



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

**INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER
Pós-Graduação em Oncologia**

MARÍA LAURA ROBLEDO

**METILAÇÃO E EXPRESSÃO DE GENES *HOXA* NA
MIELOFIBROSE PRIMÁRIA**

Orientadores:

Prof.^a Dr.^a Bárbara da Costa Reis Monte-Mór
Prof. Dr. Martín Hernán Bonamino

**RIO DE JANEIRO
2019**



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

**INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER
Pós-Graduação em Oncologia**

MARÍA LAURA ROBLEDO

**METILAÇÃO E EXPRESSÃO DE GENES *HOXA* NA
MIELOFIBROSE PRIMÁRIA**

Dissertação apresentada ao Instituto Nacional de
Câncer como parte dos requisitos para obtenção do
título de Mestre em Oncologia

Orientadora:

Prof.^a Dr.^a Bárbara da Costa Reis Monte-Mór
Prof. Dr. Martín Hernán Bonamino

**RIO DE JANEIRO
2019**

**FICHA CATALOGRÁFICA SERÁ ELABORADA PELA BIBLIOTECA DO
INCA PARA A VERSÃO FINAL DA TESE**

(A ser impressa no verso da primeira folha de rosto)

**INDICAR APENAS AS PALAVRAS-CHAVE NA VERSÃO APRESENTADA
PARA A DEFESA PÚBLICA DA TESE**

Palavras-chave: 1. Mielofibrose Primaria 2. Genes *HOXA*. 3. Metilação . 4. Expressã
genica.



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

**INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER
Pós-Graduação em Oncologia**

MARÍA LAURA ROBLEDO

**METILAÇÃO E EXPRESSÃO DE GENES *HOXA* NA MIELOFIBROSE
PRIMÁRIA**

ORIENTADORES: Prof.^a Dr.^a Bárbara da Costa Reis Monte-Mór
Prof. Dr. Martín Hernán Bonamino

Aprovada em: ____ / ____ / ____

EXAMINADORES:

Prof.^a Dr.^a Eliana Saul Furquim Werneck Abdelhay - **Presidente**

Prof.^a Dr.^a Sheila Coelho Soares Lima

Prof. Dr. Zilton Farias Meira de Vasconcelos - FIOCRUZ

Prof.^a Dr.^a Renata Binato Gomes - Suplente I

Prof.^a Dr.^a Jackline de Paula Ayres da Silva / FIOCRUZ – Suplente II

**RIO DE JANEIRO
2019**

DEDICATÓRIA

AGRADECIMENTOS

ΕΠΙΓΡΑΦΕ



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

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER

**METILAÇÃO E EXPRESSÃO DE GENES *HOXA*
NA MIELOFIBROSE PRIMÁRIA**

RESUMO

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

María Laura Robledo

**METILAÇÃO E EXPRESSÃO DE GENES *HOXA* NA MIELOFIBROSE
PRIMÁRIA**

Mielofibrose primária (MFP) é uma neoplasia mieloproliferativa originária de uma célula tronco hematopoética que apresenta mutação somática no gene *JAK2*, *CALR* ou *MPL*, o que leva à ativação constitutiva da via JAK / STAT. Outras mutações somáticas co-ocorrem principalmente em genes envolvidos na regulação epigenética, como *TET2* e *ASXL1*. *ASXL1* pertence ao grupo de genes *ETP* (Enhancer of trithorax e Polycomb), que codificam proteínas necessárias para a manutenção da ativação e da repressão de genes alvo tais como os genes *HOX*. O objetivo deste estudo foi analisar o estado de metilação e expressão gênica de genes *HOXA* na MFP. Para isso, foram avaliados diferentes contextos biológicos: linhagens de células tronco de pluripotência induzida (iPSC) e corpos embriões (EB) derivados *in vitro*; células tronco hematopoéticas (CTH) e granulócitos (GR) derivados *in vitro*; e granulócitos primários de sangue periférico. O estado de metilação foi estudado por sequenciamento direto após conversão do DNA com bissulfato de sódio seguido de reação em cadeia da polimerase (PCR). Já a expressão gênica foi quantificada por qRT-PCR usando o intercalante de DNA SYBR Green. No estudo das células embrionárias, observamos que nas iPSC, tanto derivadas de MFP quanto CNT, as regiões analisadas em *HOXA6* e

HOXA9 estavam parcialmente metiladas, enquanto *HOXA 10, 11 e 13* estavam desmetiladas. Ao longo da diferenciação de iPSC para EBs houve uma diminuição da metilação de *HOXA6* em células CNT, mas não em MFP. A maioria dos sítios CpG avaliados para *HOXA9* estavam desmetilados nos EBs. Com relação à expressão gênica, *HOXA6* pareceu estar mais expresso nas iPSC-MFP, quando comparado às iPSC-CNT, enquanto *HOXA9* pareceu estar mais expresso nos EBs-MFP, quando comparado aos EBs-CNT. Em seguida, na análise da hematopoese, verificamos que *HOXA6* apresentou-se parcialmente metilado nas CTH-CNT e desmetilado nas CTH-MFP. No entanto, ao fim da diferenciação in vitro, essa região estava parcialmente metilada tanto nos granulócitos CNT quanto nos MFP. Finalmente, avaliamos a metilação de *HOXA* em granulócitos primários de pacientes MFP, portadores de *ASXL1* selvagem ou mutado. Os genes *HOXA 7-13* estavam desmetilados e *HOXA6* foi o único a apresentar CpGs parcialmente metiladas. Não foram encontradas diferenças significativas na expressão gênica de *HOXA6-13* ou *ASXL1*, quando comparados granulócitos primários de pacientes *ASXL1WT* ou *ASXL1mut*. Assim, os resultados obtidos nesse trabalho permitiram a identificação de algumas diferenças na metilação de *HOXA* entre células derivadas de MFP e CNT, concordantes com o observado em estudos que detectaram sítios CpG diferencialmente metilados nos granulócitos primários e CTH de pacientes MFP *ASXL1* mutado ou selvagem quando comparados com granulócitos e CTH CNT. Indicando que dentro de cada tipo de célula individual, diferentes padrões de metilação do DNA, que possam ter uma contribuição específica para a patogênese da doença. Em outro estudo com CTH humanas portadoras de mutações de perda de função em *ASXL1* observou-se um aumento de expressão de genes associados a leucemogênese como os *HOXA5-9*. Futuramente, os achados desse trabalho deverão ser verificados em outros modelos, para avaliação do possível efeito das mutações em *ASXL1* no estado epigenético de *HOXA*.



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

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER

**METHOD AND EXPRESSION OF HOXA GENES
IN PRIMARY MYELOFIBROSIS**

ABSTRACT

MASTERS DISSERTATION

María Laura Robledo

Primary myelofibrosis (MFP) is a myeloproliferative neoplasm originating from a hematopoietic stem cell that has somatic mutations in the JAK2, CALR or MPL gene, which leads to constitutive activation of the JAK / STAT pathway. Other somatic mutations co-occur mainly in genes involved in epigenetic regulation, such as TET2 and ASXL1. ASXL1 belongs to the ETP (Enhancer of trithorax and Polycomb) gene group, which encode proteins required to maintain activation and repression of target genes such as HOX genes. The aim of this study was to analyze the methylation status and gene expression of HOXA genes in MFP. For this, different biological contexts were evaluated: induced pluripotency stem cell lines (iPSC) and in vitro derived embryoid bodies (EB); hematopoietic stem cells (CTH) and granulocytes (GR) derived in vitro; and primary granulocytes of peripheral blood. Methylation status was studied by direct sequencing after conversion of DNA with sodium bisulfite followed by polymerase chain reaction (PCR). Gene expression was quantified by qRT-PCR using the SYBR Green DNA intercalator. In the study of embryonic cells, we observed that in both MFP and CNT derived iPSCs, the regions analyzed in HOXA6 and HOXA9 were partially methylated, while HOXA 10, 11 and 13 were demethylated. Through differentiation of iPSC to EBs there was a decrease in HOXA6 methylation in CNT cells, but not in MFP. Most CpG sites evaluated for HOXA9 were demethylated in EBs. Regarding gene expression, HOXA6 appeared to be more expressed in iPSC-MFP when compared to iPSC-CNT, while HOXA9 appeared to be more expressed in EBs-MFP when compared

to EBs-CNT. After analysis of hematopoiesis, we found that HOXA6 was partially methylated in CTH-CNT and demethylated in CTH-MFP. However, at the end of in vitro differentiation, this region was partially methylated in both CNT and MFP granulocytes. Finally, we evaluated HOXA methylation in primary granulocytes of MFP patients with wild or mutated ASXL1. The HOXA 7-13 genes were demethylated and HOXA6 was the only one to have partially methylated CpGs. No significant differences were found in HOXA6-13 or ASXL1 gene expression when comparing primary granulocytes from ASXL1WT or ASXL1mut patients. The results obtained in this work allowed the identification of some differences in HOXA methylation between MFP and CNT-derived cells, which is in agreement with studies that detected differentially methylated CpG sites in the primary and CTH granulocytes of mutated or wild MFP ASXL1 patients when compared to those found in other studies. granulocytes and CTH CNT. Indicating that within each individual cell type, different DNA methylation patterns may have a specific contribution to the pathogenesis of the disease. In another study with human CTH carriers of ASXL1 loss of function mutations, increased expression of leukemogenesis-associated genes such as HOXA5-9 was observed. In the future, the findings of this work should be verified in other models to evaluate the possible effect of mutations in ASXL1 on the epigenetic state of HOXA.

ÍNDICE DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 Distribuição das mutações <i>driver</i> nas neoplasias mieloproliferativas.	5
Figura 2: Papel do megacariócito no microambiente medular na mielofibrose primária.	7
Figura 3: Número e tipo de mutação impactam no fenótipo da mielofibrose primária.	9
Figura 4: Visão geral da metilação do DNA.....	10
Figura 5: Visão geral do remodelamento de cromatina.....	12
Figura 6: Estrutura do gene e proteína ASXL1.	13
Figura 7: Estrutura dos complexos de genes homeóticos HOX na mosca da fruta <i>Drosophila melanogaster</i> e em humanos. o na mosca da fruta.	15
Figura 8: Esquema de diferenciação celular <i>in vitro</i>	21
Figura 9: Ensaio de formação de corpos embrioides a partir de iPSC. (direita).....	30
Figura 10: Localização genômica da região analisada para HOXA6.	31
Figura 11: Padronização de PCR para análise de metilacao HOXA6.....	32
Figura 12: Análise qualitativa de metilação de DNA.	33
Figura 13: Resultados do sequenciamento de DNA por bissulfito de sodio para os genes HOXA 6, 7 e 9 nos diferentes dias da obtenção de Ebs. O.....	34
Figura 14: Padronização da reações de qRT-PCR para o gene HOXA?? ??	35
Figura 15: Seleção do gene de referência para quantificação relativa de expressão gênica por qRT-PCR.....	36
Figura 16: Expressão genica de HOXA6 e HOXA9 na diferenciação <i>in vitro</i> de iPSC a corpos embrioides (EBs).....	36
Figura 17: Imunofenotipagem após enriquecimento em células tronco/progenitores hematopoéticos (CTH).	37
Figura 18: Localização das populações no marcador CD45-FITC.....	38
Figura 19: Imunofenotipagem ao longo da diferenciação granulocítica.....	39
Figura 20: XXXX.....	40
Figura 21: XXXX.....	41
Figura 22: Metilação do DNA em região promotora de HOXA em CTH e durante a diferenciação granulocítica <i>in vitro</i>	42
Figura 23: XXXXX.....	43
Figura 24: Expressão gênica de HOXA durante a diferenciação granulocítica <i>in vitro</i>	44
Figura 25: Resultados do sequenciamento de DNA por bissulfito de sodio para os genes HOXA 6, 7,9,10, 11 e 13 em amostras primarias de pacientes com MF selecionados para o estudo.....	47
Figura 26: Expressão gênica relativa de ASXL1 em amostras primarias.	49
Figura 27: Expressão gênica relativa de HOXA6,7,9,10,11e 13 em amostras primárias (N =25)..	50
Figura 28: tomado de He Hua Yang. 2011.....	54

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1: Classificação da Organização Mundial de Saúde para as neoplasias mieloproliferativas. Adaptada de Arber et al., 2016.	1
Tabela 2: Critérios para o diagnóstico de mielofibrose primária, estágio fibrótico evidente, segundo a Organização Mundial de Saúde. Adaptada de Arber et al., 2016.	2
Tabela 3: Anticorpos monoclonais utilizados no estudo imunofenotípico.	22
Tabela 4: Sequência dos primers utilizados para avaliação do status de metilação dos promotores de genes de interesse nas amostras biológicas.	26
Tabela 5: XXXXXX	28
Tabela 6: Mutações encontradas na coorte de pacientes.	45
Tabela 7: tabela com dados clínicos	46

LISTA DE SIGLAS

CALR	Célula tronco calreticulina
CTH	Célula tronco hematopoética
OMS	Organização Mundial de Saúde
PV	Policitemia vera
TE	Trombocitemia essencial
LMA	Leucemia mieloide aguda
SMD	Síndrome mielodisplásica

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO.....	1
1. Mielofibrose primária (MFP)	1
1. Mielofibrose primária (MFP)	1
3. Regulação epigenética na MFP: metilação do DNA	9
4. Regulação epigenética na MFP: remodelamento de cromatina e ASXL1	11
5. Função de ASXL1: lições de <i>Drosophila</i>	14
6. Função de ASXL1: mecanismo molecular e fisiopatológico.....	16
3. Regulação epigenética na MFP: metilação do DNA	9
3. Regulação epigenética na MFP: metilação do DNA	9
3. Regulação epigenética na MFP: metilação do DNA	9
JUSTIFICATIVA	18
OBJETIVO DO ESTUDO.....	19
METODOLOGIA.....	19
1. Pacientes, controles e aspectos éticos.....	19
2. Células primárias	19
3. Diferenciação <i>in vitro</i> de granulócitos.....	21
3.1. Cultura de células em meio líquido	21
4. Ensaio clonogênico em metilcelulose.....	23
5. Ensaio para formação de corpos embrióides a partir de células tronco de pluripotência induzida (iPSC).	23
6. Ácidos nucleicos.....	24
6.1. Extração de DNA.....	24
6.2. Extração de RNA.....	24
7. Avaliação de metilação de DNA	25
7.1. Tratamento com bissulfito	25
7.2. PCR.....	26
7.2 Sequenciamento e análise de dados	27
Avaliação da expressão gênica	27
Tabela 5: XXXXXX Fonte: Abdel Wahab, 2012	28
8.1 Padronização.....	28
8.2 Análises da expressão gênica relativa	29
9. Análises estatísticas	29
RESULTADOS	30
DISCUSSÃO	51
ANEXOS	68

INTRODUÇÃO

1. Mielofibrose primária (MFP)

A mielofibrose primária (MFP), descrita inicialmente por Heuck em 1879, é uma doença hematológica clonal, originária de uma célula tronco hematopoética (CTH) mutada, levando à proliferação aumentada e expansão de uma ou mais linhagens mielóides, com progressiva fibrose medular (Tefferi 2016).

A Organização Mundial de Saúde (OMS) classifica a MFP entre as neoplasias mieloproliferativas, grupo que inclui também a policitemia vera (PV), a trombocitemia essencial (TE), a leucemia mieloide crônica (LMC), a leucemia neutrofílica crônica, a leucemia eosinofílica crônica e as neoplasias mieloproliferativas não classificáveis (**Tabela 1**) (Arber, Orazi et al. 2016). MFP, PV, TE e LMC formam o grupo das neoplasias mieloproliferativas clássicas, agrupadas por suas características clínicas e morfológicas em comum (Dameshek 1951). Enquanto a LMC é caracterizada pela presença da translocação entre os cromossomos 9 e 22, levando ao gene de fusão BCR-ABL, as outras três doenças são chamadas neoplasias mieloproliferativas clássicas, BCR-ABL negativas (aqui chamadas simplesmente de NMP). As NMP podem apresentar sobreposição de fenótipos e tanto PV quanto TE podem evoluir para mielofibrose, considerado o estágio mais avançado das NMP.

Neoplasias mieloproliferativas (NMP)

- Leucemia mieloide crônica (LMC), BCR-ABL1⁺
 - Leucemia neutrofílica crônica (LNC)
 - Policitemia vera (PV)
 - Mielofibrose primária (MFP)
 - o MFP, pré-fibrótica / estágio inicial
 - o MFP, estágio fibrótico evidente.
 - Trombocitemia essencial (TE)
 - Leucemia eosinofílica crônica, sem outra especificação (LEC, NOS)
 - NMP, inclassificável
-

Tabela 1: Classificação da Organização Mundial de Saúde para as neoplasias mieloproliferativas. Adaptada de Arber et al., 2016.

A MFP é uma doença rara com incidência estimada entre 0,1 e 1 caso por 100.000 indivíduos por ano. A idade mediana ao diagnóstico é de mais de 60 anos e a doença é heterogênea em sua apresentação clínica. Cerca de um quarto dos pacientes podem ser assintomáticos ao diagnóstico, mas muitos apresentam anemia, esplenomegalia, com dor ou desconforto abdominal, e sintomas constitucionais, como fadiga, febre, suores noturnos, perda de peso, entre outros (Chauffaille 2010).

A MFP é caracterizada pelo aumento e displasia na linhagem megacariocítica na medula óssea, com grau variável de fibrose medular; hematopoese extramedular e esplenomegalia; e leucoeritroblastose e presença de hemácias em lágrima (dacriócitos) no sangue periférico (Tefferi 2018). Pacientes com NMP apresentam mutações nos genes *JAK2* (*JAK2* V617F), *CALR* (deleções e inserções no éxon 9) ou *MPL* (principalmente nos aminoácidos W515 e W505) (Vainchenker and Kralovics 2017) e essas mutações fazem parte dos critérios diagnósticos estabelecidos pela OMS. A presença dos três critérios maiores e pelo menos um dos critérios menores é necessária para o diagnóstico de MFP. (**Tabela 2**) (Arber, Orazi et al. 2016).

Critérios maiores:

1. Presença de proliferação e atipia megacariocítica, acompanhada de fibrose reticulínica ou colagênica, grau 2 ou 3.
2. Não preencher os critérios da OMS para TE, PV, LMC BCR-ABL1⁺, síndromes mielodisplásicas ou outra neoplasia mieloide.
3. Presença de mutação em *JAK2*, *CALR* ou *MPL*. Na ausência destas mutações, presença de outro marcador clonal (por exemplo, *ASXL1*, *EZH2*, *TET2*, *IDH1/IDH2*, *SRSF2*, *SF3B1*) ou ausência de mielofibrose reativa (fibrose na medula óssea secundária a infecção, a doença autoimune ou condição inflamatória crônica, a tricoleucemia ou outra neoplasia linfoide, a metástases ou a mielopatias tóxicas crônicas).

Critérios menores:

Presença de pelo menos 1 dos seguintes requisitos, confirmados em 2 determinações consecutivas:

- A. Anemia não atribuída a uma comorbidade.
- B. Leucocitose $\geq 11 \times 10^9 /L$
- C. Aumento de LDH sérico acima do limite superior normal da faixa de referência institucional
- D. Leucoeritroblastose
- E. Esplenomegalia palpável

Tabela 2: Critérios para o diagnóstico de mielofibrose primária, estágio fibrótico evidente, segundo a Organização Mundial de Saúde. Adaptada de Arber et al., 2016.

A sobrevida na MFP é altamente variável: uma proporção de pacientes morre logo após do diagnóstico, enquanto alguns sobrevivem por duas décadas ou mais. A principal causa de morte é a transformação leucêmica, que pode ocorrer entre 12 e 30% dos casos (Cervantes, Dupriez et al. 2009, Tefferi 2016). Esse fato estimulou a identificação de fatores prognósticos e, como resultado, sistemas de classificação de risco foram propostos. Em um estudo com mais de mil pacientes com MFP, as variáveis de risco identificadas foram: idade ao diagnóstico maior do que 65 anos, presença de sintomas constitucionais, nível de hemoglobina menor do que 10g/dL, leucocitose acima de $25 \times 10^9/L$ e 1% ou mais de blastos em circulação no sangue periférico (Cervantes, Dupriez et al. 2009). O sistema IPSS (*International Prognostic Score System*) estabeleceu quatro grupos de risco (baixo, intermediário-1 e -2 e alto), com diferenças significantes na sobrevida global e na evolução para leucemia mieloide aguda (LMA). O grupo de baixo risco apresentou sobrevida mediana de 135 meses e o de alto risco, de 27 meses.

Novos sistemas de avaliação de risco foram desenvolvidos, entre eles o MIPSS-70, incluindo novas variáveis clínicas, citogenéticas e moleculares (Guglielmelli, Lasho et al. 2018). Por exemplo, a presença de sintomas constitucionais e a ausência de mutação em *CALR* foram vistas como variáveis de risco. Além disso, algumas mutações de risco foram identificadas, que podem preceder ou acompanhar as mutações de diagnóstico nas NMP, mutações estas que também podem estar presentes em outras neoplasias mieloides, como a síndrome mielodisplásica (SMD) ou a LMA. Essas alterações moleculares podem contribuir para o prognóstico e para uma avaliação de risco mais específica, permitindo escolher com melhor critério as modalidades de tratamento disponíveis para cada caso em particular (Finazzi, Lussana et al. 2017).

O tratamento da MFP depende dos sintomas e da categoria de risco dos pacientes. Pacientes de baixo risco, sem sintomas podem seguir em observação. Pacientes de risco intermediário-2 e alto risco podem ser considerados para o transplante alogênico de células-tronco (Hobbs and Rampal 2015). Atualmente esse é o único tratamento com potencial curativo para a MFP, mas devido à alta taxa de mortalidade relacionada ao procedimento, à idade avançada de muitos pacientes, às comorbidades e aos sintomas constitucionais, sua indicação requer uma avaliação cuidadosa do risco e das co-morbidades num nível individual do paciente. Outras drogas no tratamento da MFP têm caráter paliativo, atuando na redução de sintomas e tamanho do baço, incluindo inibidores de JAK2, como o Ruxolitinib (Mascarenhas 2015, Tefferi 2018). Novas opções de tratamento podem ser descobertas a partir do estudo de mecanismos fisiopatológicos da doença.

2. Fisiopatologia da MFP

As NMP ocorrem devido à expansão clonal de uma CTH mutada. Nos pacientes com PV, TE e MF foram identificadas mutações somáticas que são consideradas restritas ou características das NMP e afetam genes que regulam o processo de sinalização intracelular (Vainchenker and Kralovics 2017). Em condições fisiológicas, a hematopoiese, conjunto de processos que envolve a produção e maturação de células sanguíneas, é regulada por diversas citocinas. Citocinas como a eritropoietina (EPO), o fator estimulante de colônias de granulócitos (G-CSF) ou a trombopoietina (TPO) interagem com receptores na superfície das células estimulando a proteína Janus quinase 2 (JAK2). Esta proteína se autofosforila e se liga a uma proteína STAT (transdutor de sinal e ativador da transcrição), que por sua vez é fosforilada. A proteína STAT então dimeriza e transloca para o núcleo da célula e se liga ao promotor do gene, ativando o processo da transcrição. Mutações diretoras associadas às NMP provocam ativação permanente da via e tornam as células hipersensíveis às citocinas que regulam diferenciação, proliferação e quiescência, resultando na expansão do clone mutado (Prick, de Haan et al. 2014).

A mutação *JAK2* V617F foi a primeira mutação somática descrita nas NMP e está presente em 95% dos pacientes com PV e entre 50-60% dos pacientes com TE e MFP. A alteração valina-a-fenilalanina é responsável pela ativação constitutiva de JAK2 resultando num aumento da fosforilação dos seus substratos e perda da atividade auto-inibidora do domínio pseudo-quinase, o que leva a uma elevada resposta às citocinas nas células mieloides (James, Ugo et al. 2005, Tefferi and Gilliland 2005).

Pacientes *JAK2* V617F-negativos também podem apresentar mutações somáticas que causam ativação da via JAK-STAT de maneira constitutiva, como a mutação do gene do receptor de trombopoietina (*TPOR* ou *MPL*). A mutação *MPL* W515L em células hematopoéticas leva à ativação da sinalização de maneira patogênica. Isto foi confirmado através de estudos *in vitro* e modelos *in vivo*, que revelaram que a presença da mutação *MPL* W515L está associada a aumento na proliferação, crescimento independente de citocinas e hipersensibilidade à trombopoietina, com fosforilação constitutiva da via JAK-STAT. (Pikman, Lee et al. 2006).

No ano 2013, mutações do tipo *frameshift* do gene *CALR* (calreticulina) foram descobertas na maioria dos pacientes com TE e MFP negativos para *JAK2* e *MPL* (50-60% TE e 75% PMF). As mutações mais frequentes em *CALR* são a deleção de 52pb (p.L367fs*46) classificada, como tipo 1, e a inserção de 5pb (duplicação invertida de uma

sequência que precede a inserção TTGTC, p.K385fs*47), classificada como tipo 2 (em cerca de 50% e 30% dos casos respectivamente) (Klampfl, Gisslinger et al. 2013, Nangalia, Massie et al. 2013). Esta mutação modifica o domínio C-terminal e a calreticulina mutada tem se liga e ativa o receptor MPL, o que também leva à hiperativação permanente da via JAK-STAT (Marty, Pecquet et al. 2016).

As mutações drivers nos genes *CALR*, *JAK2* e *MPL* quase sempre são mutuamente exclusivas e em conjunto estão presentes em mais de 80% dos pacientes com MFP. Na ausência destas mutações os pacientes são considerados “triplo negativos” como acontece em 10-15% dos pacientes com MFP (**Figura 1**) (Langabeer 2016).

