokines. **International Journal of Hematology**, v. 63, n. 4, p. 265–278, jun. 1996.

REUTER, S. et al. Effect of curcumin on nuclear factor kappaB signaling pathways in human chronic myelogenous K562 leukemia cells. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1171, p. 436–447, ago. 2009.

RISQUES, R. A.; KENNEDY, S. R. Aging and the rise of somatic cancer-associated mutations in normal tissues. **PLOS Genetics**, v. 14, n. 1, p. e1007108, 4 jan. 2018.

ROSSI, D. et al. Mutations of the SF3B1 splicing factor in chronic lymphocytic leukemia: association with progression and fludarabine-refractoriness. **Blood**, v. 118, n. 26, p. 6904–6908, 22 dez. 2011.

ROSSI, D. J. et al. Cell intrinsic alterations underlie hematopoietic stem cell aging. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 102, n. 26, p. 9194–9199, 28 jun. 2005.

ROWLEY, J. D.; BEAU, M. M. L.; RABBITS, T. H. **Chromosomal Translocations and Genome Rearrangements in Cancer**. [s.l.] Springer, 2015.

RUSSLER-GERMAIN, D. A. et al. The R882H DNMT3A Mutation Associated with AML Dominantly Inhibits Wild-Type DNMT3A by Blocking Its Ability to Form Active Tetramers. **Cancer Cell**, v. 25, n. 4, p. 442–454, 14 abr. 2014.

SÁNCHEZ-GARCÍA, I.; GRÜTZ, G. Tumorigenic activity of the BCR-ABL oncogenes is mediated by BCL2. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 92, n. 12, p. 5287–5291, 6 jun. 1995.

SATO, S. et al. Clonal dynamics in a case of acute monoblastic leukemia that later developed myeloproliferative neoplasm. **International Journal of Hematology**, 7 fev. 2018.

SAVAGE, K. I. et al. Identification of a BRCA1-mRNA Splicing Complex Required for Efficient DNA Repair and Maintenance of Genomic Stability. **Molecular Cell**, v. 54, n. 3, p. 445–459, maio 2014.

SCHANZ, J. et al. Detailed analysis of clonal evolution and cytogenetic evolution patterns in patients with myelodysplastic syndromes (MDS) and related myeloid disorders. **Blood Cancer Journal**, v. 8, n. 3, p. 28, 07 2018.

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. 2003–2007, 11 mar. 2010.

SCHINKE, C. et al. IL8-CXCR2 pathway inhibition as a therapeutic strategy against MDS and AML stem cells. **Blood**, v. 125, n. 20, p. 3144–3152, 14 maio 2015.

SEITA, J.; WEISSMAN, I. L. Hematopoietic stem cell: self-renewal versus differentiation. **Wiley Interdisciplinary Reviews. Systems Biology and Medicine**, v. 2, n. 6, p. 640–653, dez. 2010.