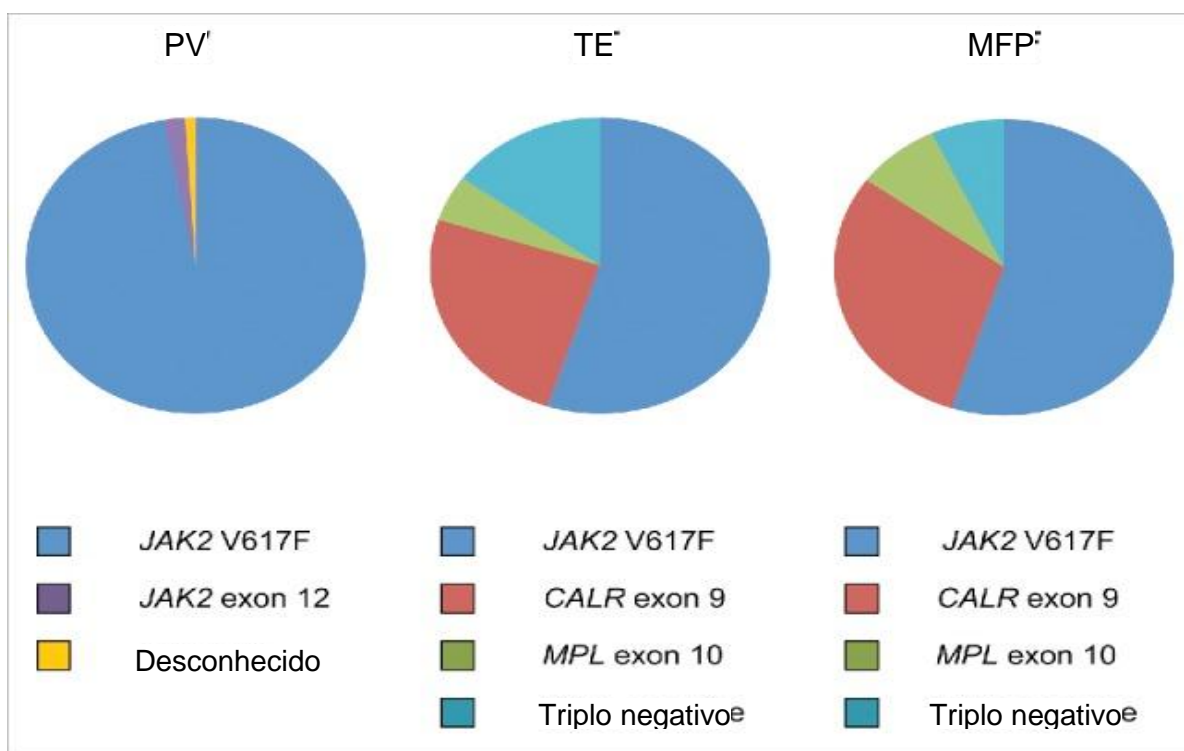


Figura 1 **Distribuição das mutações driver nas neoplasias mieloproliferativas.** Gráficos ilustrativos do percentual das mutações em *JAK2*, *CALR* e *MPL* em policitemia vera (PV), trombocitemia essencial (TE) e mielofibrose primária (MFP). Adaptado de Langabeer, 2016.

O aspecto central na fisiopatologia da MFP, e das NMP em geral, é a ativação constitutiva do eixo receptor de citocina e via JAK/STAT. Ainda não está totalmente esclarecido como essas vias são diferencialmente ativadas por mutações em *JAK2*, *Mpl* e *Calreticulina*. Os modelos murinos para estudo das mutações mostraram que elas são responsáveis por desencadear proliferação mieloide nos animais e induzir a PV, TE e mielofibrose secundária, porém os camundongos não desenvolvem MFP (Marty, Pecquet et

al. 2016, Vainchenker and Kralovics 2017). Provavelmente além da CTH mutada, o microambiente medular tem um papel importante na doença.

Dentro da medula óssea existe um microambiente local controlado rigidamente, ou nicho, que regula a quiescência, proliferação e diferenciação das CTH. Os estímulos provêm das citocinas ou fatores de crescimento liberados no microambiente medular resultando, assim, em um equilíbrio entre componentes da matriz extracelular e diferentes células em distintos estágios de maturação (Miller, Qu et al. 2018). Na MFP a ativação da via JAK/STAT leva à proliferação aumentada de granulócitos e hiperplasia de megacariócitos, que apresentam dismorfismo. Na fase celular pré-fibrótica, se observa hiper celularidade da medula óssea e fibrose reticulínica mínima. Progressivamente, ocorrem mudanças no microambiente da medula óssea, com aumento da produção de citocinas pró-inflamatórias, fibras reticulínicas e colágeno secretados por fibroblastos, osteoblastos e células mesenquimais da medula óssea, levando à fase de mielofibrose aberta (Lataillade, Pierre-Louis et al. 2008, Vainchenker and Kralovics 2017). Recentemente, o papel do megacariócito (Mk) como principal célula envolvida na fisiopatologia da MFP tem sido ressaltado, não só pelo aumento da produção de plaquetas, mas também como modulador do microambiente da medula óssea. Considera-se o Mk como protagonista da liberação aumentada de citocinas com potencial fibrogênico, e a interação anormal dos Mks com a matriz extracelular e os demais componentes celulares da medula constitui um mecanismo fisiopatológico que contribui à progressão fibrótica, já que em última instância, todos eles operam juntos na diferenciação megacariocítica anormal (**Figura 2**). Até o presente momento, ainda não estão bem esclarecidas de maneira funcional as interações e mecanismos específicos de secreção nos Mks, nem em condições fisiológicas nem patológicas, sendo necessários mais estudos neste campo (Vainchenker and Kralovics 2017, Malara, Abbonante et al. 2018).

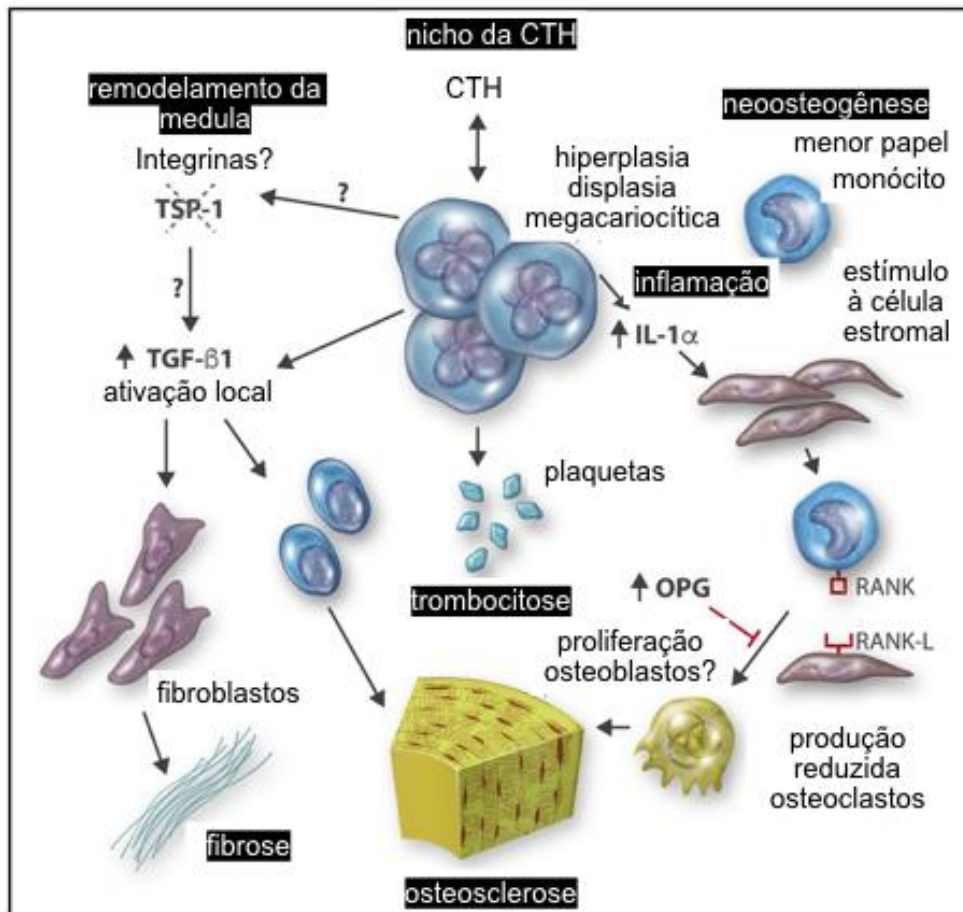


Figura 2: **Papel do megacariócito no microambiente medular na mielofibrose primária.** Esquema representativo das alterações no microambiente medular que podem ser desencadeadas pelo megacariócito, incluindo secreção de citocinas com potencial fibrinogênico e pró- inflamatórias. Adaptado de Vainchenker e Kralovics, 2017.

Além do microambiente medular, a patogênese da MFP pode ser influenciada pelo panorama genômico das CTH mutadas. Além das mutações *driver* (sinalização intracelular), a MFP cursa com mutações adicionais, que são comuns a todo espectro de neoplasias mieloides e afetam genes envolvidos na regulação epigenética e no processo de *splicing*. Vannucchi *et. al.* realizaram um estudo comparativo em 879 pacientes divididos em 2 coortes independentes. Avaliaram parâmetros como prevalência e distribuição de mutações (dos genes *TET2*, *CBL*, *IDH1* ou *IDH2*, *ASXL1*, *EZH2*, *DNMT3A* e *SRSF2*, além de *JAK2* e *MPL*), sobrevida global e risco de transformação leucêmica baseados nos critérios de classificação de risco. Os resultados deste trabalho mostraram que a presença de mutações em certos genes estava associada, em análise multivariada, a um desfecho adverso, sugerindo que as mutações nos genes *IDH1*, *EZH2*, *SRSF2* e *ASXL1* são relevantes para o prognóstico. O valor prognóstico das mutações em *ASXL1* se manteve independente do grupo de risco atribuído pelo IPSS (Vannucchi, Lasho et al. 2013). Lundberg *et. al.* usaram o sequenciamento de próxima geração (NGS) de 104 genes relacionados com câncer para acompanhar e quantificar mutações somáticas em amostras seriadas de pacientes com NMP numa coorte de 197 indivíduos. Os dados obtidos permitiram discriminar a arquitetura clonal dessas doenças e esse estudo revelou a presença de mutações somáticas em 90% dos pacientes, das quais 37% eram diferentes de *JAK2* V617F, *MPL* e *CALR*. A maioria destas eram mutações que afetavam genes implicados na regulação epigenética (*TET2* 12%, *ASXL1* 5%, *DNMT3A* 5%, *EZH2* 3% e *IDH1* 1,5%). O número de mutações foi maior na MFP e inversamente correlacionado à sobrevida. Também foi observado que mutações somáticas com perda de heterozigosidade em *TP53* estiveram fortemente associadas à transformação leucêmica. Sugere-se que a taxa de mutação nas NMP ao longo da evolução da doença seja baixa, já que as mutações identificadas em amostras tardias estavam também presentes em amostras pareadas ao diagnóstico (Lundberg, Karow et al. 2014). Delic *et. al.* analisaram um grupo de 28 genes em NMP e observaram que genes de regulação do *splicing* estavam significativamente mais mutados na MFP, em comparação a TE e PV (Delic, Rose et al. 2016). Tanto os genes implicados na regulação epigenética quanto os genes relacionados ao spliceossoma também são frequentemente mutados em SMD.

Esses estudos genômicos sugerem que a fisiopatologia da MFP pode depender tanto do número como do tipo de mutação presente. A proliferação é desencadeada principalmente por mutações de sinalização (*JAK2*, *CALR* e *MPL*), enquanto a maioria das mutações em reguladores epigenéticos e componentes do spliceossoma levam a defeitos de diferenciação (**Figura 3**). Pode-se considerar que a MFP têm contribuição de fatores mieloproliferativos e

mielodisplásicos e a heterogeneidade da doença e seu prognóstico dependem dos níveis de cada componente (Vainchenker and Kralovics 2017).

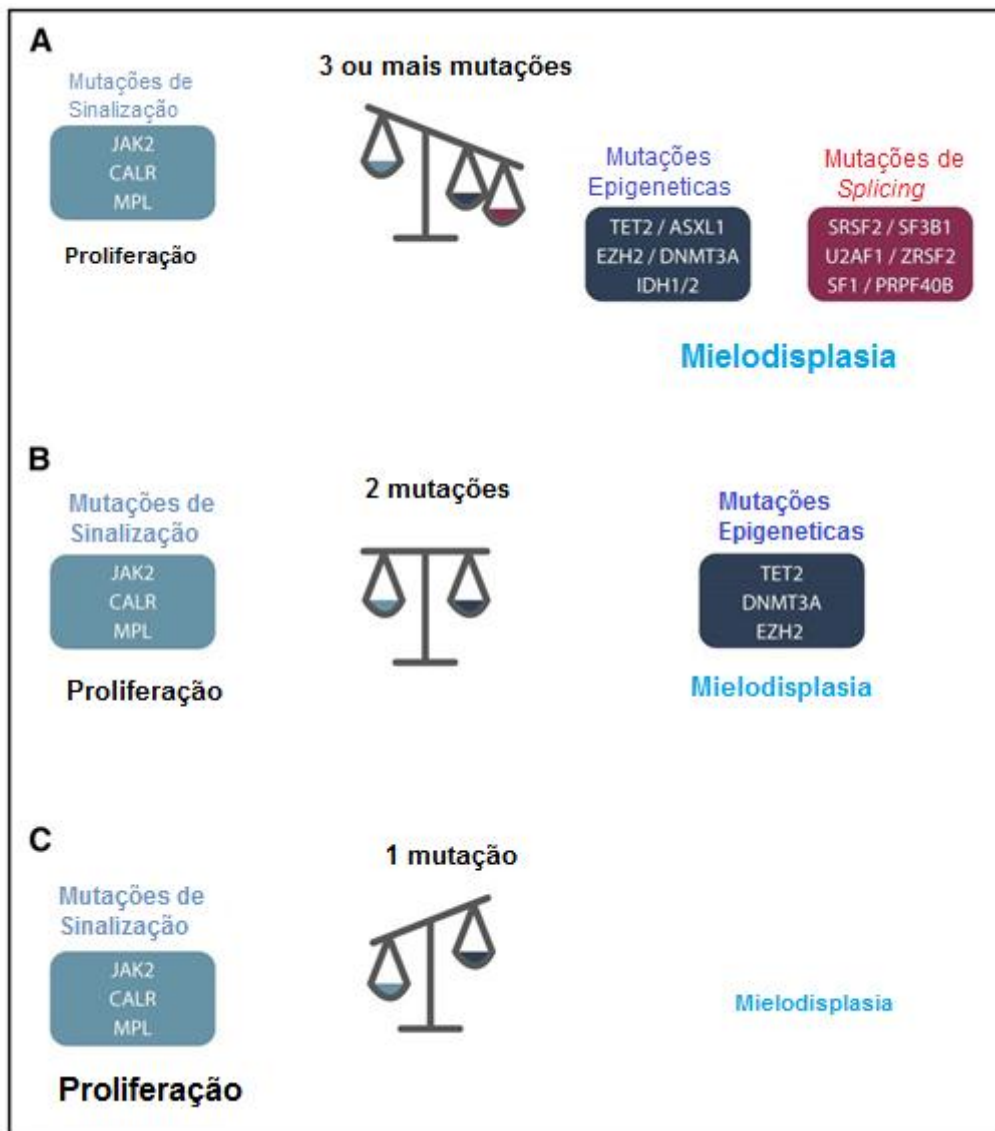


Figura 3: Número e tipo de mutação impactam no fenótipo da mielofibrose primária. Esquema representativo das alterações moleculares que contribuem à heterogeneidade da mielofibrose primária, mostrando as mutações que favorecem proliferação ou mielodisplasia. Adaptado de Vainchenker e Kralovics, 2017.

3. Regulação epigenética na MFP: metilação do DNA

Dentre as mutações que contribuem para o componente displásico na MFP, temos o grupo de genes reguladores epigenéticos, com relevância na fisiopatologia. Na MFP, esse grupo pode ser subdividido em: genes envolvidos na metilação do DNA (*DNMT3A*, *TET2*, *IDH1* e *IDH2*) e genes envolvidos no remodelamento da cromatina (*ASXL1* e *EZH2*). As

alterações epigenéticas são modificações estáveis, porém reversíveis, que determinam a maneira pela qual os genes podem ser expressos (ou silenciados). A metilação do DNA é provavelmente o mecanismo epigenético mais bem estudado (**Figura 4**). As enzimas DNA metiltransferases (DNMTs) adicionam um grupo metil ao carbono 5 do anel de pirimidina das citosinas que se encontram no dinucleotídeo CG (sítio CpG). O grupo metil (CH₃) é doado pela S-adenosilmetionina (SAM), que é reduzida a S-adenosilhomocisteína (SAH) (McPherson, McMullin et al. 2017). Esta modificação frequentemente acontece em regiões do genoma com abundância de sítios CpG, chamadas ilhas CpG, localizadas em regiões promotoras dos genes (Baylin and Jones 2011). A 5-metilcitosina (5-mC) assim formada está associada à repressão da transcrição gênica. O processo pode ser regulado pelas proteínas TET, que pertencem a uma família de enzimas dependentes de ferro e alfa-cetoglutarato que catalisam a conversão de 5-mC a 5-hidroximetilcitosina (5-hmC) e têm sido implicadas em mecanismos ativos ou passivos de desmetilação do DNA (An, Rao et al. 2017). As enzimas isocitrato desidrogenase (IDH) catalisam a conversão do isocitrato em alfa-cetoglutarato, necessário para a função das enzimas TET. No câncer, um ganho de metilação em um gene supressor de tumor levaria à inativação do gene, enquanto a perda de metilação em protooncogenes levaria à expressão gênica anormal (McPherson, McMullin et al. 2017). Na MFP, a genética encontra a epigenética, visto que as principais enzimas que regulam o mecanismo de metilação do DNA estão frequentemente mutadas (Baylin and Jones 2011).

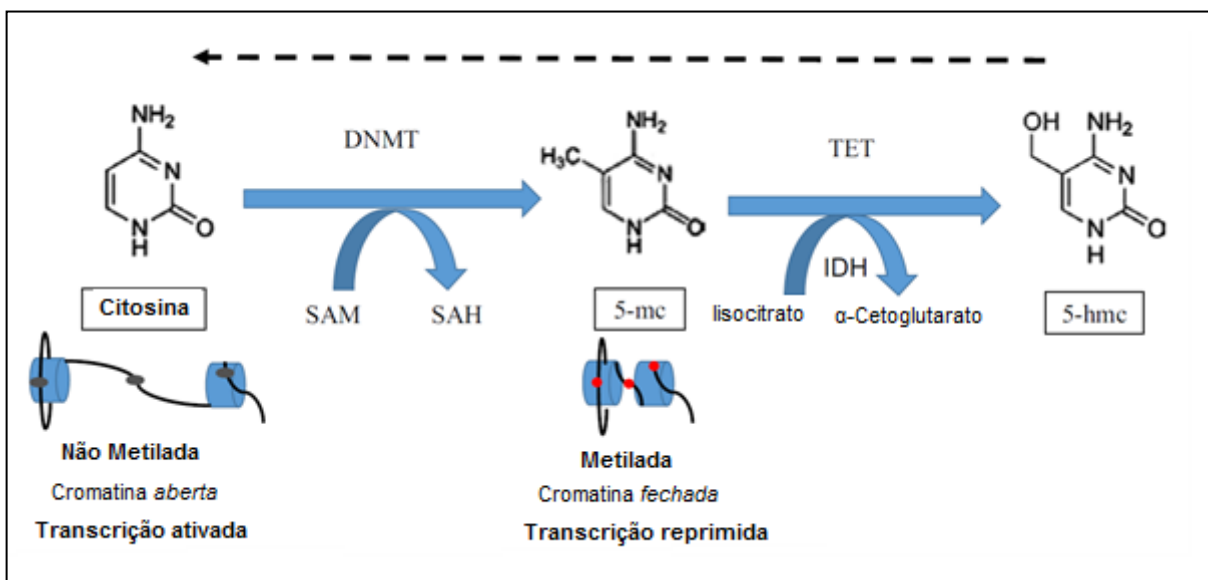


Figura 4: Visão geral da metilação do DNA. Esquema representativo de modificações à citosina que estão relacionadas à cromatina aberta/fechada e à transcrição ativada/reprimida. Os genes DNMT3A, TET2 e IDH1 e IDH2 podem estar mudados em mielofibrose primária. Adaptado de McPherson, 2017.

Em alguns trabalhos, o perfil global de metilação do DNA nas NMPs foi analisado. Amostras de medula óssea ou sangue periférico de controles e mais 70 pacientes com NMP e pacientes que desenvolveram transformação leucêmica foram analisadas usando *arrays* de metilação de DNA. Os resultados sugeriram que as alterações no perfil de metilação na fase crônica da NMP estão relacionadas à via do NFκB e na transformação leucêmica, à via do IFN (Perez, Pascual et al. 2013). Em outro estudo, Nischal e colaboradores mostraram que em granulócitos de pacientes com MFP tinham um perfil de metilação global característico, distinto dos pacientes com TE, PV e controles. Além disso, observaram um agrupamento de pacientes com mutação em *ASXL1*, indicando que esses casos tenham um perfil de metilação característico (Nischal, Bhattacharyya et al. 2013). No trabalho de Nielsen e colaboradores, onde compararam o metiloma de diferentes tipos de células sanguíneas de pacientes com MFP versus controles saudáveis, mostraram que as populações de células MFP têm vários genes diferencialmente metilados em relação às suas contrapartes normais, o que provavelmente contribui para as características fenotípicas da doença. Mutações nos reguladores epigenéticos *ASXL1* (47%) e *TET2* (20%) não foram associadas a um padrão específico de metilação do DNA, usando uma abordagem não supervisionada (Nielsen, Andersen et al. 2017).

4. Regulação epigenética na MFP: remodelamento de cromatina e ASXL1

Além das alterações que envolvem o processo de metilação do DNA, na MFP os mecanismos que regulam a cromatina também podem estar alterados (**Figura 5**) (McClure, Ewalt et al. 2018). A estrutura da cromatina é estabelecida pela interação entre DNA e as proteínas histonas. As modificações pós-traducionais, principalmente das caudas, das histonas podem modular sua interação com o DNA e, com isso, o grau de empacotamento e acessibilidade ao DNA, afetando a expressão gênica. Alguns complexos proteicos são responsáveis por gerar ou retirar “marcas” nas histonas, tais como metilação, acetilação, fosforilação, glicosilação, ADP-ribosilação e ubiquitinação (Mascarenhas, Roper et al. 2011). Os diferentes padrões de modificação poderiam atuar como um “código de histonas”, induzindo respostas biológicas específicas. Com relação às diferentes modificações das histonas, a metilação e a acetilação em determinadas lisinas são consideradas cruciais e estão associadas ao estado transcricional de um gene: ativo, represso ou bivalente (Butler and Dent 2013).

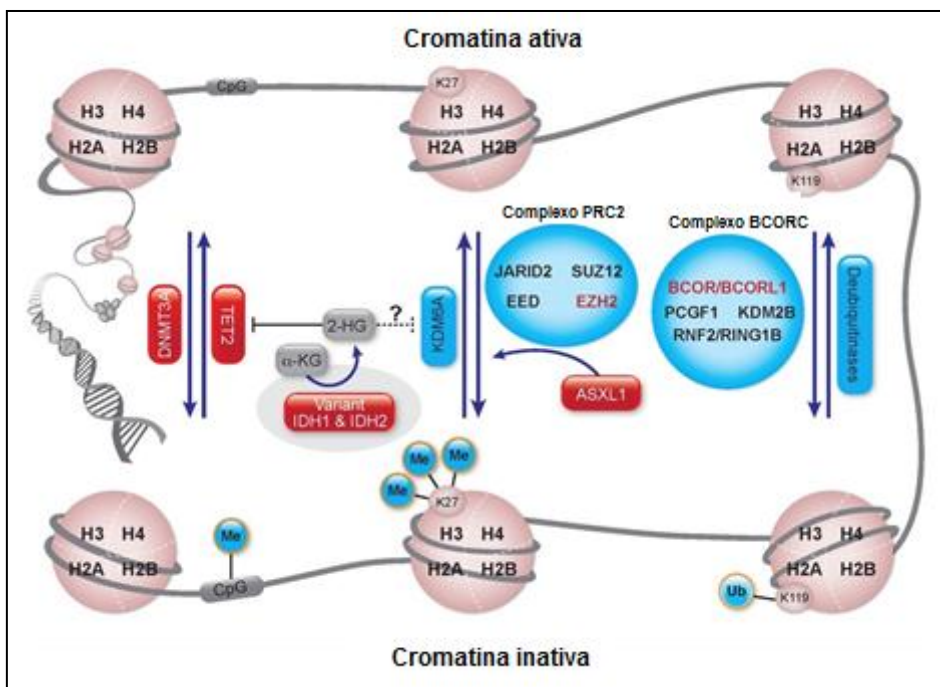


Figura 5: Visão geral do remodelamento de cromatina. Esquema representativo de modificações às histonas que estão relacionadas à cromatina aberta/fechada e à transcrição ativada/reprimida. Os genes *ASXL1* e *EZH2* interagem com os complexos proteicos (PRC2 e BCORC) responsáveis pela regulação das histonas e podem estar mutados em mielofibrose primária. Adaptado de McClure, 2018

Na categoria de genes remodeladores de cromatina, *ASXL1* é frequentemente mutado em neoplasias mieloides. Em 2009, foram identificadas pela primeira vez mutações em *ASXL1* em síndromes mielodisplásicas e em leucemia mielomonocítica crônica (Gelsi-Boyer, Trouplin et al. 2009), mas também já foram encontradas em LMA de novo e secundária e em NMP (Gelsi-Boyer, Brecqueville et al. 2012, Alvarez Argote and Dasanu 2018). Na MFP, cerca de 20-35% dos pacientes têm mutações em *ASXL1*, em contraste com PV e TE, onde a frequência é de 4-7% (Carbuccia, Murati et al. 2009, Abdel-Wahab, Pardanani et al. 2011, Vannucchi, Lasho et al. 2013, Alvarez Argote and Dasanu 2018).

O gene *ASXL1* está localizado na região cromossômica 20q11 (Fisher, Berger et al. 2003) e seu transcrito mais longo compreende 13 éxons e codifica a isoforma 1, uma proteína nuclear de 1541 aminoácidos, que contém um domínio N-terminal hélice-volta-hélice (HARE-HTH), um domínio central globular de homologia Asx (ASXH) que inclui 2 domínios para o receptor nuclear (NR-box) e um domínio C-terminal do tipo homeodomínio

de planta (PHD) (Aravind and Iyer 2012). As mutações descritas ocorrem principalmente no éxon 13 (antigo éxon 12) e são em maioria inserções e deleções que afetam o quadro de leitura (*frameshift*) ou substituições de nucleotídeo único (SNV) que levam a um códon de parada prematuro (*nonsense*), o que geraria uma proteína truncada *upstream* ao domínio PHD. A alteração mais recorrente, representando mais de 50% de todas as mutações *ASXL1*, é uma duplicação de uma guanina (c.1934dupG) após uma seqüência de oito guaninas, provocando uma mudança no quadro de leitura (p.G646fs*12) (**Figura 6**).

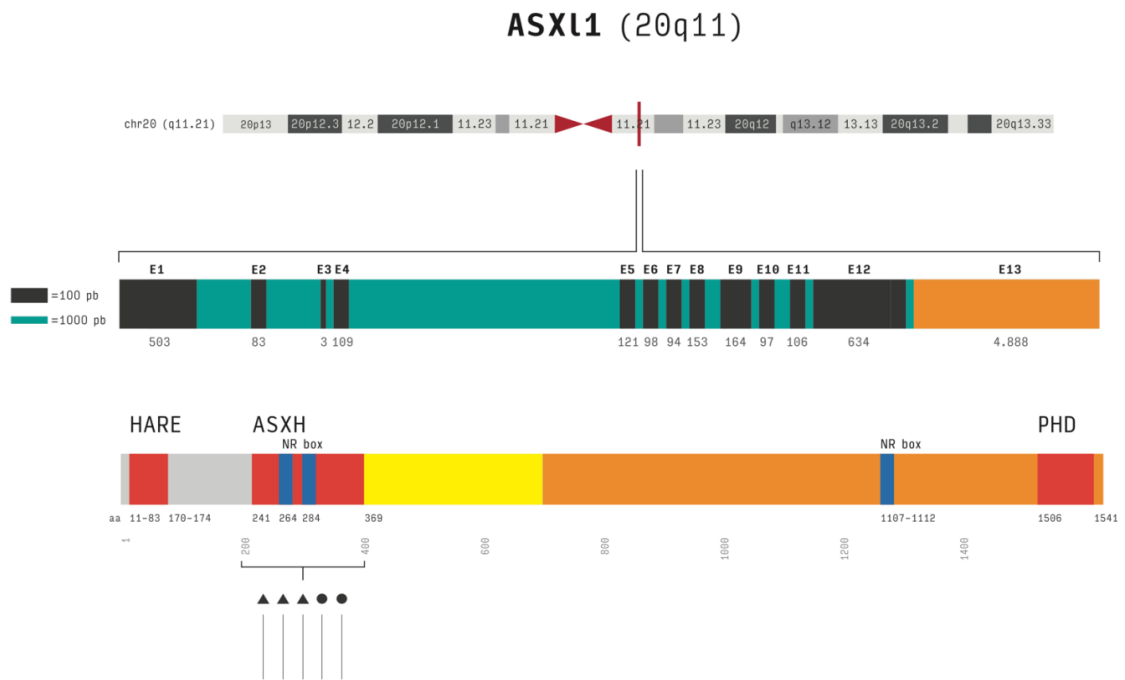


Figura 6: Estrutura do gene e proteína ASXL1. Esquema mostrando a localização do gene *ASXL1* no cromossomo 20 e representando seus éxons e introns. A proteína codificada está ilustrada com seus principais domínios e a posição onde ocorrem mutações estão indicadas

Em todo o espectro de neoplasias mieloides, as mutações em *ASXL1* estão associadas a um prognóstico ruim (Gelsi-Boyer, Brecqueville et al. 2012), inclusive em PMF no estudo já citado de Vannucchi *et. al.* (Vannucchi, Lasho et al. 2013). Tefferi e colaboradores avaliaram a interação entre as mutações *CALR* e *ASXL1* no prognóstico da MFP e verificaram que a sobrevida foi maior na presença de mutação em *CALR* e ausência de mutação *ASXL1* (ou seja, *CALR*⁺ *ASXL1*⁻) e menor quando ocorre o contrário (isto é *CALR*⁻ *ASXL1*⁺) (Tefferi, Guglielmelli et al. 2014). Assim, a presença de mutação em *ASXL1* é considerada um fator de risco na MFP, já incorporado em sistemas prognósticos mais recentes (Guglielmelli, Lasho et

al. 2018). Por sua relevância clínica, é importante entender como as mutações impactam a função fisiológica de ASXL1.

5. Função de ASXL1: lições de *Drosophila*

O gene *ASXL1* é um dos homólogos humanos do gene Additional sex comb (*Asx*) de *Drosophila melanogaster* (Fisher, Berger et al. 2003) e muitas descobertas sobre sua função foram feitas na mosca da fruta. O padrão de segmentação do embrião da *Drosophila* foi o modelo em que se observaram os efeitos das mutações em genes envolvidos no desenvolvimento. O gene *Asx* e outros foram identificados por Jürgens em 1985, por similaridades no fenótipo de seus mutantes com o do gene Polycomb (*Pc*), regulador negativo da expressão dos genes homeóticos (Lewis 1978, Jürgens 1985).

Os genes homeóticos foram descobertos a partir de mutações ocorrendo na *Drosophila melanogaster*, que resultaram no aparecimento de partes do corpo em locais inadequados, como o aparecimento de um par de asas extras no lugar dos halteres, no mutante Bithorax ou o crescimento das pernas onde deveriam estar as antenas, como no mutante Antennapedia. O termo grego para este intercâmbio de partes do corpo é “homeose” e os genes ficaram conhecidos como genes seletores homeóticos, que têm a função de determinar a identidade dos segmentos do corpo no eixo antero-posterior (Lappin, Grier et al. 2006). Na *Drosophila*, existem genes homeóticos organizados em dois complexos: Antennapedia (*ANT-C*), com 5 genes que regulam a formação da cabeça e segmentos tóraxicos iniciais, e Bithorax (*BX-C*), com 3 genes responsáveis pelo controle da organogênese em segmento torácico posterior e segmentos abdominais (Lewis 1978, Kaufman, Seeger et al. 1990). A organização dos genes ao longo do cromossomo (sentido 3' → 5') corresponde à ordem temporal e espacial (no eixo antero-posterior) em que são expressos no embrião durante o desenvolvimento (**Figura 7**) (Lewis 1978).

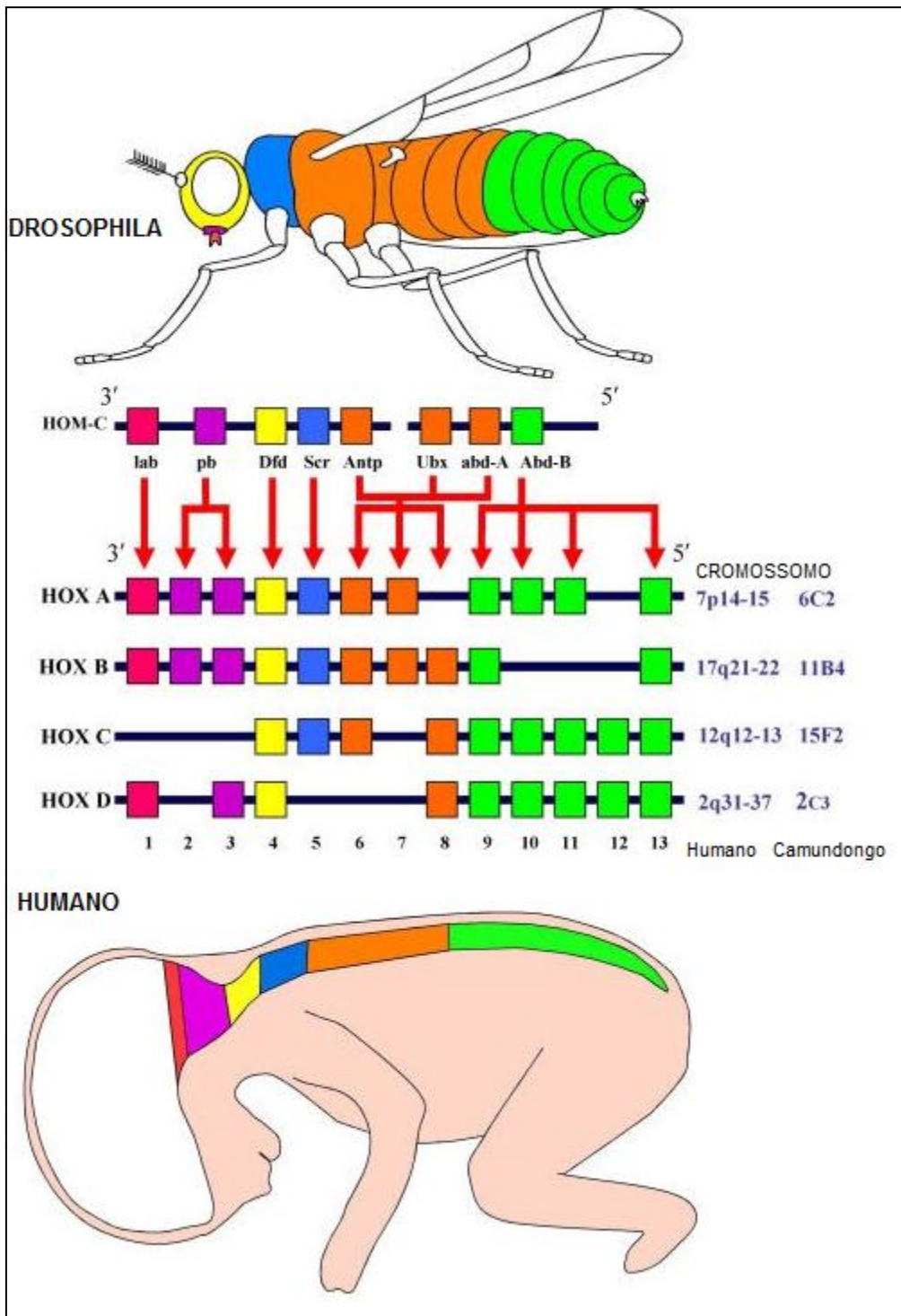


Figura 7: Estrutura dos complexos de genes homeóticos HOX na mosca da fruta *Drosophila melanogaster* e em humanos. Esquema ilustrando a localização 3'—>5' dos genes Antennapedia (lab, pb, Dfd, Scr e Antp) e Bithorax (Ubx, abd-A e Abd-B) de *Drosophila*, o que corresponde à localização em que são expressos no eixo antero-posterior. Os homólogos humanos estão localizados em 4 complexos HOX diferentes, e o padrão de expressão é similar ao observado na mosca da fruta. Adaptado de Lappin et. al., 2006.

Esses genes homeóticos possuem uma sequência de DNA de 180pb denominada homeobox, que codifica um domínio de 60 aminoácidos notadamente conservado, conhecido como homeodomínio, com atividade de ligação ao DNA, o que contribui para seu papel como fator de transcrição. Genes homeóticos com homeobox (genes *Hox*) são altamente conservados evolutivamente, estando presentes em todos os animais bilaterais, o que destaca sua origem primitiva e sua importância na formação do plano corporal, como reguladores mestres do desenvolvimento embrionário (Lemons and McGinnis 2006). Em humanos, os genes *HOX* são organizados em quatro *clusters* (HOXA-HOXD) localizados em diferentes cromossomos (7p15, 17q21.2, 12q13 e 2q31, respectivamente), contendo de 9 a 11 genes cada (**Figura 7**).

Com relação à regulação da expressão gênica, foi visto que para iniciar a transcrição dos genes *Hox* é preciso uma combinação específica e transiente da expressão de genes de segmentação *gap* e *pair-rule*. Uma vez estabelecido o padrão de expressão, ele é mantido pela ação combinada dos próprios *Hox* (autorregulação) e de proteínas Trithorax e Polycomb, que têm papel remodelador da cromatina. Genes do grupo *Trithorax* (TrxG) foram identificados pelo fenótipo dos mutantes que mimetizava a perda de função de vários genes homeóticos (transformação homeótica anterior). TrxG correspondem a reguladores positivos, que mantêm ativa a expressão dos *Hox*. Por outro lado, genes do grupo *Polycomb* (PcG) foram identificados pelo fenótipo de seus mutantes, onde a expressão de genes homeóticos está desreprimida (transformação homeótica posterior). PcG representam reguladores negativos, que mantêm reprimida a expressão dos *Hox* (Kennison 1993). Quando mais de um gene do mesmo grupo está mutado (PcG ou TrxG), o fenótipo do duplo-mutante é amplificado. Curiosamente, o mutante *Asx* aumentava o fenótipo tanto de mutantes PcG, quanto TrxG, indicando que era necessário tanto para manutenção da ativação quanto para manutenção da repressão dos genes homeóticos (Milne, Sinclair et al. 1999). Por isso, *Asx* é classificado como *Enhancer of Trithorax and Polycomb* (ETP).

6. Função de ASXL1: mecanismo molecular e fisiopatológico

Posteriormente, se avançou no entendimento dos mecanismos moleculares envolvidos na função TrxG, PcG e da própria proteína ASXL1. Dentre as funções TrxG, se identificam complexos como MLL, que promove a trimetilação da lisina 4 da histona H3 (H3K4me3), marca de cromatina ativa. As proteínas Polycomb funcionam em complexos proteicos

repressivos: PRC1, que promove a ubiquitinação da lisina 119 da histona H2 (H2K119Ub) e PRC2, que promove a trimetilação da lisina 27 da histona H3 (H3K27me3), marcas de cromatina silenciada. Foi demonstrado que ASXL1 interage com BAP1 no complexo repressivo Polycomb deubiquitinase PR-DUB, sendo necessária para deubiquitinação de H2AK119Ub (Scheuermann, de Ayala Alonso et al. 2010) e com PRC2, promovendo H3K27me3 (Abdel-Wahab, Adli et al. 2012).

Com o intuito de entender o papel fisiopatológico das mutações em *ASXL1* nas neoplasias mieloides, foram realizados vários estudos funcionais em linhagens celulares e camundongos. No estudo de Abdel-Wahab e colaboradores foi visto que mutações de *ASXL1* resultam em perda da expressão da proteína e a inibição (*knockdown*) de *ASXL1* leva à perda de H3K27me3. Isso indicaria que seriam mutações de perda de função (Abdel-Wahab, Adli et al. 2012). Nos modelos de camundongo transgênico, Wang *et. al.* e Abdel-Wahab *et. al.* observaram que o *knockout* (KO) constitutivo de *Asx11* ou condicional em células hematopoiéticas causou redução do *pool* de CTH, diminuindo sua capacidade de repopulação hematopoiética e induziu doença semelhante à MDS em camundongos (Abdel-Wahab, Gao et al. 2013, Wang, Li et al. 2014). Inoue *et. al.* mostraram que a indução de expressão estável de proteína *ASXL1* truncada em linhagens humanas *in vitro* e em modelo de transplante de CTH *in vivo* levou à perda de H3K27me3 e doença similar a MDS em camundongos. Os efeitos da expressão da proteína truncada simularam a perda de expressão de *ASXL1* selvagem, sugerindo que as mutações possam ter efeito dominante negativo (Inoue, Kitaura et al. 2013). Balasubramani *et. al.* induziram a expressão de proteínas *ASXL1* truncadas, correspondentes às mutações mais frequentes em neoplasias hematológicas, em linhagens de células humanas *in vitro*. Comparado à proteína selvagem, observaram um aumento significativo da atividade PR-DUB induzida pelas formas truncadas e perda de cerca de 90% de H2AK119Ub, sugerindo que as mutações possam levar a um ganho de função (Balasubramani, Larjo et al. 2015). Yang *et. al.* mostraram que só *ASXL1* mutado, mas não *ASXL1* selvagem, se liga a BRD4, uma proteína que contém bromodominio (BET) e ativa a transcrição de genes via fosforilação da RNA polimerase II. Isto sugere que BRD4 possa ter relevância clínica na patogênese induzida pelo mutante *ASXL1* proporcionando as primeiras evidências de novo ganho de função das mutações *ASXL1*. O modelo de camundongo transgênico expressando a proteína truncada em células hematopoiéticas desenvolveu diferentes neoplasias mieloides e teve sobrevida mais curta (Yang, Kurtenbach et al. 2018). Os resultados destas pesquisas são controversos. Os motivos desta discrepância poderiam atribuir-se a diferenças na geração dos animais transgênicos ou à superexpressão forçada da mutação nos modelos avaliados.

JUSTIFICATIVA

O entendimento incompleto do efeito das mutações em *ASXL1* nas NMPs motivou a realização de estudos funcionais de *ASXL1* em diversos modelos de camundongos ou linhagens celulares. As conclusões destes trabalhos atualmente são controversas provavelmente devido a falta de homologia na escolha metodológica e principalmente ao fato de que o efeito biológico do silenciamento ou knockout genico não necessariamente terá o mesmo impacto no fenótipo quanto as mutações em si. Observando estas divergências e aos poucos trabalhos publicados com mutações ocorrendo em células primárias de pacientes MFP. Consideramos relevante estudar potenciais genes alvo deste regulador epigenético que possam participar na proliferação mieloide.

Trabalho previo realizado pelo nosso grupo permitiu a geração de um modelo de linhagens iPS derivadas de células CD34+ de pacientes com MFP portadoras ou não das mutações em *ASXL1*. Isto proporcionaria a oportunidade de avaliar, em um mesmo background genético, o impacto de ter ou não a mutação em diversos aspectos biológicos como a metilação de genes específicos e na diferenciação das células para granulócitos.

Visto o papel importante exercido pelo *ASXL1* como regulador epigenético e que foi evidenciado por estudos em larga escala de metilação de histonas ou de DNA que presença de alterações em *ASXL1* pode ter correlação com expressão genica e ou perfis de metilação aberrantes nos genes *HOXA*. Propomos avaliar o impacto de mutações em *ASXL1* no estatus de metilação dos promotores e a expressão dos genes *HOXA* em amostras primarias, ao longo da diferenciação granulocitica *in vitro* a partir de células CD34+ derivadas de pacientes PMF assim como em corpos embrioides (EBs) derivados das linhagens iPS.

OBJETIVO DO ESTUDO

O objetivo deste estudo foi analisar o estado de metilação e expressão gênica de genes *HOXA* na MFP.

METODOLOGIA

1. Pacientes, controles e aspectos éticos

Pacientes portadores de mielofibrose primária (MF) foram diagnosticados de acordo com os critérios da Organização Mundial de Saúde (OMS), nos Hospitais Universitários Pedro Ernesto (HUPE-UERJ) e Antônio Pedro (HUAP-UFF). Amostras de sangue periférico foram coletadas com EDTA (ácido etilenodiamino tetracético) e referidas ao Laboratório de Biologia Molecular do CEMO/INCA. Como parte do diagnóstico molecular desses pacientes, foram avaliadas em nosso laboratório as mutações *JAK2 V671F*, *CALR indels* e *MPL*. Além disso, os pacientes foram previamente caracterizados quanto à presença de mutações em *ASXL1*. Os dados clínicos e hematológicos do diagnóstico e acompanhamento dos pacientes foram coletados pelos médicos em seus respectivos centros de atuação e compilados em um banco de dados no Laboratório de Biologia Molecular do CEMO/INCA.

Como controles de indivíduos saudáveis, amostras de doadores de sangue periférico (SP) do INCA foram utilizadas. Durante seu preparo, as bolsas de sangue para doação são filtradas para remoção de leucócitos, sendo esse filtro de leucócitos encaminhado ao Laboratório de Biologia Molecular do CEMO/INCA.

O projeto 08/62 foi aprovado pelo CEP INCA em 2008 e está registrado na Plataforma Brasil sob o número...(Anexo...). Pacientes e doadores foram devidamente informados e assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (Anexos "X").

2. Células primárias

2.1. Células mononucleares (PBMC) e granulócitos

Amostras de sangue periférico de pacientes com MF foram rotineiramente processadas para obtenção de células mononucleares (PBMC, do inglês *Peripheral Blood Mononuclear cells*) e granulócitos, por separação em gradiente de densidade utilizando Ficoll-Hypaque® (GE Healthcare Science, Reino Unido). Para tanto, 10 mL de sangue periférico foram

cuidadosamente colocados sobre 5 mL de Ficoll e a amostra foi centrifugada a 450 g por 20 min, sem freio.

A fração de PBMC foi recolhida, lavada com solução tampão fosfato-salina (PBS, do inglês *Phosphate Buffered Saline*, pH 7,4) e centrifugada a 200 g por 7 min. Essa fração foi então utilizada para purificação de células tronco / progenitoras hematopoiéticas CD34+, sendo todo o processo realizado em fluxo estéril.

A fração de granulócitos foi incubada com tampão apropriado para lise de células vermelhas (NH₄CL 1,5M; EDTA 0,5M; KHCO₃ 0,1M) por 10 min em gelo, e a seguir foi centrifugada a 200 g por 7 min. Em seguida, o procedimento de lise das células vermelhas foi repetido. Por fim, o precipitado foi lavado duas vezes com PBS, centrifugado nas mesmas condições e o *pellet* de granulócitos foi submetido à extração de ácidos nucleicos.

Com relação às amostras dos indivíduos saudáveis, o filtro de leucócitos foi lavado com 200 mL de PBS-EDTA 0,1% e a suspensão celular foi centrifugada a 200 g por 5 min. O *pellet* de leucócitos foi ressuspendido em 10 mL PBS-EDTA 0,1% e a fração de PBMC foi obtida por gradiente de densidade como descrito anteriormente.

2.2. Células-tronco / progenitoras hematopoéticas CD34+ (CTH)

PBMC de pacientes com MF ou controles saudáveis foram usadas para purificação de CTH. Após a contagem de células viáveis em câmara de Neubauer, na presença de azul de trypan 0,4%, 1×10^8 PBMC foram ressuspendidas em 300 µL de PBS-EDTA 0,1%. Foram adicionados 100 µL de agente bloqueador FcR (*Human CD34 MicroBead Kit*, Miltenyi Biotec®, USA - FcR Blocking, anticorpo humano para bloqueio da ligação inespecífica no receptor; Fc: fragmento cristalizável) à suspensão celular e, em seguida, adicionados 100 µL do complexo anticorpo anti-CD34-esfera magnética (*Human CD34 MicroBead Kit*, Miltenyi Biotec®, USA). A amostra foi incubada a 4°C por 30 min. As células foram lavadas com PBS-EDTA 0,1% e, após centrifugação a 300 g por 5 min, foram ressuspendidas em 600 µL de PBS-EDTA 0,1%. A obtenção das CTH foi realizada por separação imunomagnética em coluna previamente hidratada com PBS, que a seguir foi lavada por três vezes com PBS. Por fim, a coluna foi transferida a um novo tubo e as CTH foram eluídas em 5 mL de PBS-EDTA 0,1% por pressão com êmbolo, para finalmente serem contadas em câmara de Neubauer. As CTH foram usadas para diferenciação granulocítica *in vitro* e ensaio clonogênico em metilcelulose.

3. Diferenciação *in vitro* de granulócitos

3.1. Cultura de células em meio líquido

As CTH foram cultivadas em meio líquido sem soro (MSS) composto por Iscove's Modified Dulbecco's Medium (IMDM, Life Technologies®, USA), *Bovine Serum Albumin* (BSA, Gibco®, USA) 10%, 300 mM bicarbonato (Gibco®, USA), 76 µM α-monotioglicerol (Sigma®, USA), 2 mM de L-glutamina (Gibco®, USA), 40 µg / mL lipídeos, 1X Insulina-Transferrina-Selenium (Gibco®, USA), 100 U / mL de penicilina (Gibco®, USA), 100 µg / mL de estreptomicina (Gibco®, USA), acrescido de 20 µg / mL de human granulocyte colony stimulating factor (hG-SCF, Prepotech, USA), 5 µg / mL de human stem cell fator (hSCF, Prepotech, USA), e 10⁴ U / mL de interleucina-3 recombinante humana (IL-3, Prepotech, USA). As células foram mantidas em estufa a 37 °C com uma atmosfera de 5% de CO₂ durante 21 dias, sendo o meio de cultura trocado a cada 4 dias. Alíquotas de células foram coletadas após 12 h (D0), 7 dias (D7), 14 dias (D14) e 21 dias (D21) de cultura para avaliação por citometria de fluxo, microscopia e extração de ácidos nucleicos (figura 8).