- SHIH, A. H. et al. The role of mutations in epigenetic regulators in myeloid malignancies. **Nature Reviews Cancer**, v. 12, n. 9, p. 599–612, set. 2012.
- SINGH, B.; EYRAS, E. The role of alternative splicing in cancer. **Transcription**, v. 8, n. 2, p. 91–98, 22 dez. 2016.
- SLAYMAKER, I. M. et al. Rationally engineered Cas9 nucleases with improved specificity. **Science (New York, N.Y.)**, v. 351, n. 6268, p. 84–88, 1 jan. 2016.
- SMITH, B. D. et al. Future of Cancer Incidence in the United States: Burdens Upon an Aging, Changing Nation. **Journal of Clinical Oncology**, v. 27, n. 17, p. 2758–2765, 10 jun. 2009.
- SOO, J. K. et al. Malignancy without immortality? Cellular immortalization as a possible late event in melanoma progression. **Pigment Cell & Melanoma Research**, v. 24, n. 3, p. 490–503, jun. 2011.
- SPENCER, D. H. et al. CpG Island Hypermethylation Mediated by DNMT3A Is a Consequence of AML Progression. **Cell**, v. 168, n. 5, p. 801–816.e13, 23 fev. 2017.
- SPERLING, A. S.; GIBSON, C. J.; EBERT, B. L. The genetics of myelodysplastic syndrome: from clonal haematopoiesis to secondary leukaemia. **Nature Reviews Cancer**, v. 17, n. 1, p. 5–19, jan. 2017.
- SRIVASTAVA, M. D.; SRIVASTAVA, R.; SRIVASTAVA, B. I. Constitutive production of interleukin-8 (IL-8) by normal and malignant human B-cells and other cell types. **Leukemia Research**, v. 17, n. 12, p. 1063–1069, dez. 1993.
- STEENSMA, D. P. et al. Clonal hematopoiesis of indeterminate potential and its distinction from myelodysplastic syndromes. **Blood**, v. 126, n. 1, p. 9–16, 2 jul. 2015.
- STEWART, M. J. et al. Role for E2F1 in p210 BCR-ABL downstream regulation of c-myc transcription initiation. Studies in murine myeloid cells. **Leukemia**, v. 9, n. 9, p. 1499–1507, set. 1995.
- SUGIYAMA, T. et al. Maintenance of the hematopoietic stem cell pool by CXCL12-CXCR4 chemokine signaling in bone marrow stromal cell niches. **Immunity**, v. 25, n. 6, p. 977–988, dez. 2006.
- SUN, D. et al. Epigenomic profiling of young and aged HSCs reveals concerted changes during aging that reinforce self-renewal. **Cell Stem Cell**, v. 14, n. 5, p. 673–688, 1 maio 2014.
- SUN, Y. et al. Signaling pathway of MAPK/ERK in cell proliferation, differentiation, migration, senescence and apoptosis. **Journal of Receptor and Signal Transduction Research**, v. 35, n. 6, p. 600–604, 2015.
- TAKESHIMA, H. et al. Distinct DNA Methylation Activity of Dnmt3a and Dnmt3b towards Naked and Nucleosomal DNA. **The Journal of Biochemistry**, v. 139, n. 3, p. 503–515, 1 mar. 2006.

- TE RAA, G. D. et al. The impact of SF3B1 mutations in CLL on the DNA-damage response. **Leukemia**, v. 29, n. 5, p. 1133–1142, maio 2015.
- TEHRANCHI, R. et al. Persistent malignant stem cells in del(5q) myelodysplasia in remission. **The New England Journal of Medicine**, v. 363, n. 11, p. 1025–1037, 9 set. 2010.
- TERUI, Y. et al. Identification of a novel apoptosis-inducing factor derived from leukemic cells: endothelial interleukin-8, but not monocyte-derived, induces apoptosis in leukemic cells. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 243, n. 2, p. 407–411, 13 fev. 1998.
- TOWNSLEY, D. M.; DUMITRIU, B.; YOUNG, N. S. Bone marrow failure and the telomeropathies. **Blood**, v. 124, n. 18, p. 2775–2783, 30 out. 2014.
- TRAINA, F. et al. Impact of molecular mutations on treatment response to DNMT inhibitors in myelodysplasia and related neoplasms. **Leukemia**, v. 28, n. 1, p. 78–87, jan. 2014.
- TRAVER, D. et al. Development of CD8alpha-positive dendritic cells from a common myeloid progenitor. **Science (New York, N.Y.)**, v. 290, n. 5499, p. 2152–2154, 15 dez. 2000.
- TRAVLOS, G. S. Normal Structure, Function, and Histology of the Bone Marrow. **Toxicologic Pathology**, v. 34, n. 5, p. 548–565, ago. 2006.
- VALENT, P. et al. Idiopathic cytopenia of undetermined significance (ICUS) and idiopathic dysplasia of uncertain significance (IDUS), and their distinction from low risk MDS. **Leukemia Research**, v. 36, n. 1, p. 1–5, jan. 2012.
- VIGUIÉ, F. et al. Common 4q24 deletion in four cases of hematopoietic malignancy: early stem cell involvement? **Leukemia**, v. 19, n. 8, p. 1411–1415, ago. 2005.
- VISCONTE, V. et al. SF3B1 haploinsufficiency leads to formation of ring sideroblasts in myelodysplastic syndromes. **Blood**, v. 120, n. 16, p. 3173–3186, 18 out. 2012.
- VOGELSTEIN, B. et al. Cancer Genome Landscapes. **Science**, v. 339, n. 6127, p. 1546–1558, 29 mar. 2013.
- WAHL, M. C.; LÜHRMANN, R. SnapShot: Spliceosome Dynamics II. **Cell**, v. 162, n. 2, p. 456- 456.e1, 16 jul. 2015.
- WALTER, M. J. et al. Recurrent *DNMT3A* mutations in patients with myelodysplastic syndromes. **Leukemia**, v. 25, n. 7, p. 1153–1158, jul. 2011.
- WALTER, M. J. et al. Clonal architecture of secondary acute myeloid leukemia. **The New England Journal of Medicine**, v. 366, n. 12, p. 1090–1098, 22 mar. 2012.
- WANG, C. et al. Depletion of Sf3b1 impairs proliferative capacity of hematopoietic stem cells but is not sufficient to induce myelodysplasia. **Blood**, v. 123, n. 21, p. 3336–3343, 22 maio 2014.