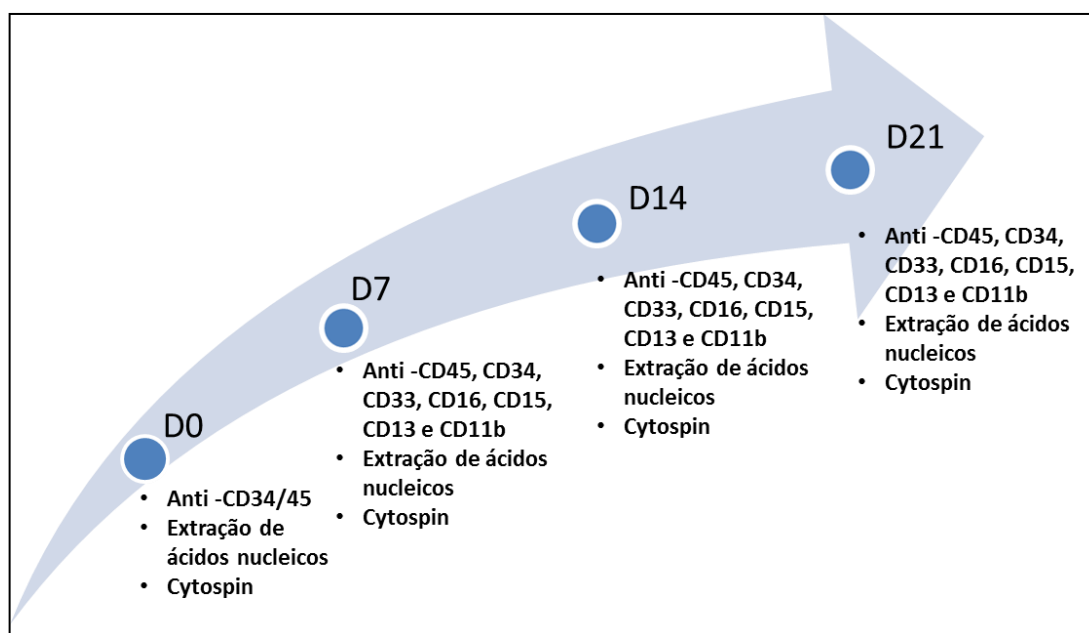


Figura 8: **Esquema de diferenciação celular *in vitro*.** No gráfico se indicam os ensaios realizados para caracterização das subpopulações celulares obtidas durante a diferenciação *in vitro* de células CD34+ para granulócitos. D0: 12h. D7: 7 dias. D14: 14 dias. D21

3.2. Imunofenotipagem

As células obtidas nos diferentes tempos de cultura foram avaliadas com relação à expressão de marcadores de superfície celular por citometria de fluxo. Os anticorpos monoclonais utilizados estão listados na **tabela X (no final do texto)**. As células foram incubadas com os anticorpos conjugados a fluoróforos por 15 min à temperatura ambiente e ao abrigo da luz, em tubos específicos para citometria de fluxo. Após, foram lavadas com 1 mL de PBS e centrifugadas a 450 g por 5 min. Em seguida, o sobrenadante foi descartado e as células foram ressuspensas em PBS para a leitura no citômetro. O citômetro de fluxo utilizado foi o FACSCanto IITM (Becton e Dickinson Biosciences, EUA) do Laboratório de Imunofenotipagem do CEMO e o software para as análises foi o Infinicity™ (Cytognos, Espanha). Foram adquiridos $4-5 \times 10^4$ eventos totais em cada marcação. Em D0, o enriquecimento das CTH foi avaliado por meio de marcação com anticorpos anti-CD34 e anti-CD45 e a viabilidade celular foi avaliada por marcação com 7AAD. Em D7, D14 e D21 foram avaliados os marcadores de superfície CD34, CD45, CD33, CD16, CD11b e CD15, além da viabilidade celular com 7AAD.

Anticorpos monoclonais utilizados no estudo imunofenotípico

Anticorpo	Fluorocromo	Fabricante	Tubo
CD45	FITC	BD Biosciences	1
CD11b	APC	BD Biosciences	2
CD15	FITC	BD Biosciences	1
CD16	PE-Cy7	BD Biosciences	2
CD34	PE	BD Biosciences	1
	PerCP	BD Biosciences	2
CD33	APC	BD Biosciences	1

Tabela 3: **Anticorpos monoclonais utilizados no estudo imunofenotípico.** Fonte: elaboração própria

3.3 Morfologia

Para avaliação de morfologia, 5×10^4 células obtidas em cultura foram ressuspensas em 90 μL de PBS e centrifugadas em lâminas a 70 g por 5 min, em centrífuga Cytospin 3 (Thermo Scientific®). As lâminas foram secadas à temperatura ambiente e posteriormente tratadas com corante diferencial May-Grunwald-Giemsa, usando equipamento automatizado nas dependências do Laboratório de Patologia do INCA. As lâminas foram visualizadas e fotografadas em microscópio ótico (ZEISS® Primo Star).

4. Ensaio clonogênico em metilcelulose

Para avaliação do potencial clonogênico das CTH foi realizado ensaio em metilcelulose, que permite quantificar as Unidades Formadoras de Colônias (CFUs) granulocíticas (CFU-G); granulo-monocíticas (CFU-GM); eritroides (CFU-E) e células progenitoras multipotentes granulocíticas, eritroides, monocíticas ou-megacariocíticas (CFU-GEMM). Para isso, 1×10^3 CTH foram adicionadas a 1 mL de metilcelulose contendo fatores de crescimento e citocinas capazes de promover a formação de todas as CFUs (MethoCult™ H4434, Stem cells Technologies), em triplicata. Posteriormente foram incubadas em estufa a 37 °C em atmosfera de 5% de CO_2 . As colônias que cresceram a partir dos progenitores hematopoiéticos foram quantificadas 14 dias após o plaqueamento usando equipamento automatizado StemVision (Stem Cell Technologies, Canadá) no Laboratório do Banco de Sangue e Cordão do INCA.

5. Ensaio para formação de corpos embrióides a partir de células tronco de pluripotência induzida (iPSC).

Trabalho anterior do nosso grupo permitiu o desenvolvimento de linhagens iPS a partir de células primárias de indivíduos saudáveis e de pacientes com mielofibrose, usando o sistema Vírus Sendai (VS) CytoTune™-iPS geração 1.0 ou 2.0 (Thermo Fisher Scientific, USA), que contém os 4 fatores de pluripotência, também nomeados “fatores de Yamanaka” (OCT3/4, SOX2, KLF-4, c-MYC- OSKM) (Gomez Limia, Devalle et al. 2017). A partir das iPSC XX e XX foi realizado o ensaio de formação de corpos embrioides (EBs), o que permite a diferenciação de células pluripotentes em células dos três folhetos germinativos. Assim, os *pellets* de iPSC e EBs, obtidos previamente em nosso laboratório, foram usados para extração

de DNA genômico e RNA total, para avaliação do estado de metilação de promotores e expressão de genes de interesse neste estudo.

6. Ácidos nucleicos

6.1. Extração de DNA

O DNA genômico de pacientes com MF foi obtido a partir de granulócitos por sistema de purificação automatizada de ácidos nucleicos baseado no uso de partículas de sílica magnetizadas (Maxwell®16 Promega, USA) de acordo com as instruções do fabricante. O DNA assim obtido foi utilizado diretamente para estudos moleculares ou conservado a 4 °C.

Com relação às células coletadas durante a diferenciação granulocítica *in vitro*, a extração de DNA foi realizada após a extração de RNA com Trizol (Invitrogen, USA). Brevemente, após a retirada da fase aquosa contendo RNA, o DNA foi precipitado com 500 µL de álcool etílico 75% a -20 °C por 24 h. A seguir, a amostra foi centrifugada a 2000 g por 5 min a 4°C, o sobrenadante foi descartado e o *pellet* foi seco à temperatura ambiente. Finalmente, o *pellet* foi ressuscitado em 50 µL de 8mM NaOH, o pH ajustado a 7-8 com 0,1 M de HEPES e conservado a 4 °C.

6.2. Extração de RNA

Cerca de 5×10^6 granulócitos primários de pacientes com MF ou células coletadas durante a diferenciação granulocítica *in vitro* foram ressuscitados em 1 mL Trizol e a amostra foi vortexada para homogeneização e incubada por 10 min à temperatura ambiente. Em seguida, foram acrescentados 100 µL de clorofórmio (Merck, USA), homogeneizando a solução por inversão e a amostra posteriormente foi centrifugada a 15.200 g por 10 min a 4 °C. A fase aquosa superior contendo o RNA foi cuidadosamente coletada em um tubo novo. À fase aquosa, foram acrescentados 250 µL de álcool isopropílico com posterior incubação a -20 °C por 1 h. Em seguida, o tubo foi centrifugado a 15.200 g por 10 min a 4°C. O *pellet* de RNA foi lavado com 450 µL de álcool etílico 75% e centrifugado a 10.600 g por 5 min a 4°C. O sobrenadante foi desprezado por inversão e o *pellet* foi seco à temperatura ambiente até à evaporação completa do etanol. Por fim, o RNA foi solubilizado em 12 µL de água livre de DNases e RNases e conservado a -80 °C. A quantificação dos ácidos nucleicos e a avaliação do grau de pureza foram realizados por espectrofotometria no NanoDrop 1000 (Thermo Scientific).

6.3. Síntese de cDNA

O cDNA foi obtido a partir da transcrição reversa de 2 µg de RNA, usando o kit de transcrição reversa SuperScript II (Invitrogen, USA) para todos os casos. A reação realizada consistiu em: 2 µg de RNA, 300 ng de Random Primers; 0,5 mM de dNTP (Desoxinucleotídeos Trifosfato), 10 mM de DTT (Ditiotreitol, Invitrogen); 1X Tampão SSII; 40U de RNase Out (Invitrogen) e 200 U de enzima SuperScript II (Invitrogen), em volume final de 20 µL. Após a desnaturação inicial de RNA, *random primers* e dNTPs a 65 °C por 5 min, a reação foi incubada a 42 °C por 40 min, seguida de inativação enzimática aumentando a temperatura a 65 °C por 15 min. O cDNA assim sintetizado foi utilizado para análise de expressão gênica.

7. Avaliação de metilação de DNA

7.1. Tratamento com bissulfito

O estado de metilação das regiões promotoras dos genes *HOXA* (*HOXA 5,6,7,9,10,11 e 13*) foi avaliado por sequenciamento direto, após conversão do DNA com bissulfito de sódio seguido de reação em cadeia da polimerase (PCR).

A técnica de conversão do DNA por bissulfito é considerada o "padrão ouro" para a análise de metilação. Permite identificar metilação do DNA ao nível de resolução de uma única base. Baseia-se na desaminação preferencial de citosinas desmetiladas ao uracilo enquanto a 5-MeC (citosina metilada) permanece como invariável. Isto permite que após da amplificação por PCR do DNA tratado, o uracilo seja amplificado como Timina, enquanto as 5-MeC não são modificadas. Assim, os sítios CpGs metilados podem ser distinguidos dos não metilados mediante sequenciamento do amplicon resultante.

A conversão do DNA foi realizada utilizando-se o kit *EpiTec bisulfite* (Qiagen[®], Epigenomics). Resumidamente, preparou-se uma mistura contendo: 85 µL de *Bisulfite Mix*, previamente solubilizado em água livre de RNAses; 35 µL *DNA Protect Buffer*; 2 µg DNA (ou o máximo obtido, em até 20 µL) completando a reação com água livre de RNAses até o volume final de 140 µL. O tubo foi levado ao termociclador Veriti 96 poços (Applied Biosystems[™]) e submetido à ciclagem especificada pelo fabricante do kit. O DNA modificado foi então purificado por colunas seguindo recomendação do fabricante e utilizado para amplificação por PCR.

7.2. PCR

As regiões de DNA dos genes de interesse foram amplificadas por PCR, usando *primers* específicos selecionados na literatura (Hayashi, Nagae et al. 2007). As sequências e tamanhos dos produtos resultantes estão especificados na tabela (x no final do texto). A reação realizada foi realizada com 100ng DNA, 30 U Go Taq (Promega®), 1X Buffer Colorless, 2 mM MgCl₂ (Promega®), 0,25 mM de dNTP e 10 pmol de cada *primer forward* e *reverse*, em volume final de 20 µL. As condições de ciclagem realizadas foram: 95 °C por 10 min, 40 ciclos de 95 °C por 30 s; 50 °C por 30 s e 72 °C por 1 min, finalizando com 72 °C por 10 min de extensão final. Em termociclador Veriti 96 poços (Applied Biosystems™). Como controles positivos, foram usados DNAs comerciais 0% e 100% metilados (Qiagen®, Epigenomics) e como controle negativo, foi utilizado água no lugar de DNA.

Os produtos de cada reação foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 2 % e 0,5 g / mL de Brometo de Etídio. Em seguida, os produtos foram visualizados em sistema de transiluminação Gel Doc XR (BioRad®) por meio do software Quantity One (BioRad®). Os produtos de PCR foram então purificados utilizando o kit de purificação de PCR (*PureLink Quick Gel Extraction and PCR Purification combo Kit*, Invitrogen®) e semi-quantificados após nova corrida eletroforética, em relação ao marcador de peso molecular Low Mass (Invitrogen®).

Gene alvo	Sequencia	Sentido 5'-3'	Tamanho do produto (pb)	Ilhas CpG no amplicon (N°)
HOXA6	Forward	AATAAATTATAGTTTTGTAGAGGGG	287	19
	Reverse	AAAATCCTTATCAAATAAAAACAC		
HOXA7	Forward	TATTTGTGAGGATTGTTGAGATTG	284	17
	Reverse	ATAAAAACAAAAAACAAAAATC		
HOXA9	Forward	GGTTTTTGTATAAAAATTATGATTGTA	267	21
	Reverse	AATTACCCAAAACCCCAATAATAAC		
HOXA10	Forward	TTTTTTTTGGTTGATTTTTTTGTGTA	210	19
	Reverse	TCTCCTAACCCATCAATACAAATTAC		
HOXA11	Forward	TTGATTATATTTTTTTATTTATGGTTATTT	266	15
	Reverse	AACCCCTATACCTCTATCTCTACC		
HOXA13	Forward	GTTTTTTATTTTTTGGGGGTTTTT	117	13
	Reverse	CCCCTCCATATTCTTATTAACCTC		

Tabela 4: Sequência dos primers utilizados para avaliação do status de metilação dos promotores de genes de interesse nas amostras biológicas. Fonte: Hayashi *et al*, 2006

7.2 Sequenciamento e análise de dados

Os produtos de PCR foram submetidos à reação de sequenciamento direto pelo método de Sanger em placa MicroAmp™ Optical 96-Well Reaction Plate (Applied Biosystems™). Nesta reação utilizaram-se 20 ng de DNA, 1 µL de BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit, 2 µL de BigDye Sequencing Buffer e 5 pmol de *primer forward* ou *reverse*, em volume final de 10 µL. As condições de ciclagem foram: 94°C por 10 s, 50 °C por 5 s e 60 °C por 4 min, por 40 ciclos. Em seguida foi feita a precipitação dos produtos. Primeiramente, foram adicionados 45 uL de isopropanol 75% em cada poço, incubação por 15 min protegida da luz a temperatura ambiente e depois a placa foi centrifugada a 2250g, por 45 min, a 4 °C. O sobrenadante foi descartado e para retirar o líquido restante, foram dados dois pulsos a 1000 rpm com a placa foi invertida sobre papel toalha. Por fim 150 uL de etanol 70% gelado foram adicionados e foi feita uma centrifugação a 2250g, por 15 min, a 4 °C e após descarte do sobrenadante a placa foi submetida a uma centrifugação invertida breve para descarte do resíduo de etanol. As reações foram secas por 1 min a 95°C no termociclador e depois armazenadas a -20°C protegidas da luz até o sequenciamento.

As amostras foram submetidas a sequenciamento capilar no analisador genético 3130xI (Applied Biosystems) e as sequências foram analisadas por meio dos programas Chromas V2.32 (Technelysium Pty Ltd) e Mutation Surveyor 5.1 (Soft Genetic LLC).

Avaliação da expressão gênica

A expressão gênica relativa foi avaliada nas diferentes amostras biológicas por PCR quantitativo em tempo real (qRT-PCR), utilizando o intercalante de DNA SYBR Green (Applied Biosystems™), em aparelho Vii7 (Applied Biosystems™). Os genes de interesse *HOXA5*, *6*, *7*, *9*, *10*, *11* e *13* foram avaliados e *HPRT*, *ABL* e *PPIA* foram usados como genes de referência. Os *primers* específicos utilizados estão descritos na tabela

Para cada gene, as reações, realizadas sempre em duplicata, foram: cDNA correspondente a 25 ng de RNA; 1X SYBR Green Master Mix e 5 pmol de cada primer, *forward* e *reverse*, em volume final de 12 µL. As condições de ciclagem foram: 50 °C, por 2 min, 95 °C, por 10min, seguido de 40 ciclos de 95 °C, por 15 s e 60 °C, por 1 min. O protocolo final de desnaturação (curva de melting) foi: 95 °C, por 15 s, 60 °C, por 1 min e 95 °C, por 15 s com análise a cada 0,05 °C/s nesta última rampa. Os dados foram analisados utilizando ViiA™ 7 Software (Applied Biosystems™).

Gene alvo	Sequencia	Sentido 5'-3'	Tamanho do produto (pb)
<i>ASXL1</i>	Forward	GAAAAGCCACAGCCCACTAA	561
	Reverse	CAGAGCACGGGCTTTAAT	
<i>HOXA6</i>	Forward	CATGGCTCCCATACACAGC	103
	Reverse	AAAGCACTCCATGACGAAGG	
<i>HOXA7</i>	Forward	GGAACTCCTTCTCCAGCTCC	104
	Reverse	CAATTTCCGCATCTACCCCT	
<i>HOXA9</i>	Forward	CCACGCTTGACACTCACACT	230
	Reverse	CAGTTCCAGGGTCTGGTGTT	
<i>HOXA10</i>	Forward	CAGTGTCTGGTGCTTCGTGT	108
	Reverse	CCGGAGAAGGATTCCCTG	
<i>HOXA11</i>	Forward	GAAGAAGAAGTCCCGTTCCA	104
	Reverse	ACACTGAGGACAAGGCCG	
<i>HOXA13</i>	Forward	GCACCTTGGTATAAGGCACG	98
	Reverse	CCTCTGGAAGTCCACTCTGC	
<i>HPRT1</i>	Forward	AGATGGTCAAGGTCGCAAG	128
	Reverse	GTATTCATTATAGTCAAGGGCATATC	
<i>PPIA</i>	Forward	CATCTGCACTGCCAAGACTGAG	321
	Reverse	TGCAATCCAGCTAGGCATG	
<i>ABL</i>	Forward	GATACGAAGGGAGGGTGTACCA	
	Reverse	CTCGGCCAGGGTGTGAA	

Tabela 5: XXXXXX Fonte: Abdel Wahab, 2012

8.1 Padronização

A especificidade de cada reação foi verificada através da temperatura específica de *melting* dos produtos, realizando uma curva de dissociação após a etapa de amplificação. Além disso, o tamanho dos produtos amplificados foi avaliados após corrida eletroforética. Para calcular a eficiência de cada reação foram utilizados cDNA de linhagens celulares (Jurkat ou RS411) diluídos em série (1:5) para construir uma curva padrão, onde o ponto de maior concentração continha cDNA correspondente a 100ng de RNA. A eficiência da reação foi calculada a partir da fórmula 2^{-Cq} . Este cálculo transforma os dados logarítmicos de Cq em um valor linear. A expressão de *PPIA*, *ABL* e *HPRT* foram testadas e o software GenEx, por meio dos algoritmos NormFinder e GeNorm, foi utilizado para escolha do(s) gene(s) de referência e cálculo do fator de normalização de cada amostra. Os programas estimam a

variação de expressão tanto intragrupo como intergrupo e calcula os valores de estabilidade do gene candidato.

8.2 Análises da expressão gênica relativa

O nível de expressão dos genes de interesse foi quantificado nas diversas condições biológicas, usando tanto o método comparativo de Cq ($\Delta\Delta Cq$) quanto o método baseado em curva padrão. Nos ensaios em células primárias, um pool de amostras de doadores saudáveis foi utilizado como amostra calibradora e os níveis de expressão gênica foram comparados entre as amostras de pacientes com MF portadores e não portadores de mutação em *ASXL1*. No caso da diferenciação granulocítica **XXXX**.

9. Análises estatísticas

Todas análises estatísticas foram realizadas no programa Graphpad Prism V.5. Para as análises estatísticas entre as amostras de pacientes e doadores saudáveis foi utilizado o teste *t student* com um intervalo de confiança de 95%. Os resultados foram apresentados em gráficos expressos como média +/- desvio padrão (DP). **Texto para análise de mais de 2 grupos de amostras.** Os resultados foram apresentados em gráficos expressos como média +/- desvio padrão (DP). Os valores foram analisados com o teste One-way ANOVA (não paramétrico) combinado com o pós teste de Tukey que permite comparar as amostras entre si. Os resultados foram considerados significativamente diferentes quando $p < 0,05$.

RESULTADOS

Neste trabalho buscamos estudar a metilação e expressão dos genes *HOX* na MFP, analisando diversos contextos biológicos. Considerando que os genes *HOX* são importantes reguladores no desenvolvimento embrionário, nosso primeiro modelo de estudo foram linhagens de células pluripotentes humanas, as iPSC e os EBs derivados *in vitro*. Para explorar um aspecto da hematopoiesis utilizamos o modelo de diferenciação granulocítica *in vitro* a partir de CTH. Também foi do nosso interesse estudar o estado epigenético e a expressão de genes *HOXA* em granulócitos primários de pacientes diagnosticados com MFP com e sem mutação no *ASXL1*.

Estágios iniciais do desenvolvimento embrionário: diferenciação de iPSC a EBs

Linhagens iPSC humanas são células pluripotentes capazes de proliferação ilimitada em estado indiferenciado *in vitro* e representam um importante modelo para o estudo de estágios iniciais do desenvolvimento embrionário humano. Neste trabalho usamos iPSC derivadas de MFP (iPSC-MFP) e de controle (iPSC-CNT) geradas e caracterizadas previamente por nosso grupo. As iPSC podem ser induzidas à diferenciação *in vitro*, por meio do ensaio de formação de corpos embrioides (EBs), gerando células representativas dos três folhetos germinativos. Em nosso laboratório, iPSC MFP e iPSC CNT (D0) foram induzidas à diferenciação e os EBs foram coletados após 4 ou 7 dias em cultura (D4, D7).



Figura 9: Ensaio de formação de corpos embrioides a partir de iPSC. Imagens mostrando a morfologia de uma colônia de iPSC no D0 (esquerda) e os corpos embrioides (EBs) formados a partir das iPSC-CNT ao final da diferenciação no D7 (direita)

Para avaliar o perfil de metilação, selecionamos na literatura primers para análise de regiões possivelmente metiladas em ilhas CpG dos genes *HOXA6,7,9,10,11,e 13* por PCR (Hayashi, 2006) e sequenciamento direto após conversão por bissulfito de sódio. As sequências dos amplicons foram visualizadas no mapa genômico através da ferramenta UCSC Genome Browser (*University of California, Santa Cruz*), como ilustrado na figura 10 para o gene *HOXA6*.

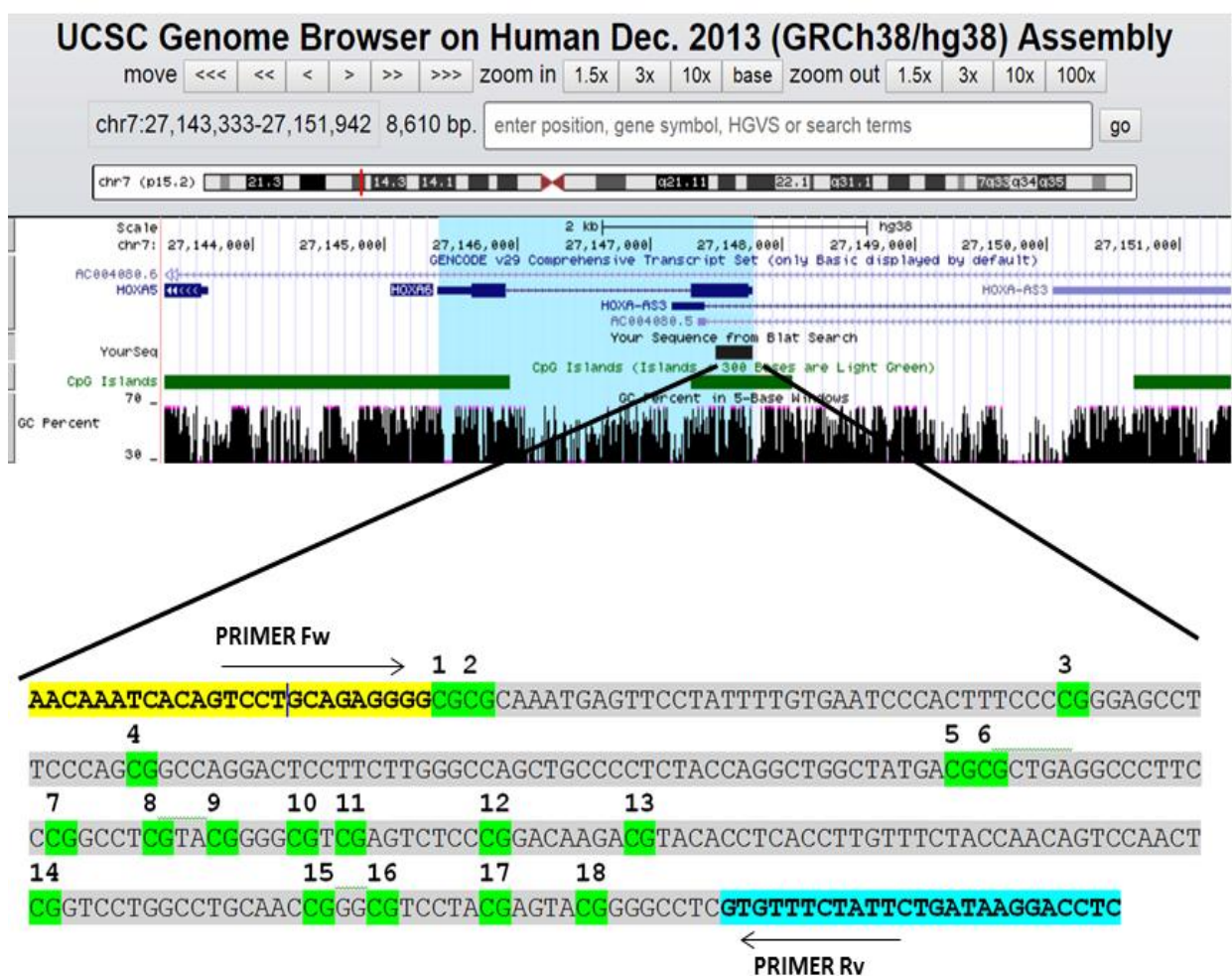


Figura 10: **Localização genômica da região analisada para *HOXA6***. Esquema ilustrativo mostrando na parte superior, a localização no cromossomo 7 da região de interesse (traço vermelho); na parte central, o gene *HOXA6* (em azul), o amplicon (em preto) e a ilha CpG (vermelho); na parte central, o gene *HOXA6* (em azul), o amplicon (em preto) e a ilha CpG (em verde); na parte inferior, a sequência do amplicon, com destaque para as 18 CpGs analisadas, em verde.

Para a padronização da PCR utilizamos DNAs sintéticos não metilado (NM), metilado (M) e parcialmente metilado (mistura de NM e M, 1:1; PM). Como controle positivo da

reação, foi usado DNA da linhagem celular UKE-1 após conversão com bissulfito e como controle negativo, foram usados DNA não convertido da mesma linhagem e água. A ausência de amplificação a partir de DNA não convertido foi indicativo da especificidade da reação, como ilustrado para a PCR do gene HOXA6 na figura 11. Foi possível padronizar PCRs para HOXA 6,7,9,10,11 e 13.

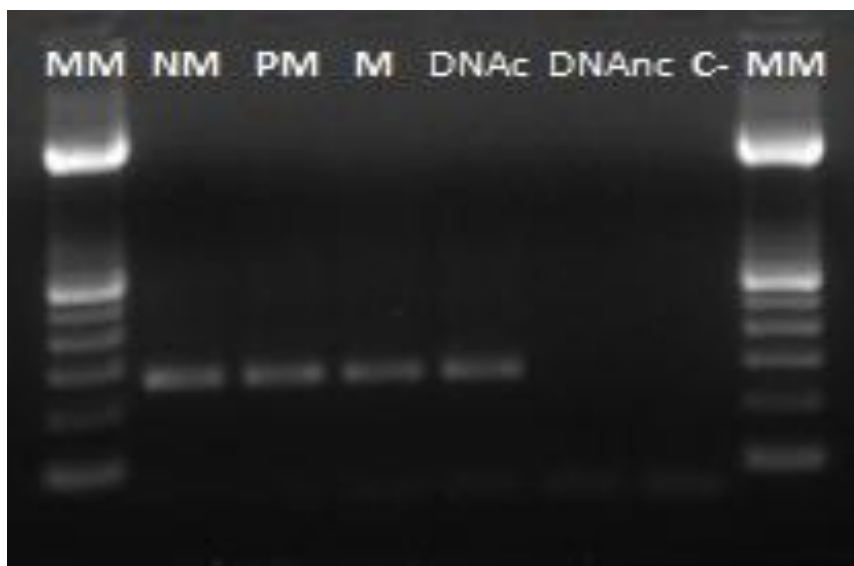


Figura 11: **Padronização de PCR para análise de metilacao HOXA6.** Imagem de gel de agarose a 2% corado com brometo de etídio (0,5ug/mL) após eletroforese para avaliação da reação de PCR. As bandas observadas correspondem ao amplicon de 287 pb do gene HOXA6. MM: Marcador de 100 pb, NM: DNA sintético não metilado, PM: DNA sintético parcialmente metilado, M: DNA sintético metilado. DNAc: DNA da linhagem UKE-1 convertido com bissulfito de sódio, DNAnc: DNA da linhagem UKE-1 não convertido, C-: Controle Negativo (água).

Os produtos de PCR assim obtidos, foram purificados e submetidos a sequenciamento direto e analisados por meio do programa Mutation Surveyor 5.1. Para determinar de maneira qualitativa o estado de metilação das citosinas, estabelecemos três categorias: 1) não metilada (NM); 2) parcialmente metilada (PM) e 3) metilada (M). Consideramos as citocinas parcialmente metiladas quando picos de citosina e timina superpostos foram observados no eletroferograma, sendo eles de tamanho equivalente ou não. Na mesma sequencia, foi verificado que citosinas localizadas fora de sítios CpG foram convertidas, resultando em timina no sequenciamento (Figura XX).

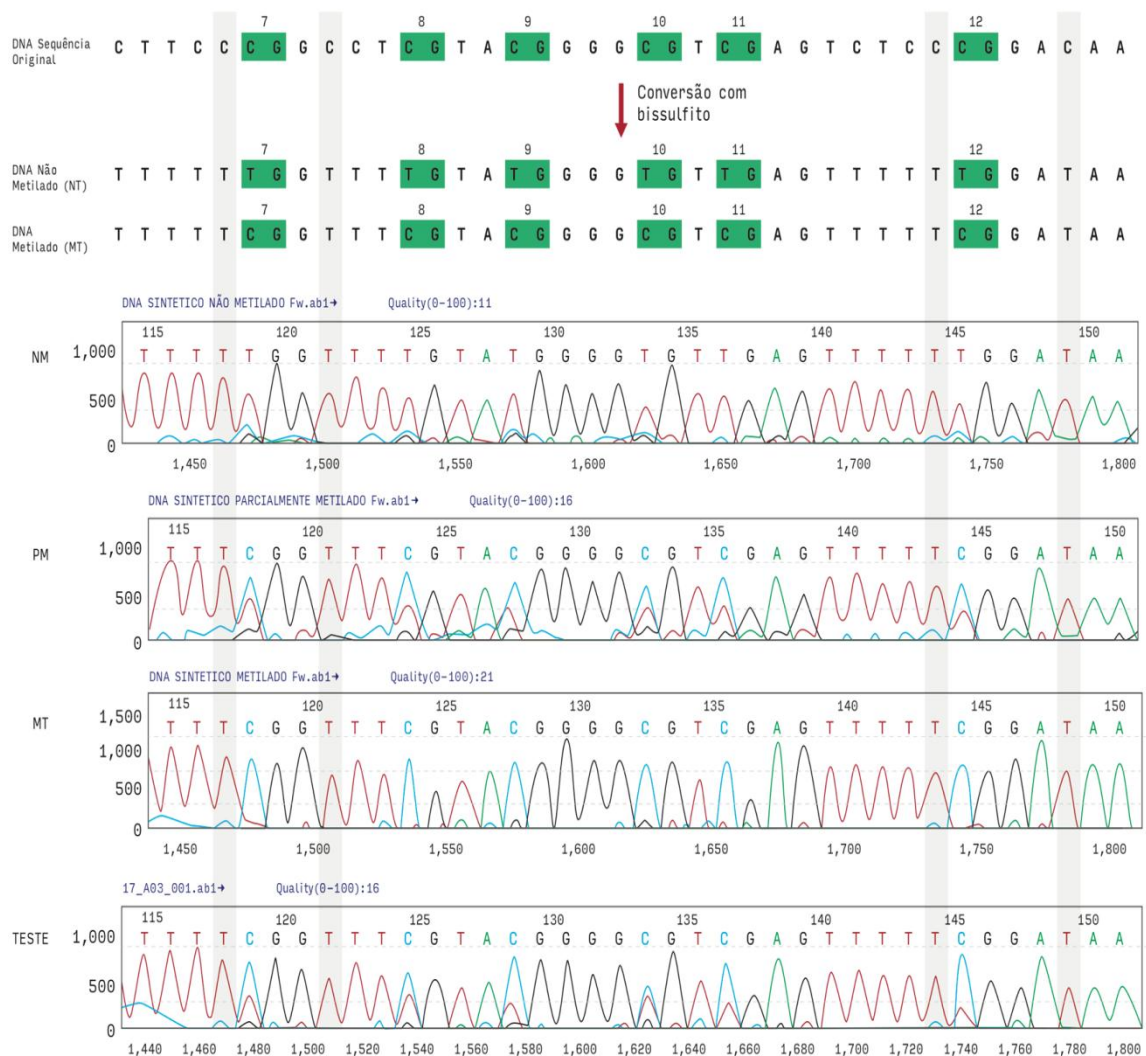


Figura 12: **Análise qualitativa de metilação de DNA.** Figura ilustrativa dos critérios de interpretação de resultado de sequenciamento. A parte superior da figura representa as seqüências de DNA original e após o tratamento do DNA com bissulfito de sódio. A parte inferior da figura corresponde aos eletroferogramas obtidos a partir de DNA sintético não metilado (NM), parcialmente metilado (PM) metilado (M) ou DNA da linhagem UKE-1 após conversão (TESTE). Seis sítios CpGs do amplicon de HOXA6 estão destacadas em verde. As caixas cinzas indicam citosinas não metiladas fora de sítios CpG

Após essas etapas de padronização, iPSC e EBs, derivados de PMF ou CNT foram obtidas, o DNA foi extraído e convertido com bissulfito de sódio. A seguir, realizamos PCR e sequenciamento direto para análise de metilação nos genes HOXA. Em nossa análise, observamos que todos os sítios CpGs nos promotores dos genes HOXA 10,11 e 13 apresentavam-se totalmente desmetilados tanto nas células iPSC pluripotentes (D0) quanto ao longo da diferenciação (D4 e D7). Por outro lado, encontramos sítios CpGs com algum grau de metilação nos genes HOXA 6, 7 e 9. Com relação ao HOXA6 foi visto que nas iPSC CNT (D0) todas as CpGs estavam parcialmente metiladas. Já nas iPSC MFP (D 0), de modo similar

a iPSC CNT, a maioria das CpG estavam parcialmente metiladas, porém as CpG 17 e 18 estavam totalmente metiladas. Ao longo da diferenciação CNT (D4 e D7), a maioria das CpG foram desmetiladas, enquanto CpG 1, 2 (D4 e D7) e 16-18 (D7) estavam totalmente metiladas. com exceção das Ilhas 17 e 18 da paciente, no D4 e D7 houve metilação total das ilhas 1 e 2 no Controle e metilação parcial nas mesmas ilhas na paciente com metilação total das CpGs 17 e 18 do Controle. Para o *HOXA7*, observamos um ganho na metilação de algumas ilhas a partir do D4 para o controle e praticamente ausência de metilação no D0 em ambos casos (PAC e CNT). Quase todos os sítios CpGs do gene *HOXA9* no D0 apresentavam se parcialmente metilados. Aparentemente houve aumento da metilação ao longo da diferenciação como observado nas ilhas 4 e 9 no controle e nas ilhas 1-5, 15 e 19 da paciente com metilação total no D7. Figura 13

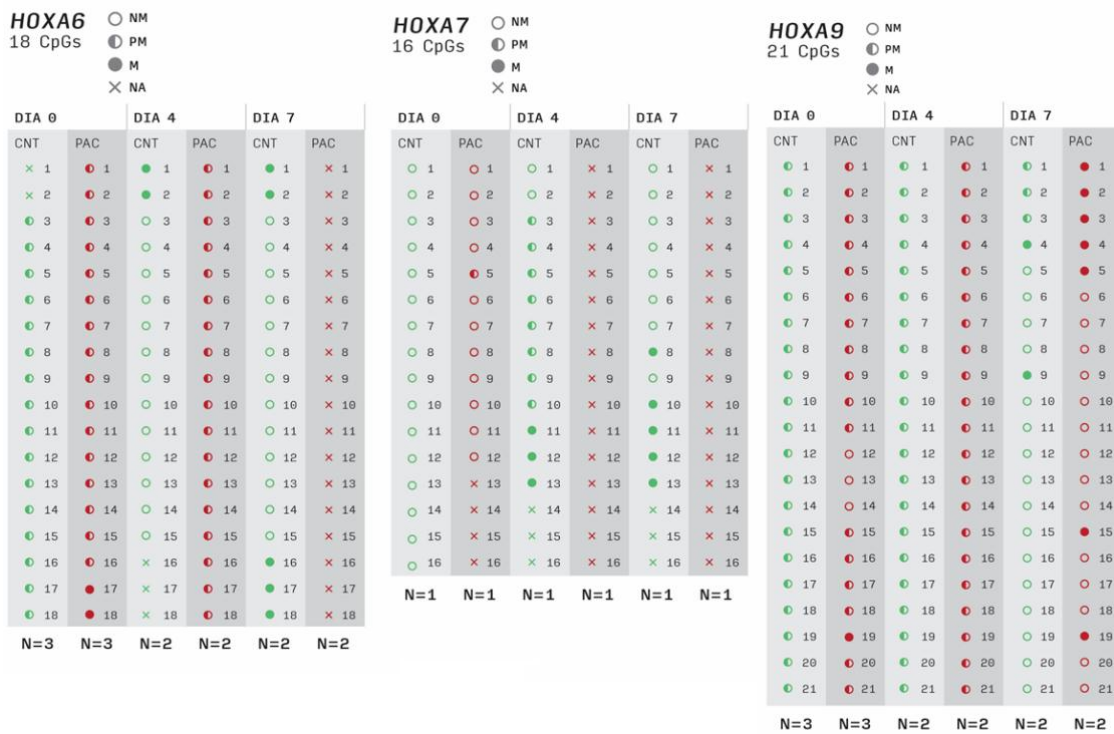


Figura 13: **Resultados do sequenciamento de DNA por bissulfito de sodio para os genes HOXA 6, 7 e 9 nos diferentes dias da obtenção de Ebs.** Os circulos representam os estados de metilação individual para cada ilha CpG analisada nos genes respectivos. O X corresponde às ilhas CpG que não foram analisadas devido a limitações próprias da metodologia utilizada. NM: CpG não metilada. PM: CpG parcialmente metilada. M: CpG metilada. NA: não analisada. CNT: EBs controle. PAC: EBs derivados de paciente MF. N: número de experimentos independentes.

NM: CpG não metilada. PM: CpG parcialmente metilada. M: CpG metilada. NA: não analisada. CNT: EBs controle. PAC: EBs derivados de paciente MF. N: número de experimentos independentes.

Para análise da expressão gênica, foram padronizadas qRT-PCR para os genes HOXA6-13, usando o intercalante fluorescente SYBR® Green (Applied Biosystems™) e primers específicos. Para a construção de curva padrão, foi utilizado cDNA de linhagem celular (Jurkat ou RS411) diluído em série, na proporção de 1:5. Os parâmetros obtidos a partir da equação da reta, no gráfico Ct versus quantidade, permitiram calcular a eficiência da reação e a especificidade de cada reação foi verificada através da temperatura específica de *melting* dos produtos, após a etapa de amplificação. Os resultados obtidos para o gene XXX estão ilustrados na figura 14.

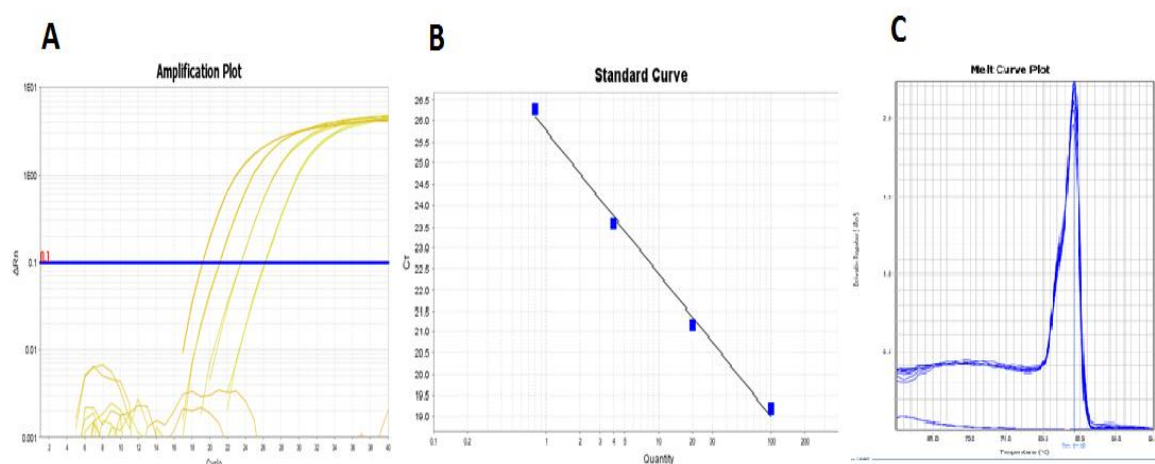


Figura 14: **Padronização da reações de qRT-PCR para o gene HOXA?? ??**. A) Curvas de amplificação: gráfico de fluorescência normalizada (ΔR_n) versus ciclo (Cycle), onde cada curva de amplificação corresponde a diferentes diluições de cDNA; em azul observa-se o limiar, corresponde ao ciclo de quantificação (Cq). B) Curva-padrão: gráfico de Cq (Ct) versus quantidade (Quantity) mostrando os pontos (100ng, 20ng, 4,0ng e 0,8ng) da curva-padrão, a partir da qual foi calculada a equação da reta e a eficiência da reação. C) Curva de melting: gráfico de derivativo da fluorescência versus temperatura, onde a especificidade da reação é verificada pela existência de um pico único.

Para selecionar o(s) genes referência a ser utilizado(s), a expressão de *ABL*, *HPRT* e *PPIA* foi testada em um grupo de amostras de PMF e CNT. Os resultados foram analisados pelo programa GenEx, que mostrou que o(s) genes mais estáveis foram *PPIA* e *ABL* (GeNorm, comparação aos pares) ou *PPIA* (NormFinder) (FiguraXX). A quantificação relativa foi feita tanto pelo método de Cq comparativo ($\Delta\Delta Cq$), quanto pela curva padrão, usando *PPIA* como gene referência.

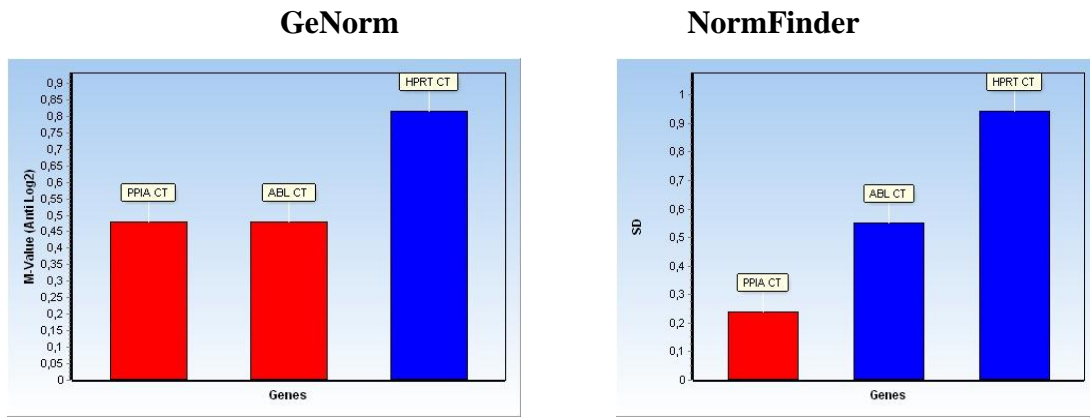


Figura 15: Seleção do gene de referência para quantificação relativa de expressão gênica por qRT-PCR. Após quantificação da expressão de PPIA, ABL e HPRT em um grupo de amostras de PMF e CNT, os dados foram analisados pelo programa GenEx. A análise pelo GeNorm indicou *PPIA* e *ABL* como genes mais estáveis, enquanto pelo Normfinder indicou o gene *PPIA*.

Após a padronização, iPSC MFP e iPSC CNT (D0) e seus EBs derivados (D4 e D7) foram submetidos à extração de RNA e síntese de cDNA. A expressão de HOXA6 e HOXA 9 foi avaliada por qRT-PCR. Com relação a HOXA6, observamos pouca ou nenhuma expressão nas células iPSCs CNT (D0) e ao longo da diferenciação (D4 e D7). Em contraste, *HOXA6* estava fortemente expresso nas iPSCs MFP e foi visto que sua expressão diminuiu ao longo da diferenciação. *HOXA9* também estava pouco expresso nas iPSC CNT e ao longo da diferenciação, porém sua expressão foi maior durante a diferenciação de EBs MFP (D4). figura 16.

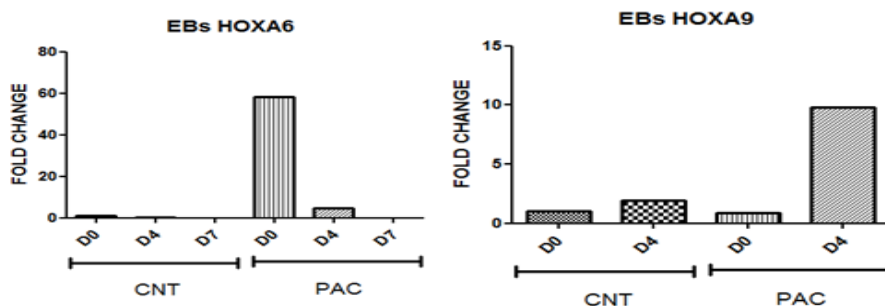


Figura 16: Expressão genica de HOXA6 e HOXA9 na diferenciação in vitro de iPSC a corpos embrioides (EBs). Os gráficos correspondem as análises realizadas para avaliação dos genes HOXA6 e HOXA9 a partir de células CD34+ de uma paciente com mielofibrose (N=1) e de um doador saudável (N=1). CNT: Experimento controle, PAC: Experimento Paciente. derivados de controle (CNT ou MFP).

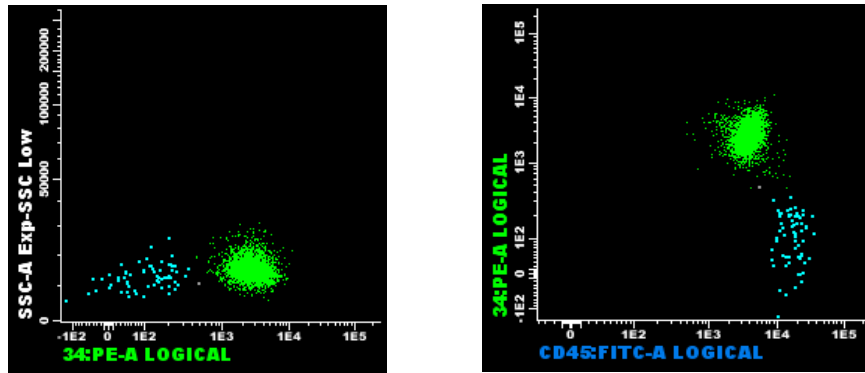


Figura 17: **Imunofenotipagem após enriquecimento em células tronco/progenitoras hematopoéticas (CTH).** A partir de células mononucleares de sangue periférico, CTHs CD34+ foram obtidas por separação imunomagnética. A fração positiva foi avaliada por citometria de fluxo usando os anticorpos anti-CD34-PE e anti-CD45-FITC. No gráfico SSC versus CD34, duas populações foram identificadas: CD34+, em verde (97%) e CD34-, em azul, (3%). No gráfico CD34 versus CD45 foi observado que a população CD34+, correspondente às CTH, apresentou expressão intermediária de CD45, enquanto a CD34-, correspondente aos linfócitos, expressão forte de CD45.

Hematopoiese. Modelo de Diferenciação granulocítica *in vitro* a partir de HSC

Hematopoese *in vitro*: diferenciação de HSC a granulócito

Para avaliar o padrão de metilação e expressão gênica de *HOXA* ao longo da hematopoese, submetemos CTH-CNT e CTH-MFP à diferenciação, derivando granulócitos *in vitro*. Para isso, células CD34+ de indivíduos saudáveis e de uma paciente com LMA pós-PMF foram obtidas por separação imunomagnética a partir de PBMC. Por imunofenotipagem, foi verificado que na fração enriquecida mais de 90% células eram CD34+ / CD45+ (92,6%, n=5) Figura 17.

As CTH foram então cultivadas durante 21 dias em meio líquido sem soro, na presença de SCF, IL-3 e G-CSF, que favorecem a diferenciação para a linhagem granulocítica. As células foram contadas em câmara de Neubauer e coletadas no dia 0 (D0 ou CTH) e após 7 (D7), 14 (D14) ou 21 dias (D21) em cultura. A partir de CTH-CNT, houve expansão significativa do número de células em cultura (47-1383 vezes, após 21 dias). Em contraste, para CTH-MFP o aumento no número de células observado no mesmo período se limitou a 1,6 X Figura XXX.

A ————— **B** ————— **C**

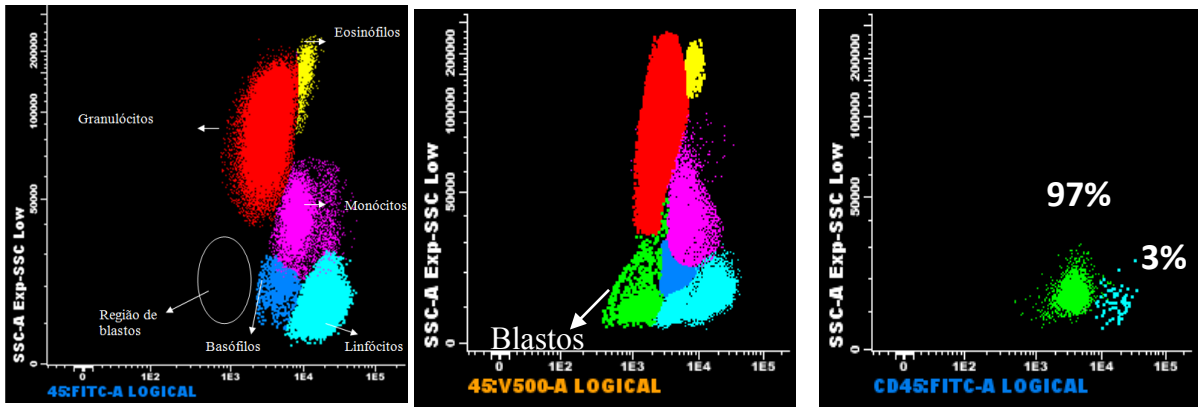


Figura 18: **Localização das populações no marcador CD45-FITC.** Gráficos representativos da região correspondente as células CD34+ no plot para o marcador CD45-FITC utilizado na avaliação do processo de purificação com colunas imunomagnética. A)* sangue periférico de doador saudável (ausência de blastos). B)* C)* Pureza= 92,6% (N=5) * falta ver com a Claudia para melhorar legenda

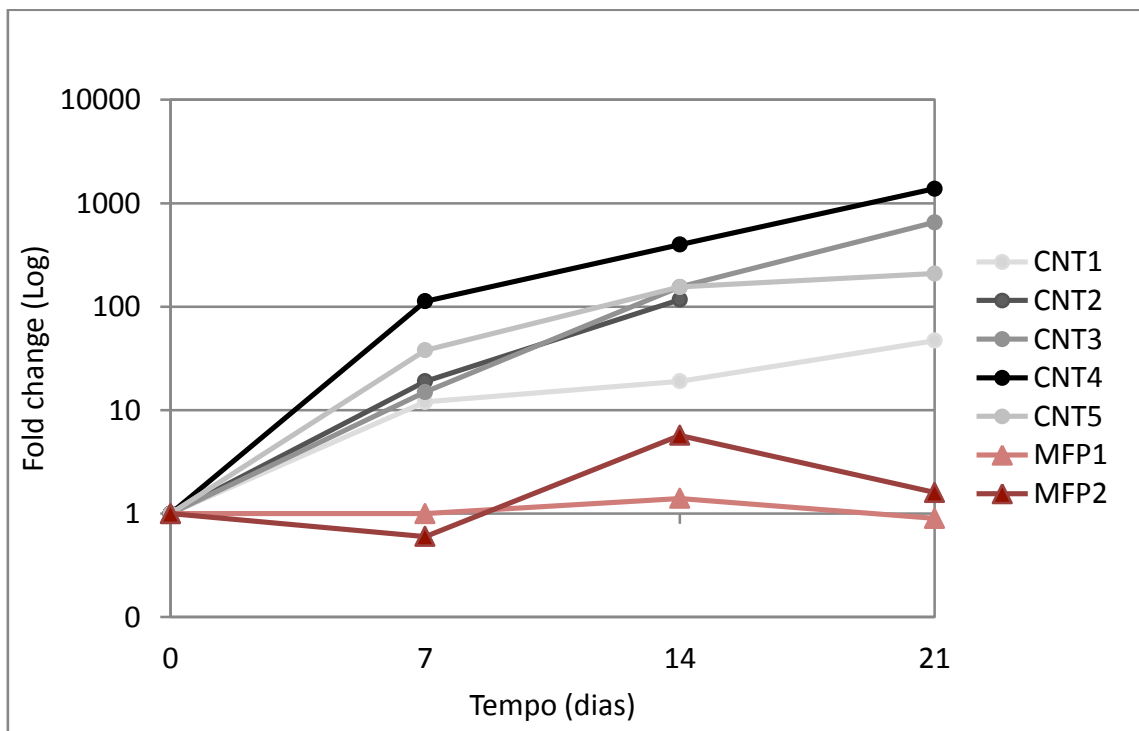


Figura xxx **Expansão do número de células ao longo da diferenciação granulocítica.** As células em cultura foram contadas em câmara de Neubauer com exclusão de células não viáveis coradas por Trypan Blue. No gráfico fold change versus tempo, o número de células nos dias 7, 14 e 21 é comparado ao dia 0, tanto para os experimentos controle (CNT, n=5) quanto para paciente com leucemia mieloide aguda pós-mielofibrose primária (MFP, n=2).