WANG, L. et al. Transcriptomic Characterization of SF3B1 Mutation Reveals Its Pleiotropic Effects in Chronic Lymphocytic Leukemia. **Cancer Cell**, v. 30, n. 5, p. 750–763, 14 nov. 2016.

WISEMAN, D. H.; GREYSTOKE, B. F.; SOMERVILLE, T. C. P. The variety of leukemic stem cells in myeloid malignancy. **Oncogene**, v. 33, n. 24, p. 3091–3098, jun. 2014.

WOLL, P. S. et al. Myelodysplastic syndromes are propagated by rare and distinct human cancer stem cells in vivo. **Cancer Cell**, v. 25, n. 6, p. 794–808, 16 jun. 2014.

XIE, M. et al. Age-related mutations associated with clonal hematopoietic expansion and malignancies. **Nature Medicine**, v. 20, n. 12, p. 1472–1478, dez. 2014.

YAN, H. et al. Distinct roles for TET family proteins in regulating human erythropoiesis. **Blood**, v. 129, n. 14, p. 2002–2012, 06 2017.

YANG, L. et al. Identification of Lin(-)Sca1(+)kit(+)CD34(+)Flt3- short-term hematopoietic stem cells capable of rapidly reconstituting and rescuing myeloablated transplant recipients. **Blood**, v. 105, n. 7, p. 2717–2723, 1 abr. 2005.

YOSHIDA, K. et al. Frequent pathway mutations of splicing machinery in myelodysplasia. **Nature**, v. 478, n. 7367, p. 64–69, out. 2011.

YOSHIHARA, H. et al. Thrombopoietin/MPL signaling regulates hematopoietic stem cell quiescence and interaction with the osteoblastic niche. **Cell Stem Cell**, v. 1, n. 6, p. 685–697, 13 dez. 2007.

YU, N.-K.; BAEK, S. H.; KAANG, B.-K. DNA methylation-mediated control of learning and memory. **Molecular Brain**, v. 4, p. 5, 19 jan. 2011.

ZHANG, J. et al. Disease-associated mutation in SRSF2 misregulates splicing by altering RNA-binding affinities. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 112, n. 34, p. E4726-4734, 25 ago. 2015.

ZINK, F. et al. Clonal hematopoiesis, with and without candidate driver mutations, is common in the elderly. **Blood**, v. 130, n. 6, p. 742–752, 10 ago. 2017.