O processo de diferenciação *in vitro* foi monitorado por citometria de fluxo, após 7, 14

e 21 dias. Foi possível identificar um aumento gradual no número de células expressando CD15 e CD11b, tanto para CNT quanto para MFP, indicando a diferenciação das células em cultura para a linhagem granulocítica Figura x.

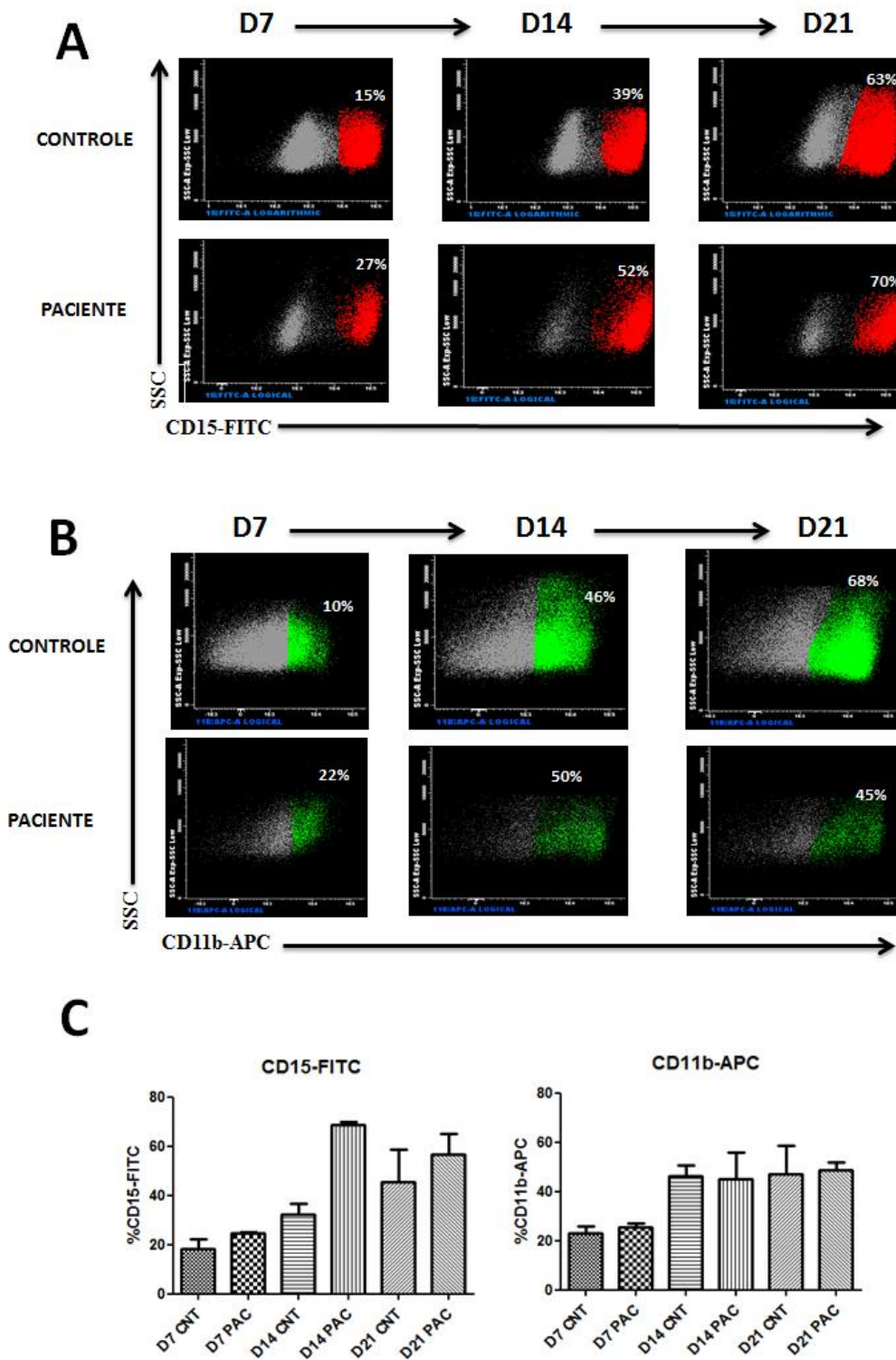


Figura 19: Imunofenotipagem ao longo da diferenciação granulocítica. Células controle (CNT) ou de paciente com leucemia mieloide aguda pós-mielofibrose primária (MFP) foram coletadas após 7, 14 ou 21 dias em cultura e marcadas com painel de anticorpos para análise

por citometria de fluxo. **A)** Nos gráficos SSC versus CD15, duas populações foram observadas: CD15+, em vermelho (% em destaque) e CD15-, em cinza. **B)** Nos gráficos SSC versus CD11B, duas populações foram observadas: CD11B+, em verde (% em destaque) e CD11B-, em cinza. **C)** Gráficos de percentual de células positivas (CD15+ ou CD11B+) versus tempo (dias de cultura), mostrando a média \pm desvio padrão para os experimentos com CNT (n=4) e MFP (n=2) (EP)

O processo de diferenciação *in vitro* foi monitorado por citometria de fluxo, após 7, 14 e 21 dias. Foi possível identificar um aumento gradual no número de células expressando CD15 e CD11b, tanto para CNT quanto para MFP, indicando a diferenciação das células em cultura para a linhagem granulocítica Figura x.

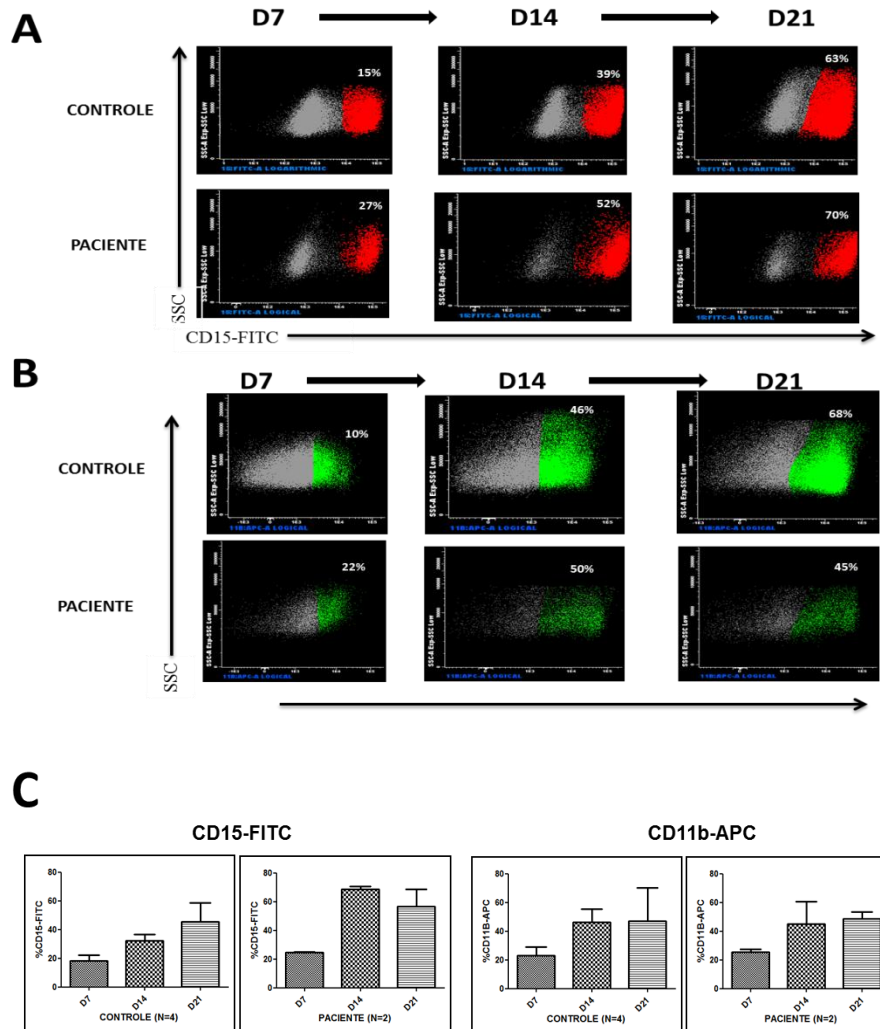


Figura 20: XXXX

Além disso, as células obtidas em cultura também foram avaliadas quanto a sua morfologia. Após 7 dias de cultura (D7), houve predomínio de células com morfologia pouco

diferenciada ou blastos da linhagem mieloide: mieloblastos e promielócitos. No dia 14, foram encontrados frequentemente metamielócitos e neutrófilos em bastão. Já no dia 21, neutrófilos segmentados foram identificados, além de alguns monócitos Figura 20 .

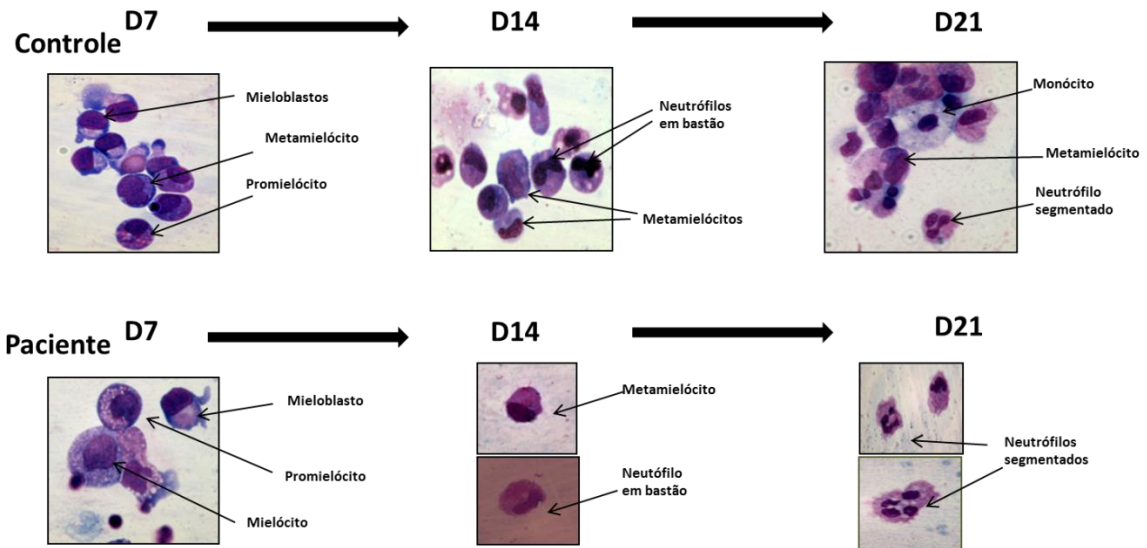


Figura 21: XXXX

Depois de ter caracterizado as células obtidas em cultura, DNA e RNA foram extraídos para análise da metilação de regiões dos genes *HOXA* e quantificação de expressão gênica. Não observamos metilação, parcial ou total, nos sítios CpGs analisados dos genes *HOXA7, 9, 10, 11 e 13*, em CTH ou durante a diferenciação *in vitro* para granulócitos. No caso do gene *HOXA6*, as análises do sequenciamento mostraram que nas CTH-CNT (D0) os primeiros sítios avaliados (1 a 4) estavam desmetilados, enquanto outras CpG da mesma região apresentaram metilação parcial, padrão esse que se manteve ao longo da diferenciação. Em contraste, a maioria das CpG estava desmetilada nas CTH-MFP. Ao longo da diferenciação granulocítica das CTH-MFP, mais sítios CpG apresentaram metilação parcial e ao final de 21 dias em cultura, os granulócitos derivados *in vitro* de MFP apresentaram padrão de metilação em *HOXA6* similar aos derivados de CNT FiguraXXX. Essa figura vai ficar só *HOXA6*.



Figura 22: **Metilação do DNA em região promotora de HOXA em CTH e durante a diferenciação granulocítica in vitro.** Após conversão de DNA com bissulfito de sódio e PCR para amplificação de interesse em *HOXA6*, foi realizado sequenciamento direto dos produtos. Análise qualitativa dos dados para cada CpG do amplicon foram representadas como: NM- CpG não metilada, círculo vazio; PM: CpG parcialmente metilada, círculo meio preenchido; M- CpG metilada, círculo totalmente preenchido; não avaliado- X. Os resultados correspondem à análise em células controle (CNT) ou derivadas de leucemia mieloide aguda pós-mielofibrose primária (MFP), da célula tronco/progenitores hematopoéticos (CTH, D0) e após 7, 14 ou 21 dias em cultura (D7-21). n representa o número de experimentos independentes avaliados.

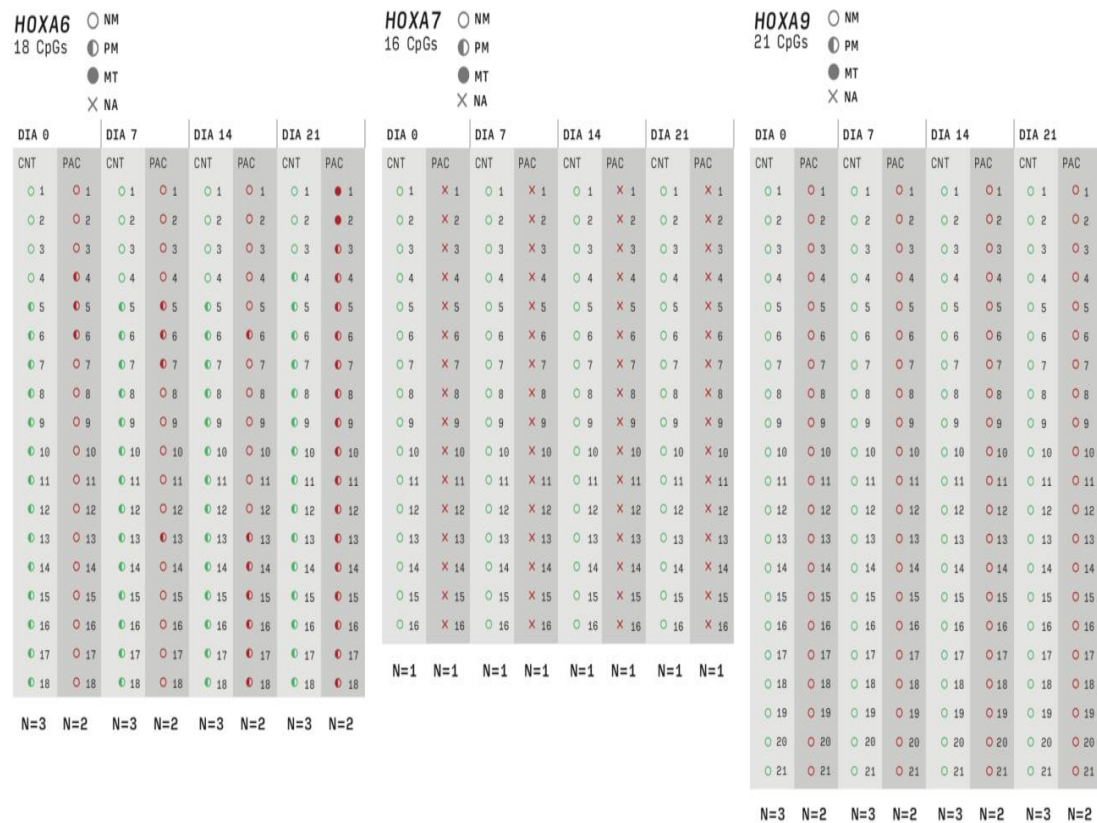


Figura 23: XXXXX

Esse parágrafo precisa estar adequado ao gráfico novo: Na diferenciação *in vitro* a partir das células CD34+, foi observada uma diferença entre a expressão do gene *HOXA6* nos diferentes dias. No D0 tanto para o grupo controle quanto ao de pacientes foi observada uma baixa expressão, que aumentou no D7 e reduziu no D21 Na avaliação da expressão do gene *HOXA9* observamos uma tendência similar à do *HOXA6* no experimento controle, entretanto para o paciente houve um aumento na expressão a partir do D7 porem não reduziu no D14 FiguraXXX.

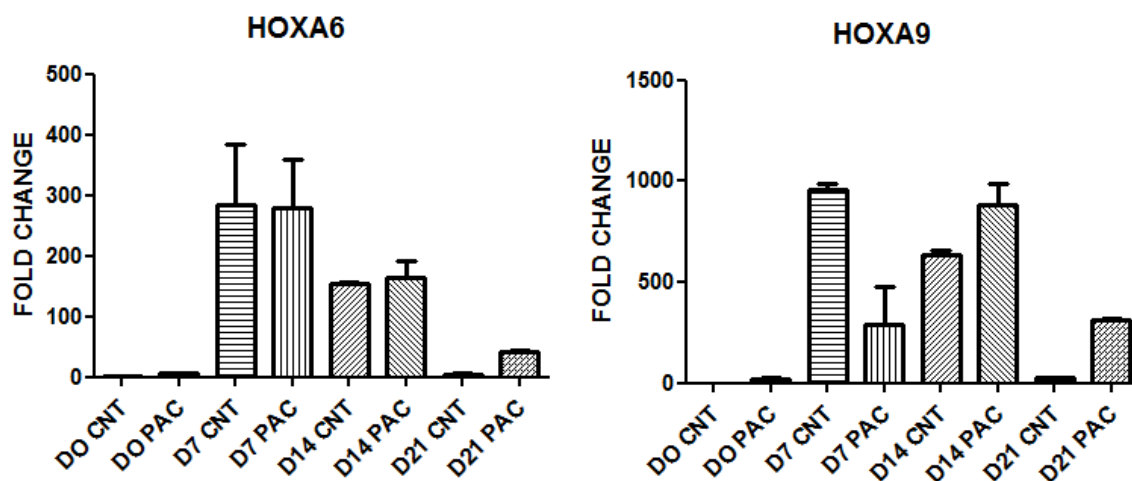


Figura 24: **Expressão gênica de HOXA durante a diferenciação granulocítica in vitro.** Os gráficos de Fold Change versus tempo (dias) correspondem à quantificação da expressão de *HOXA6* e *HOXA9* em células tronco/progenitores hematopoéticas (CTH) e ao longo da diferenciação granulocítica, para controles saudáveis (CNT) e paciente com leucemia mieloide aguda pós-mielofibrose primária (MFP). Os resultados foram apresentados como expressão relativa (Fold Change), sendo CTH-CNT a amostra controle e ABL o gene de referência

Células hematopoéticas maduras: modelo ex vivo, amostras primarias de pacientes e controles

Results Caracterização da coorte de pacientes

Num estudo previo realizado pelo nosso grupo foram caracterizadas 35 amostras de granulócitos de pacientes com diagnóstico de MF. Os DNAs destes pacientes, foram analisados para a presença da mutação JAK2 V617F, indels no éxon 9 de CALR e para mutações no éxon 10 de MPL. Além disso, as amostras foram analisadas por Next Generation Sequencing (NGS) utilizando a plataforma Ion Torrent para um painel personalizado de 37 genes marcadores de neoplasias mieloides, incluindo o ASXL1.

Para nosso estudo, a partir da coorte previamente descrita, foram selecionadas 25 amostras de granulócitos de pacientes diagnosticados com MF e 10 amostras de sangue periférico de doadores saudáveis (controles). A idade mediana do nosso grupo de pacientes foi de 63 anos, com prevalência do gênero masculino (16/ 9 casos). As mutações que foram identificadas neste grupo de pacientes estão apresentadas no CuadroXX e os dados clinicos estão sumarizados na tabela 6. XXX

	P 1	P 2	P 3	P 4	P 5	P 6	P 7	P 8	P 9	P 10	P 11	P 12	P 13	P 14	P 15	P 16	P 17	P 18	P 19	P 20	P 21	P 22	P 23	P 24	P 25	
JAK2 V617F	■			■	■	■				■	■					■				■			■			
MPL																		■								
CALR								■				■		■	■								■		■	■
ASXL1														■									■	■	■	■
TET2				■										■												
SRSF2																										
TP53														■						■						
DNMT3A																										
EZH2														■						■						
U2AF1																			■							
SF3B1						■					■															
KRAS																								■	■	
IDHI				■																						
PTN11																									■	

Tabela 6: **Mutações encontradas na coorte de pacientes.** As células preenchidas em azul representam os pacientes com mutação. P: Paciente

Paciente (P)	Sexo	Idade (anos)	Hb (g/L)	Nº leucócitos ($\times 10^9/l$)	Nº plaquetas ($\times 10^9/l$)
P1	M	64			
P2	M	47	110		
P3	M	70	78	57,60	79
P4	M				
P5	M	69	97	7,60	222
P6	M	65	86	21,70	1222
P7	F	72	112		
P8	F	50	110	6,00	130
P9	F		130	14,1	382
P10	F	67	127	17,20	435
P11	M	77	95	13,30	485
P12	M	70	92	12,50	1435
P13	M				
P14	M	48	79	2,20	314
P15	F	60	107	8,40	184
p16	M	63	194	13,50	1096
P17	M	42	130		
P18	M	75	72	3,90	107
P19	F	50	126	10,30	804
P20	F				
P21	M	55	100	5,01	112
P22	M	56	110	11,80	329
P23	M	64	40	6,60	147
P24	F	49	70	3,80	237
P25	F	59	93	43,40	880

Tabela 7: tabela com dados clínicos

Para avaliar o perfil de metilação dos genes *HOXA6,7,9,10,11,e 13* nas amostras primarias selecionamos 2 doadores saudáveis e 10 pacientes com MF da coorte previamente caracterizados. Sendo 4 portadores de mutação em *ASXL1* e 6 pacientes *ASXL1-WT*. Para o caso do *HOXA6* (representante anterior do cluster), observamos um padrão de metilação semelhante a partir da ilha numero 3 em todas as amostras de pacientes MF estudadas. Para os genes mais posteriores, *HOXA7, 9, 10, 11 e 13* não observamos metilação nos respectivos

sítios CpGs dos promotores nas amostras avaliadas. Os resultados destes ensaios estão apresentados na figuraXX.

Levando em consideração o resultados de alguns estudos em que foi demonstrado que o gene TRAF6 participa na regulação negativa da ativação da via de sinalização JAK-STAT interagindo com STAT3 e que também pode ser um alvo importante do gene *ASXL1* com relevancia nas NPMs (Juncheng Wei et al., 2012 e Nischal et al., 2013), resolvimos estudar o perfil de metilação do promotor deste gene nas mesmas amostras e não encontramos padrão de metilação diferencial entre pacientes *ASXL1*MT e WT (dados não mostrados).

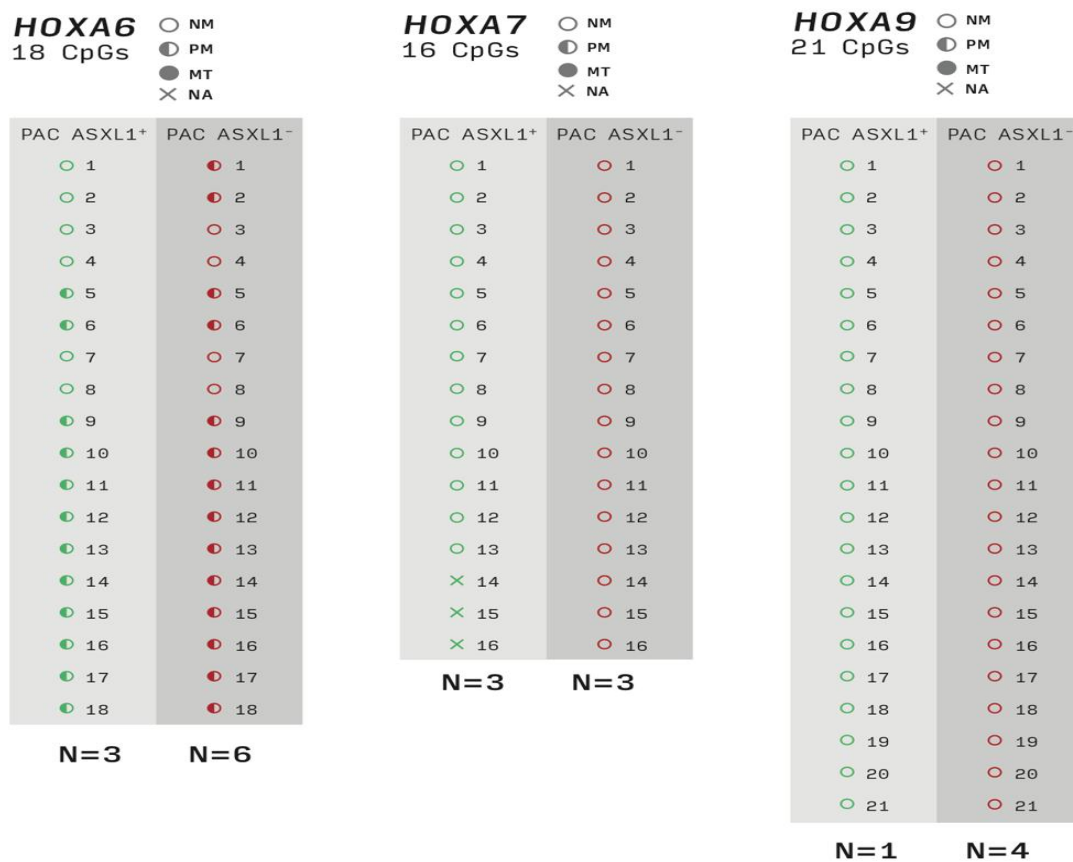


Figura 25: **Resultados do sequenciamento de DNA por bissulfito de sodio para os genes HOXA 6, 7,9,10, 11 e 13 em amostras primarias de pacientes com MF selecionados para o estudo.** Os círculos representam os estados de metilação individual para cada ilha CpG analisada nos respectivos genes. O X corresponde às ilhas CpG que não foram analisadas devido a limitações próprias da metodologia utilizada. NM: CpG não metilada. PM: CpG parcialmente metilada. M: CpG metilada. NA: não analisada. PAC *ASXL1*+: paciente com MF portador de mutação no gene *ASXL1*. PAC *ASXL1*-: paciente com MF sem mutação no gene *ASXL1*. N: número de amostras analisadas.

Results expressao genica amostras primarias

Avaliamos a expressao dos genes *HOXA6,7,9,10,11,13*, e *ASXL1* nas 25 amostras de granulócitos de pacientes com MF da população previamente descrita e 10 amostras de sangue periférico de doadores saudáveis.

Após da padronização, realizamos as reações de expressão gênica dos genes *HOXA6,7,9,10,11,13*, e *ASXL1* em três grupos de amostras:

- Pacientes com MF portadores de *ASXL1* WT (N=21)
- Pacientes com MF portadores de *ASXL1* mutado (N=4)
- Grupo controle (N= 10).

Ao total das 25 amostras de pacientes avaliadas para expressão do gene *ASXL1*, se vem não observamos diferenças estatisticamente significativas entre os grupos de WT (NM) e mutados (MT) houve um paciente (P24), portador da mutação p.G646fs*12 que apresentou níveis de transcritos superiores em relação aos outros membros do mesmo grupo. Para esta amostra também foram encontradas mutações em *CALR*, *KRAS* e *PTN11*. No caso do grupo de pacientes NM também observamos algumas amostras com níveis de transcritos mais elevados. Dentro deste grupo os pacientes P15 e P12 eram portadores de mutação para *CALR*; os pacientes P5, P10 e P18 apresentaram a mutação *JAK2V617F*, sendo o P18 também portador de mutação em *U2AF1*. Figura 24.

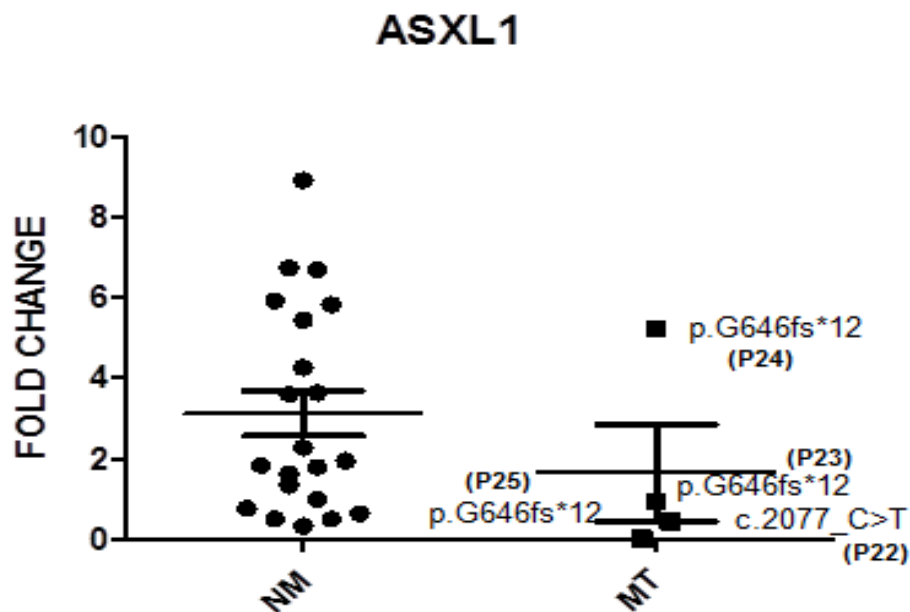


Figura 26: **Expressão gênica relativa de ASXL1 em amostras primárias.** (N =25). Não houve diferença estatisticamente significativa nos níveis de expressão nos pacientes ASXLWT quando comparados ao ASXL1 mutado. Os números indicam a mutação detectada nas 4 amostras do grupo mutado. NM: Não mutado para o gene *ASXL1*. MT: Mutado para o gene *ASXL1*. P: Paciente.

Na figuraXXX estão apresentados os dados de expressão obtidos para o painel de genes *HOXA6*, *7*, *9*, *10*, *11* e *13* nas 25 amostras avaliadas. Não observamos diferenças significativas nos níveis de expressão entre os grupos de pacientes WT (NM) e mutados (MT) em nenhum dos casos.

Para os genes *HOXA6*, *7* e *10* houve um paciente NM (P19), portador de mutações em *TP53* e *EZH2* e um paciente M (P25), portador de mutação em *CALR* que apresentaram níveis de transcritos superiores em relação aos outros membros do mesmo grupo.

Sete pacientes NM (P1, P2, P5, P12, P15, P20 e P21) e dois pacientes M (P23 e P24) apresentaram níveis de expressão mais elevados dentro dos seus respectivos grupos para os genes *HOXA9*, *11* ou *13*. Dos quais dois pacientes NM (P1 e P5) e um paciente M (P23) eram portadores da mutação *JAK2V617F*; Os pacientes P12 e P15 apresentaram mutações em *CALR*. No paciente NM P20 foi detectada a mutação *JAK2V617F* e nos pacientes NM P1 e P21 não foram detectadas mutações no painel avaliado. Figura 25.

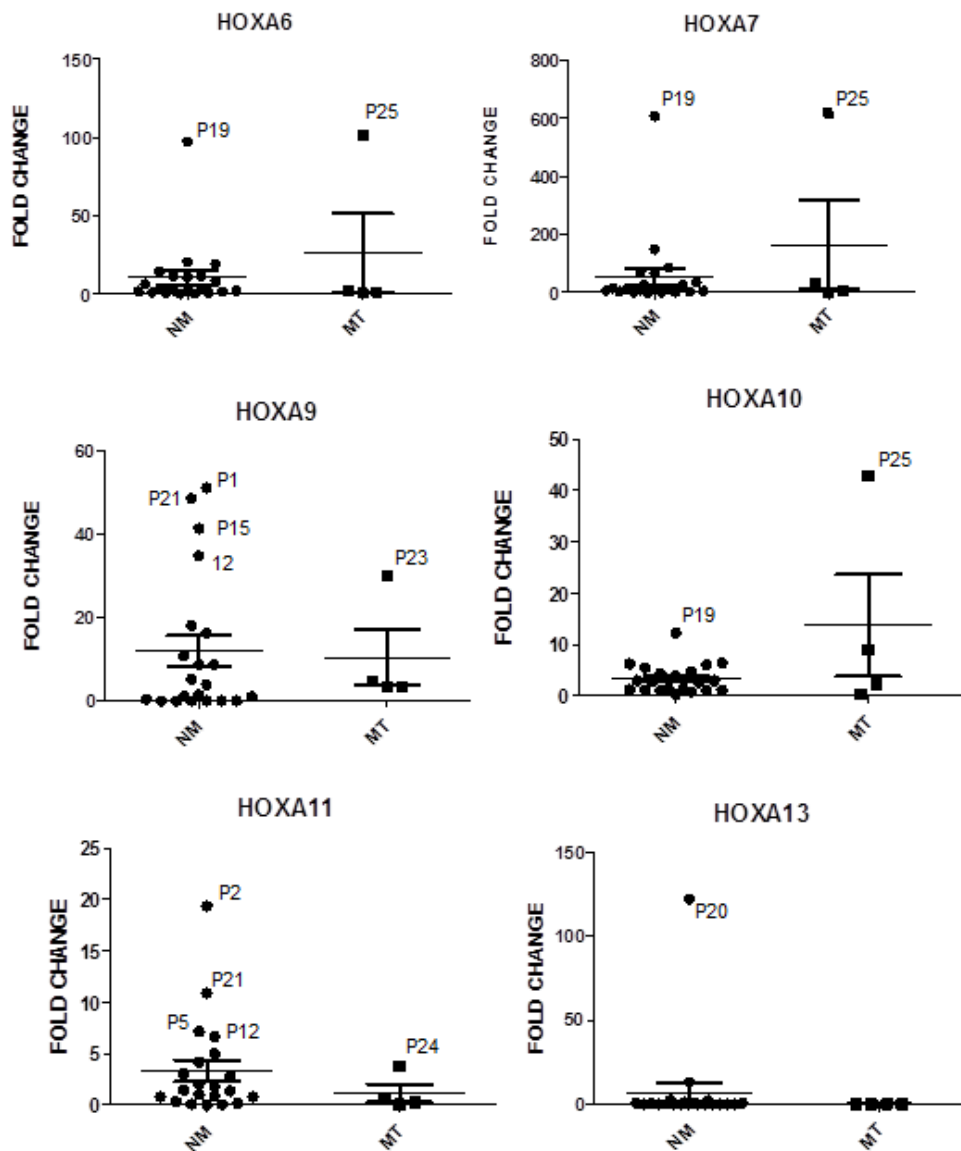


Figura 27: **Expressão gênica relativa de HOXA6,7,9,10,11e 13 em amostras primárias (N =25).** Não houve diferença estatisticamente significativa nos níveis de expressão para os genes avaliados nos pacientes *ASXLWT* quando comparados aos *ASXLI* mutados. Os números destacam os pacientes em que se observaram níveis de transcritos mais elevados dentro do mesmo grupo . NM: Não mutado para o gene *ASXLI*. MT: Mutado para o gene *ASXLI*. P: Paciente.

DISCUSSÃO

Os genes Hox codificam proteínas de ligação ao DNA que são ativados de em sequência de uma maneira temporal e espacial conhecida como o “Código HOX”. Através de diversos modelos e ensaios funcionais foi possível determinar a existência do “Código *HOX*” nos vertebrados que é caracterizado basicamente pelas seguintes regras: (1) **Colinearidade espacial**. A localização 3'→5' dos genes no cromossomo se corresponde com a maneira em que são expressos no eixo antero-posterior de acordo com o padrão corporal específico durante o desenvolvimento embrionário. (2) **Colinearidade temporal**: a expressão genética ocorre de maneira sequencial em direção da extremidade 3' anterior para a 5' posterior. (3) **Prevalência posterior**: há uma tendência quantitativamente maior na expressão dos genes do extremo 5' sobre os mais anteriores. (4) **Expressão sobreposta**: a presença de domínios de expressão idênticos entre genes parálogos indica certo grau de redundância funcional. (Lappin, 2006, Wellik, 2007).

Modificações nos padrões de expressão gênica de genes *HOX* definem a identidade celular e a posição dos segmentos do corpo ao longo do eixo A-P no embrião. Padrões específicos de expressão gênica são transmitidos às células filhas durante a divisão celular, mediante um processo denominado manutenção transcricional. Postula-se que este mecanismo deve ser epigenético, porque a mesma sequência de DNA é herdada por todas as células, embora que os padrões de expressão gênica sejam diferentes. Beck, 2010.

Gildea *et. al.*, identificaram 5 genes do PcG cujas mutações inesperadamente amplificavam o fenótipo do duplo-mutante do *trxG*. Esse grupo propôs que esses genes fossem chamados Enhancers of trihorax and Polycomb (ETPs) e demonstraram que estão envolvidos na manutenção da ativação e do silenciamento gênico. Até o momento, só foram demonstradas interações moleculares entre ETPs e esses complexos, entretanto nenhum dos ETPs foi encontrado em complexos nucleares de PcG ou *trxG*. Assim, o termo ETP deve ser mantido para as proteínas de manutenção que desempenham um papel duplo nas funções PcG e *trxG* sem pertencer a nenhum complexo em particular. Gildea JJ, 2000, Beck 2010.

Ainda não se sabe como as proteínas dos complexos PcG ou *trxG* são recrutadas para um local específico nem como os ETPs promovem a ativação ou a repressão de um gene alvo definido. Com o intuito de esclarecer esses interrogantes, foi proposto um modelo de duas etapas na transição progressiva de um estado de cromatina inativa (fechada) para ativa (aberta), propagada pelo cluster HOX no sentido de 3' a 5'. Chambeyron e Bickmore, 2004. Em concordância com este modelo uma alteração que afeta o locus completo tem impacto na estrutura da cromatina que resulta em modificações de histonas e descondensação de

cromatina gerando um estado inicial de transcrição. Por sua vez, isto é propagado a través de mudanças conformacionais que progridem no sentido 3'→5' permitindo a expressão programada de genes ao longo do cluster. Paralelamente, respeitando a colinearidade *HOX*, ocorre uma abertura seqüencial da cromatina, iniciando no final 3' de um cluster e movendo-se sucessivamente em direção ao 5'. Explicando assim o fenômeno que conduz à liberação do silenciamento primeiro na extremidade 3' e em seguida, a expressão do extremo 5' de uma maneira mais tardia. Chambeyron e Bickmore, 2004; Duboule e Deschamps, 2004.

Utilizando ensaios de imunoprecipitação da cromatina (ChIP) e análises de DNA de alta resolução em células embrionárias (ES) de camundongo, Bernstein et al. ,2006 analisaram padrões de modificação H3K4me3 e H3K27me3 em regiões com abundantes elementos não codificantes altamente conservados denominadas HCNE (do inglês HCNE-Rich Regions). Assim como publicado em estudos previos (Bernstein et al. 2005; Kim et al. 2005), a grande maioria dos locais de início da transcrição (SSTs) foi identificada como sendo marcada por H3K4me3. A distribuição de H3K27me3 foi geralmente mais ampla e, 75% dos locais de H3K27me3 abarcou os SSTs que também foram marcados por H3K4me3. A partir destes achados, os autores propuseram o termo de “domínio bivalente” para identificar as regiões da cromatina relacionadas aos genes que carregavam marcas ativadoras (H3K4me3) e repressivas (H3K27me3) simultaneamente. A maioria desses genes bivalentes codificam para fatores de transcrição de importância para o desenvolvimento, como os genes *HOX* . Embora descrito pela primeira vez em células ES, onde esses domínios bivalentes são mais prevalentes, neste trabalho, também foi observado que apesar da presença de H3K4me3, genes bivalentes são expressos em níveis muito baixos . Por outro lado, após a diferenciação em direção à linhagem neuronal, alguns genes bivalentes que foram expressos, perderam a marca H3K27me3, enquanto aqueles que foram silenciados perderam H3K4me3 mas retiveram H3K27me3. Bernstein , 2006 A partir dessas observações chegou-se ao modelo intrigante de que os domínios bivalentes mantêm os genes do desenvolvimento em um estado silencioso nas células ES, ao mesmo tempo em que os mantêm potencialmente ativados para posterior expressão após diferenciação. Voigt, 2013

Com os avanços de Thompson *et al.* 2007 e Yamanaka *et al.* 2007 na pesquisa com células-tronco, o efeito específico dos genes *HOX* nas células-tronco foi rigorosamente investigado. Por exemplo, Atkinson *et al.*, 2008 constatou que, em células-tronco embrionárias humanas (hESCs), o cluster *HOXA* é silenciado epigeneticamente: o DNA muda para uma conformação de cromatina aberta quando as células são induzidas a diferenciar pelo ácido retinóico. Shah, 2010

A metilação diferencial do DNA parece correlacionar-se com a expressão gênica nas margens das ilhas CpG, assim como nas ilhas CpG. Embora o foco da maioria dos estudos esteja nas ilhas CpG localizadas em promotores, os resultados do trabalho publicado por Irizarry et al no ano 2009, sugerem que a maior parte da metilação do DNA aberrante no câncer ocorre nas margens das ilhas CpG, inclusive acima de 2 Kb distantes do sitio de iniciação da transcrição como foi demonstrado neste estudo para o câncer de colon. Irizarry 2009

Se bem os genes *HOX* foram inicialmente descritos como reguladores importantes do desenvolvimento embrionario, atualmente contamos com crescentes evidencias sobre sua participação nos mecanismos que regulam a hematopoiesis em humanos. Yang, 2011. Esses genes são expressos em todos os progenitores hematopoéticos num padrão característico. Os da região 3' (caracterizados pelos números 1 a 6) são altamente expressos nas células mais primitivas (ou seja, nas HSCs), enquanto os genes da região 5' (*HOX7 a 13*) predominam em subpopulações celulares mais diferenciadas (representadas pelo fenótipo CD34-). Guo, 2003. Além disso, os genes *HOX* são expressos de maneira aparentemente específica da linhagem, com *HOXB* e alguns genes de cluster *HOXC* preferencialmente expressos em células com características eritróides e genes de cluster *HOXA* em linhagens celulares com fenótipo mielóide. (Lawrence et al., 1996). Nos progenitores mielóides de granulócitos / macrófagos foi detectado um predomínio de expressão de genes localizados na região 5' do cluster (*HOXA9, B9, A10*). Sauvageau, 1994; Celetti, 1993.

Considerando os resultados do estudo publicado por Kumar et al, 2004 e os previamente citados, foi possível avaliar alguns aspectos da implicação biológica do código *HOX* na hematopoiese. Por um lado, foi observado que os genes *HOX* são ativados coordenadamente (sentido 3'→5') tanto nas células progenitoras hematopoiéticas normais quanto em células de camundongos Mll-AF9^{-/-} na fase previa à transformação leucêmica (células pré-leucêmicas) e que seguem o mesmo padrão de expressão colinear observado durante o desenvolvimento embrionário. Além disso, foi visto que grupos inteiros (ou grandes regiões de um cluster) são ativados ou desativados de uma maneira linhagem específica. (Kumar et al, 2004). Isto levou à proposta do “código *HOX* hematopoiético” que considera que a regulação da proliferação e diferenciação nas células hematopoiéticas estariam influenciadas por um padrão de expressão que abarca uma combinatória de genes do mesmo cluster com características similares as observadas no desenvolvimento embrionario assim como as respostas aos factores externos ou microambientais poderiam desempenhar um papel primordial na determinação da linhagem (modificações epigenéticas). Wei, 2008; Yang, 2011.

Uma questão que ainda permanece em aberto é como esses fatores ou reguladores de transcrição são recrutados sequencialmente para os genes HOX alvo. Para isto, foi proposto um modelo de regulação epigenética de iniciação e manutenção da transcrição de genes *HOX* a través do recrutamento sequencial de proteínas PcG-TrxG para os locais PRE / TRE do gene dependente das mudanças no estado de metilação de sítios CpGs no DNA e modificações pos-traducionais nas histonas. Esta ideia pode ser exemplificada com a regulação da expressão de genes *HOXA* pelo complexo MLL (do inglês, Mixed Lineage Leukemia). O MLL se liga a clusters específicos de resíduos de CpG no locus do *HOXA9* e os protege da metilação do DNA em células de fibroblastos embrionários de murinos (MEFs). Erfurth *et al.*, 2008. O processo acontece da seguinte maneira: (a) O complexo de iniciação contendo Cdx4 inicia a ativação do *HOX* na região promotora, enquanto o complexo PcG remodela a estrutura da cromatina e demarca o domínio da mesma. Para manter o estado ativo *HOX*, os complexos PcG/TrxG (supercomplexo MLL) são recrutados para garantir um equilíbrio dinâmico entre as marcas de ativação e repressão nas histonas, como a di / tri metilação H3K4 (H3K4M2 / M3), H3K9M2 / M3 e H3K27M2 / M3 (b) Para o silenciamento da expressão de *HOX*, o estado de metilação de H3K9 e H3K27 além da ação da proteína Ezh2 do complexo PcG favorecem a metilação do DNA alvo resultando no silenciamento gênico estável porém reversível do gene *HOX* em questão. Figura XXX He et al 2011.

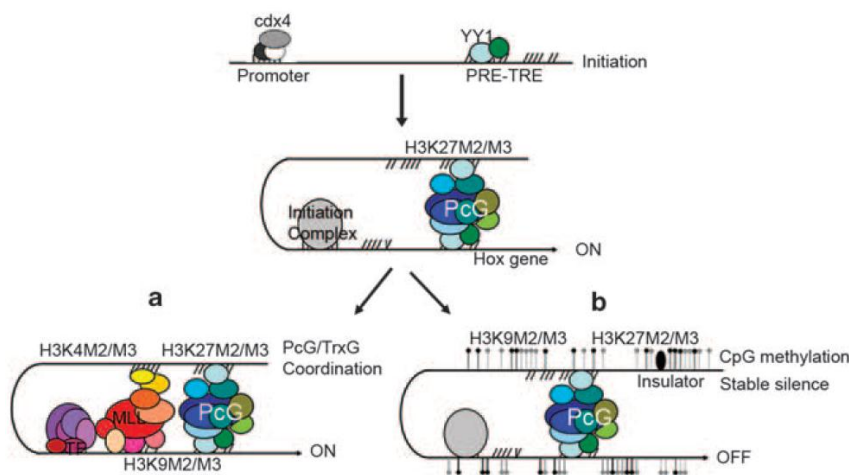


Figura 28: tomado de He Hua Yang. 2011

Posteriormente, no trabalho publicado por Cui et al, 2009 foram estudados mecanismos envolvidos nas modificações de histonas que podem participar na manutenção do potencial de ativação e diferenciação de células tronco hematopoéticas. Para isto realizaram-

se ensaios de diferenciação *in vitro* a partir de células primárias humanas multipotentes/progenitoras (CTH / CPH). Os dados indicaram que monometilações das lisinas (H3K4me1, H3K9me1 e H3K27me1) estão envolvidas na manutenção do potencial de ativação necessário para a diferenciação. Também foi visto que a perda de multipotência e comprometimento com a diferenciação é acompanhada pela ativação de genes envolvidos em uma determinada linhagem e pelo silenciamento de genes necessários para outras linhagens. Assim, chegou-se a conclusão que a ativação ou repressão genica pode ser regulada pelas marcas epigenéticas que ocorrem de maneira transiente nos domínios bivalentes da cromatina e podem estar envolvidas na manutenção de seu potencial de ativação requerido para diferenciação sendo programadas já no estágio de HSC / HPC. Cui, 2009.

Esses estudos demonstram que os genes *HOX* participam tanto na diferenciação das células-tronco quanto nos estádios posteriores na hematopoiese normal, e que as alterações na expressão destes genes podem ser leucemogênicas. Lawrence, 1996.

A expressão dos genes *HOX* em diferentes tipos de leucemia humana foi investigada para avaliar se a organização física dos loci *HOX* reflete na hierarquia regulatória envolvida na diferenciação de células hematopoéticas ou se sua expressão gênica pode contribuir para o fenótipo leucêmico. Os resultados destes estudos mostraram que os genes *HOX* são coordenadamente regulados em blocos nas células mieloides, enquanto parecem funcionar como genes isolados em células linfoides. Kumar 2004, Yan, 2006.

Estas observações sugerem que as células hematopoéticas expressam um repertório de genes *HOX* característicos de uma linhagem celular particular num estágio específico de diferenciação, podendo assim refletir o papel potencialmente importante que os mesmos desempenham na determinação da linhagem celular durante a hematopoese normal e leucêmica. Celetti, 1993.

O gene da leucemia mieloide / linfóide ou de linhagem mista (*MLL*) é um homólogo de *Tritorax* que sofre mutação em algumas leucemias, geralmente como uma proteína de fusão que perde a função de metilação da H3K4. Em vez disso, as proteínas de fusão *MLL* recrutam a metiltransferase *DOT1L* que resulta na metilação da lisina 79 na histona H3 (H3K79me) e aumenta a expressão gênica em um padrão diferente do resultante da H3K4me3. Leucemias linfoblásticas com translocações *MLL* mostram aumento da expressão de múltiplos genes *HOX*, incluindo *HOXA4*, *HOXA5*, *HOXA7* e *HOXA9* (Ferrando *et al.* 2003 e Armstrong *et al.*, 2003) e um pior prognóstico (Golub *et al.*, 1999). Os dados indicam que essas leucemias são dependentes do aumento da expressão de *HOXA9* e possivelmente outros genes *HOX*. (Faber *et al.*, 2009). Esses exemplos mostram como a expressão do gene *HOX* em neoplasias é alterada tanto pela metilação quanto pela modificação de histonas (Shah *et*

al., 2010). Na mielofibrose há indícios de que isso também possa acontecer (Abdel-Wahab *et al.*, 2012).

A extensão dessas observações ao modelo murino e aos estágios adulto e fetal da hematopoiese reforça fortemente um modelo no qual esses genes desempenham papéis-chave na regulação das propriedades das células hematopoiéticas primitivas. Uma possibilidade interessante é que eles agem para aumentar a proliferação / autorrenovação das células primitivas, talvez em parte por prejudicar a diferenciação. Resultados de estudos de superexpressão no modelo murino e, recentemente, o modelo humano são consistentes com tal modelo. Assim, por exemplo, a superexpressão de vários genes Hox diferentes, incluindo Hoxb3, B7, A5, a9 e a10 estão associados a respostas mieloproliferativas e a variação de blocos evidenciados na diferenciação. Hoxb4, por outro lado, parece ter um efeito restrito no aumento da proliferação de células precoces, incluindo HSC. Baseado nestes aspectos, foi do nosso interesse explorar o perfil de metilação e expressão de genes *HOXA* no contexto da MFP. Tanto nos estágios iniciais da hematopoiese quanto na diferenciação granulocítica. Os resultados do nosso trabalho indicam ...

Em coortes de pacientes com MFP, modelos murinos e linhagens celulares leucêmicas humanas, foi demonstrado que as mutações em *ASXL1* conduzem à redução global de H3K27me3, conferem mal prognóstico e aumentam a expressão de genes envolvidos na leucemogênese, tais como os genes *HOXA*. Na diferenciação mielóide normal, há uma diminuição gradual nos níveis de expressão de genes *HOXA* nos estágios iniciais para os mais diferenciados, entretanto, em neoplasias é alterada tanto pela metilação quanto pela modificação de histonas. Abdel-Wahab, 2012

As mutações *ASXL1* ocorrem com frequência em neoplasias mielóides e estão associadas a um mau prognóstico. No entanto, os mecanismos pelos quais o mutante *ASXL1* induz a leucemogênese permanecem obscuros. Neste estudo, relatamos os efeitos mutuamente reforçados entre uma forma C-terminal truncada do mutante *ASXL1* (*ASXL1*-MT) e *BAP1* na promoção da leucemogênese mielóide. A expressão de *BAP1* resulta no aumento da monoubitinação de *ASXL1*-MT, que por sua vez aumenta a função catalítica de *BAP1*. Este complexo hiperactivo *ASXL1*-MT / *BAP1* promove a diferenciação mielóide aberrante de células progenitoras hematopoiéticas e acelera a leucemogênese dirigida por *RUNX1*-ETO. Mecanicamente, este complexo induz a regulação positiva dos genes *HOXA* posteriores e *IRF8* através da remoção da ubiquitinação H2AK119. Importante, a depleção de *BAP1* inibe a expressão do gene *HOXA* posterior e a leucemogenicidade das células de leucemia mielóide que expressam *ASXL1*-MT. Além disso, o *BAP1* também é necessário para o crescimento da fusão de *MLL* em células leucêmicas com desregulação do gene *HOXA* posterior. Estes

dados indicam que a BAP1, que há muito tempo é considerada um supressor de tumor, desempenha, de fato, papel promotor de tumores nas neoplasmas mieloides.

Em resumo, nosso estudo demonstra o papel crítico da BAP1 na diferenciação mielóide aberrante induzida por ASXL1-MT, na leucemogênese mielóide e aumento da expressão dos genes HOXA e IRF8. Asada, 2018

Em estudos realizados em grande escala como como no grupo de Nischal et al., 2012 realizando análise não supervisionada identificaram um agrupamento de pacientes NMP com mutação em *ASXLI*, indicando que esses casos tenham um perfil de metilação característico. Entre os genes que se apresentaram hipermetilados em casos com *ASXLI* mutado estão *NPM2*, *RUNX1*, *HOXB3*, entre outros. Nischal, 2012.

Nielsen et al, 2017 a traves de uma análise supervisionada em amostras primarias de pacientes MFP de *ASXLI* mutado versus casos do tipo selvagem, os sítios CpG diferencialmente metilados foram enriquecidos em regiões marcadas pela histona H3K4me1, histona H3K27me3 e a marca de histona bivalente H3K27me3 + H3K4me3 em células humanas CD34 +. E a hipermetilação de sítios CpG foi confirmada em uma coorte de validação separada de 30 pacientes com MF por pirosequenciamento. Nielsen, 2017

BIBLIOGRAFIA

ABDEL-WAHAB, O., M. Adli, L. M. LaFave, J. Gao, T. Hricik, A. H. Shih, S. Pandey, J. P. Patel, Y. R. Chung, R. Koche, F. Perna, X. Zhao, J. E. Taylor, C. Y. Park, M. Carroll, A. Melnick, S. D. Nimer, J. D. Jaffe, I. Aifantis, B. E. Bernstein and R. L. Levine (2012). **ASXL1 mutations promote myeloid transformation through loss of PRC2-mediated gene repression.** Cancer Cell **22**(2): 180-193.

ABDEL-WAHAB, O., J. Gao, M. Adli, A. Dey, T. Trimarchi, Y. R. Chung, C. Kuscu, T. Hricik, D. Ndiaye-Lobry, L. M. Lafave, R. Koche, A. H. Shih, O. A. Guryanova, E. Kim, S. Li, S. Pandey, J. Y. Shin, L. Telis, J. Liu, P. K. Bhatt, S. Monette, X. Zhao, C. E. Mason, C. Y. Park, B. E. Bernstein, I. Aifantis and R. L. Levine (2013). **Deletion of Asxl1 results in myelodysplasia and severe developmental defects in vivo.** J Exp Med **210**(12): 2641-2659.

ABDEL-WAHAB, O., A. Pardanani, J. Patel, M. Wadleigh, T. Lasho, A. Heguy, M. Beran, D. G. Gilliland, R. L. Levine and A. Tefferi (2011). **Concomitant analysis of EZH2 and ASXL1 mutations in myelofibrosis, chronic myelomonocytic leukemia and blast-phase myeloproliferative neoplasms.** Leukemia **25**(7): 1200-1202.

ALVAREZ Argote, J. and C. A. Dasanu (2018). **ASXL1 mutations in myeloid neoplasms: pathogenetic considerations, impact on clinical outcomes and survival.** Curr Med Res Opin **34**(5): 757-763.

AN, J., A. Rao and M. Ko (2017). **TET family dioxygenases and DNA demethylation in stem cells and cancers.** Exp Mol Med **49**(4): e323.

ARAVIND, L. and L. M. Iyer (2012). **The HARE-HTH and associated domains: novel modules in the coordination of epigenetic DNA and protein modifications.** Cell Cycle **11**(1): 119-131.

ARBER, D. A., A. Orazi, R. Hasserjian, J. Thiele, M. J. Borowitz, M. M. Le Beau, C. D. Bloomfield, M. Cazzola and J. W. Vardiman (2016). **The 2016 revision to the World Health**

Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. *Blood* **127**(20): 2391-2405.

BALASUBRAMANI, A., A. Larjo, J. A. Bassein, X. Chang, R. B. Hastie, S. M. Togher, H. Lahdesmaki and A. Rao (2015). **Cancer-associated ASXL1 mutations may act as gain-of-function mutations of the ASXL1-BAP1 complex.** *Nat Commun* **6**: 7307.

BAYLIN, S. B. and P. A. Jones (2011). **A decade of exploring the cancer epigenome - biological and translational implications.** *Nat Rev Cancer* **11**(10): 726-734.

BECK S., Faradji F., Brock H., Peronnet F. (2010) **Maintenance of Hox Gene Expression Patterns.** In: **Deutsch J.S. (eds) Hox Genes.** *Advances in Experimental Medicine and Biology*, vol 689. Springer, New York, NY doi:10.1007/978-1-4419-6673-5_3

BERNSTEIN BE, Mikkelsen TS, Xie X, Kamal M, Huebert DJ, Cuff J, Fry B, Meissner A, Wernig M, Plath K, et al. 2006. **A bivalent chromatin structure marks key developmental genes in embryonic stem cells.** *Cell* **125**: 315–326.

BUTLER, J. S. and S. Y. Dent (2013). **The role of chromatin modifiers in normal and malignant hematopoiesis.** *Blood* **121**(16): 3076-3084.

CARBUCCIA, N., A. Murati, V. Trouplin, M. Brecqueville, J. Adelaide, J. Rey, W. Vainchenker, O. A. Bernard, M. Chaffanet, N. Vey, D. Birnbaum and M. J. Mozziconacci (2009). **Mutations of ASXL1 gene in myeloproliferative neoplasms.** *Leukemia* **23**(11): 2183-2186.

CERVANTES, F., B. Dupriez, A. Pereira, F. Passamonti, J. T. Reilly, E. Morra, A. M. Vannucchi, R. A. Mesa, J. L. Demory, G. Barosi, E. Rumi and A. Tefferi (2009). **New prognostic scoring system for primary myelofibrosis based on a study of the International Working Group for Myelofibrosis Research and Treatment." *Blood* **113**(13): 2895-2901.**

CHAUFFAILLE, M. d. L. L. F. (2010). **Neoplasias mieloproliferativas: revisão dos critérios diagnósticos e dos aspectos clínicos.** Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia **32**(4): 308-316.

DAMESHEK, W. (1951). **Some speculations on the myeloproliferative syndromes.** Blood **6**(4): 372-375.

DELIC, S., D. Rose, W. Kern, N. Nadarajah, C. Haferlach, T. Haferlach and M. Meggendorfer (2016). **Application of an NGS-based 28-gene panel in myeloproliferative neoplasms reveals distinct mutation patterns in essential thrombocythaemia, primary myelofibrosis and polycythaemia vera.** Br J Haematol **175**(3): 419-426.

ERFURTH FE, Popovic R, Grembecka J, Cierpicki T, Theisler C, Xia ZB et al. (2008). **MLL protects CpG clusters from methylation within the Hoxa9 gene, maintaining transcript expression.** Proc Natl Acad Sci USA **105**: 7517–7522.

FINAZZI, M. C., F. Lussana, S. Salmoiraghi, O. Spinelli and A. Rambaldi (2017). **Detection of driver and subclonal mutations in myelofibrosis: clinical impact on pharmacologic and transplant based treatment strategies.** Expert Rev Hematol **10**(7): 627-636.

FISHER, C. L., J. Berger, F. Randazzo and H. W. Brock (2003). **A human homolog of Additional sex combs, ADDITIONAL SEX COMBS-LIKE 1, maps to chromosome 20q11.** Gene **306**: 115-126.

GELSI-BOYER, V., M. Brecqueville, R. Devillier, A. Murati, M. J. Mozziconacci and D. Birnbaum (2012). **Mutations in ASXL1 are associated with poor prognosis across the spectrum of malignant myeloid diseases.** J Hematol Oncol **5**: 12.

GELSI-BOYER, V., V. Trouplin, J. Adelaide, J. Bonansea, N. Cervera, N. Carbuccia, A. Lagarde, T. Prebet, M. Nezri, D. Sainty, S. Olschwang, L. Xerri, M. Chaffanet, M. J. Mozziconacci, N. Vey and D. Birnbaum (2009). **Mutations of polycomb-associated gene ASXL1 in myelodysplastic syndromes and chronic myelomonocytic leukaemia.** Br J Haematol **145**(6): 788-800.

GILDEA JJ, Lopez R, Shearn A. A screen for new trithorax group genes identified little imaginal discs, the *Drosophila melanogaster* homologue of human retinoblastoma binding protein 2. *Genetics* 2000; 156:645-663.

GUO Y, Lubbert M, Engelhardt M. (2003). **CD34- hematopoietic stem cells: current concepts and controversies.** *Stem Cells* **21**: 15–20. Wei J, Wunderlich M, Fox C, Alvarez S, Cigudosa JC, Wilhelm JS et al. (2008). Microenvironment determines lineage fate in a human model of MLL-AF9 leukemia. *Cancer Cell* 13: 483–495.

GOMEZ LIMIA, C. E., S. Devalle, M. Reis, J. Sochacki, M. Carneiro, R. Madeiro da Costa, M. D'Andrea, T. Padilha, I. R. Zalberg, C. Solza, A. Dumas, S. Rehen, B. Monte-Mor and M. H. Bonamino (2017). **Generation and characterization of a human induced pluripotent stem (iPS) cell line derived from an acute myeloid leukemia patient evolving from primary myelofibrosis carrying the CALR 52bp deletion and the ASXL1 p.R693X mutation.** *Stem Cell Res* **24**: 16-20.

GUGLIELMELLI, P., T. L. Lasho, G. Rotunno, M. Mudireddy, C. Mannarelli, M. Nicolosi, A. Pacilli, A. Pardanani, E. Rumi, V. Rosti, C. A. Hanson, F. Mannelli, R. P. Ketterling, N. GANGAT, A. Rambaldi, F. Passamonti, G. Barosi, T. Barbui, M. Cazzola, A. M. Vannucchi and A. Tefferi (2018). **MIPSS70: Mutation-Enhanced International Prognostic Score System for Transplantation-Age Patients With Primary Myelofibrosis.** *J Clin Oncol* **36**(4): 310-318.

HAYASHI, H., G. Nagae, S. Tsutsumi, K. Kaneshiro, T. Kozaki, A. Kaneda, H. Sugisaki and H. Aburatani (2007). **High-resolution mapping of DNA methylation in human genome using oligonucleotide tiling array.** *Hum Genet* **120**(5): 701-711.

HOBBS, G. S. and R. K. Rampal (2015). **Clinical and molecular genetic characterization of myelofibrosis.** *Curr Opin Hematol* **22**(2): 177-183.

INOUE, D., J. Kitaura, K. Togami, K. Nishimura, Y. Enomoto, T. Uchida, Y. Kagiya, K. C. Kawabata, F. Nakahara, K. Izawa, T. Oki, A. Maehara, M. Isobe, A. Tsuchiya, Y. Harada, H. Harada, T. Ochiya, H. Aburatani, H. Kimura, F. Thol, M. Heuser, R. L. Levine, O. Abdel-

Wahab and T. Kitamura (2013). **Myelodysplastic syndromes are induced by histone methylation-altering ASXL1 mutations.** *J Clin Invest* **123**(11): 4627-4640.

IRIZARRY, R. A., Ladd-Acosta, C., Wen, B., Wu, Z., Montano, C., Onyango, P., ... Feinberg, A. P. (2009). **The human colon cancer methylome shows similar hypo- and hypermethylation at conserved tissue-specific CpG island shores.** *Nature Genetics*, 41(2), 178–186.doi:10.1038/ng.298

JAMES, C., V. Ugo, N. Casadevall, S. N. Constantinescu and W. Vainchenker (2005). **A JAK2 mutation in myeloproliferative disorders: pathogenesis and therapeutic and scientific prospects.** *Trends Mol Med* **11**(12): 546-554.

JUNCHENG Wei, Yanzhi Yuan, Chaozhi Jin, Hui Chen, Ling Leng, Fuchu He, and Jian Wang. **The Ubiquitin Ligase TRAF6 Negatively Regulates the JAK-STAT Signaling Pathway by Binding to STAT3 and Mediating Its Ubiquitination.** *PLoS One*. 2012; 7(11): e49567. Published online 2012 Nov 19.

JÜRGENS, G. (1985). **A group of genes controlling the spatial expression of the bithorax complex in Drosophila.** *Nature* **316**: 153–155.

KAUFMAN, T. C., M. A. Seeger and G. Olsen (1990). **Molecular and genetic organization of the antennapedia gene complex of Drosophila melanogaster.** *Adv Genet* **27**: 309-362.

KENNISON, J. A. (1993). **Transcriptional activation of Drosophila homeotic genes from distant regulatory elements.** *Trends Genet* **9**(3): 75-79.

KLAMPFL, T., H. Gisslinger, A. S. Harutyunyan, H. Nivarthi, E. Rumi, J. D. Milosevic, N. C. Them, T. Berg, B. Gisslinger, D. Pietra, D. Chen, G. I. Vladimer, K. Bagienski, C. Milanesi, I. C. Casetti, E. Sant'Antonio, V. Ferretti, C. Elena, F. Schischlik, C. Cleary, M. Six, M. Schalling, A. Schonegger, C. Bock, L. Malcovati, C. Pascutto, G. Superti-Furga, M. Cazzola and R. Kralovics (2013). **Somatic mutations of calreticulin in myeloproliferative neoplasms.** *N Engl J Med* **369**(25): 2379-2390.

KIM TH, Barrera LO, Zheng M, Qu C, Singer MA, Richmond TA, Wu Y, Green RD, Ren B. 2005. A high-resolution map of active promoters in the human genome. *Nature* 436: 876–880. Celetti A, Barba P, Cillo C, Rotoli B, Boncinelli E, Magli MC. (1993). **Characteristic patterns of HOX gene expression in different types of human leukemia.** *Int J Cancer* 53: 237–244.

LANGABEER, S. E. (2016). **Chasing down the triple-negative myeloproliferative neoplasms: Implications for molecular diagnostics.** *JAKSTAT* 5(2-4): e1248011.

LAPPIN, T. R., D. G. Grier, A. Thompson and H. L. Halliday (2006). **HOX genes: seductive science, mysterious mechanisms.** *Ulster Med J* 75(1): 23-31.

LATAILLADE, J. J., O. Pierre-Louis, H. C. Hasselbalch, G. Uzan, C. Jasmin, M. C. Martyre, M. C. Le Bousse-Kerdiles, I. French and E. N. o. M. the European (2008). **Does primary myelofibrosis involve a defective stem cell niche? From concept to evidence.** *Blood* 112(8): 3026-3035.

LAWRENCE HJ, Sauvageau G, Humphries RK, Largman C. (1996). **The role of HOX homeobox genes in normal and leukemic hematopoiesis.** *Stem Cells* 14: 281–291.

Yan, J., Chen, Y.-X., Desmond, A., Silva, A., Yang, Y., Wang, H., & Hua, X. (2006). *Cdx4 and Menin Co-Regulate Hoxa9 Expression in Hematopoietic Cells.* *PLoS ONE*, 1(1), e47. doi:10.1371/journal.pone.0000047

LEMONS, D. and W. McGinnis (2006). **Genomic evolution of Hox gene clusters.** *Science* 313(5795): 1918-1922.

LEWIS, E. B. (1978). **A gene complex controlling segmentation in Drosophila.** *Nature* 276(5688): 565-570.

LUNDBERG, P., A. Karow, R. Nienhold, R. Looser, H. Hao-Shen, I. Nissen, S. Girsberger, T. Lehmann, J. Passweg, M. Stern, C. Beisel, R. Kralovics and R. C. Skoda (2014). **Clonal evolution and clinical correlates of somatic mutations in myeloproliferative neoplasms.** *Blood* 123(14): 2220-2228.

MALARA, A., V. Abbonante, M. Zingariello, A. Migliaccio and A. Balduini (2018). **Megakaryocyte Contribution to Bone Marrow Fibrosis: many Arrows in the Quiver.** Mediterr J Hematol Infect Dis **10**(1): e2018068.

MARTY, C., C. Pecquet, H. Nivarthi, M. El-Khoury, I. Chachoua, M. Tulliez, J. L. Villeval, H. Raslova, R. Kralovics, S. N. Constantinescu, I. Plo and W. Vainchenker (2016). **Calreticulin mutants in mice induce an MPL-dependent thrombocytosis with frequent progression to myelofibrosis.** Blood **127**(10): 1317-1324.

MASCARENHAS, J. (2015). **Looking forward: novel therapeutic approaches in chronic and advanced phases of myelofibrosis.** Hematology Am Soc Hematol Educ Program **2015**: 329-339.

MASCARENHAS, J., N. Roper, P. Chaurasia and R. Hoffman (2011). **Epigenetic abnormalities in myeloproliferative neoplasms: a target for novel therapeutic strategies.** Clin Epigenetics **2**(2): 197-212.

MCCLURE, R. F., M. D. Ewalt, J. Crow, R. L. Temple-Smolkin, M. Pullambhatla, R. Sargent and A. S. Kim (2018). **Clinical Significance of DNA Variants in Chronic Myeloid Neoplasms: A Report of the Association for Molecular Pathology.** J Mol Diagn **20**(6): 717-737.

McPHERSON, S., M. F. McMullin and K. Mills (2017). **Epigenetics in Myeloproliferative Neoplasms.** J Cell Mol Med **21**(9): 1660-1667.

MILLER, L. H., C. K. Qu and M. Pauly (2018). **Germline mutations in the bone marrow microenvironment and dysregulated hematopoiesis.** Exp Hematol **66**: 17-26.

MILNE, T. A., D. A. Sinclair and H. W. Brock (1999). **The Additional sex combs gene of Drosophila is required for activation and repression of homeotic loci, and interacts specifically with Polycomb and super sex combs.** Mol Gen Genet **261**(4-5): 753-761.

NANGALIA, J., C. E. Massie, E. J. Baxter, F. L. Nice, G. Gundem, D. C. Wedge, E. Avezov, J. Li, K. Kollmann, D. G. Kent, A. Aziz, A. L. Godfrey, J. Hinton, I. Martincorena, P. Van Loo, A. V. Jones, P. Guglielmelli, P. Tarpey, H. P. Harding, J. D. Fitzpatrick, C. T. Goudie, C. A. Ortmann, S. J. Loughran, K. Raine, D. R. Jones, A. P. Butler, J. W. Teague, S. O'Meara, S. McLaren, M. Bianchi, Y. Silber, D. Dimitropoulou, D. Bloxham, L. Mudie, M. Maddison, B. Robinson, C. Keohane, C. Maclean, K. Hill, K. Orchard, S. Tauro, M. Q. Du, M. Greaves, D. Bowen, B. J. P. Huntly, C. N. Harrison, N. C. P. Cross, D. Ron, A. M. Vannucchi, E. Papaemmanuil, P. J. Campbell and A. R. Green (2013). **Somatic CALR mutations in myeloproliferative neoplasms with nonmutated JAK2.** N Engl J Med **369**(25): 2391-2405.

NIELSEN, H. M., C. L. Andersen, M. Westman, L. S. Kristensen, F. Asmar, T. A. Kruse, M. Thomassen, T. S. Larsen, V. Skov, L. L. Hansen, O. W. Bjerrum, H. C. Hasselbalch, V. Punj and K. Gronbaek (2017). **Epigenetic changes in myelofibrosis: Distinct methylation changes in the myeloid compartments and in cases with ASXL1 mutations.** Sci Rep **7**(1): 6774.

NISCHAL, S., S. Bhattacharyya, M. Christopeit, Y. Yu, L. Zhou, T. D. Bhagat, D. Sohal, B. Will, Y. Mo, M. Suzuki, A. Pardanani, M. McDevitt, J. P. Maciejewski, A. M. Melnick, J. M. Greally, U. Steidl, A. Moliterno and A. Verma (2013). **Methylome profiling reveals distinct alterations in phenotypic and mutational subgroups of myeloproliferative neoplasms.** Cancer Res **73**(3): 1076-1085.

NISCHAL S, Bhattacharyya S, Christopeit M, Yu Y, Zhou L, Bhagat TD, Sohal D, Will B, Mo Y, Suzuki M, Pardanani A, McDevitt M, Maciejewski JP, Melnick AM, Greally JM, Steidl U, Moliterno A, Verma A. **Methylome profiling reveals distinct alterations in phenotypic and mutational subgroups of myeloproliferative neoplasms.** Cancer Res. 2013 Feb 1;73(3):1076-85.

PEREZ, C., M. Pascual, J. I. Martin-Subero, B. Bellosillo, V. Segura, E. Delabesse, S. Alvarez, M. J. Larrayoz, J. Rifon, J. C. Cigudosa, C. Besses, M. J. Calasanz, N. C. Cross, F. Prosper and X. Agirre (2013). **Aberrant DNA methylation profile of chronic and transformed classic Philadelphia-negative myeloproliferative neoplasms.** Haematologica **98**(9): 1414-1420.

PINEAULT, N., Helgason, C. D., Lawrence, H. J., & Humphries, R. K. (2002). **Differential expression of Hox, Meis1, and Pbx1 genes in primitive cells throughout murine hematopoietic ontogeny.** *Experimental Hematology*, 30(1), 49–57. doi:10.1016/s0301-472x(01)00757-3

PIKMAN, Y., B. H. Lee, T. Mercher, E. McDowell, B. L. Ebert, M. Gozo, A. Cuker, G. Wernig, S. Moore, I. Galinsky, D. J. DeAngelo, J. J. Clark, S. J. Lee, T. R. Golub, M. Wadleigh, D. G. Gilliland and R. L. Levine (2006). **MPLW515L is a novel somatic activating mutation in myelofibrosis with myeloid metaplasia.** *PLoS Med* 3(7): e270.

PRICK, J., G. de Haan, A. R. Green and D. G. Kent (2014). **Clonal heterogeneity as a driver of disease variability in the evolution of myeloproliferative neoplasms.** *Exp Hematol* 42(10): 841-851.

SCHEUERMANN, J. C., A. G. de Ayala Alonso, K. Oktaba, N. Ly-Hartig, R. K. McGinty, S. Fraterman, M. Wilm, T. W. Muir and J. Muller (2010). **Histone H2A deubiquitinase activity of the Polycomb repressive complex PR-DUB.** *Nature* 465(7295): 243-247.

TEFFERI, A. (2016). **Myeloproliferative neoplasms: A decade of discoveries and treatment advances.** *Am J Hematol* 91(1): 50-58.

_____ (2018). "Primary myelofibrosis: 2019 update on diagnosis, risk-stratification and management." *Am J Hematol* 93(12): 1551-1560.

TEFFERI, A. and D. G. Gilliland (2005). **JAK2 in myeloproliferative disorders is not just another kinase.** *Cell Cycle* 4(8): 1053-1056.

TEFFERI, A., P. Guglielmelli, T. L. Lasho, G. Rotunno, C. Finke, C. Mannarelli, A. A. Belachew, A. Pancrazzi, E. A. Wassie, R. P. Ketterling, C. A. Hanson, A. Pardanani and A. M. Vannucchi (2014). **CALR and ASXL1 mutations-based molecular prognostication in primary myelofibrosis: an international study of 570 patients.** *Leukemia* 28(7): 1494-1500.

VAINCHENKER, W. and R. Kralovics (2017). **Genetic basis and molecular pathophysiology of classical myeloproliferative neoplasms.** *Blood* **129**(6): 667-679.

VANNUCCHI, A. M., T. L. Lasho, P. Guglielmelli, F. Biamonte, A. Pardanani, A. Pereira, C. Finke, J. Score, N. Gangat, C. Mannarelli, R. P. Ketterling, G. Rotunno, R. A. Knudson, M. C. Susini, R. R. Laborde, A. Spolverini, A. Pancrazzi, L. Pieri, R. Manfredini, E. Tagliafico, R. Zini, A. Jones, K. Zoi, A. Reiter, A. Duncombe, D. Pietra, E. Rumi, F. Cervantes, G. Barosi, M. Cazzola, N. C. Cross and A. Tefferi (2013). **Mutations and prognosis in primary myelofibrosis.** *Leukemia* **27**(9): 1861-1869.

VOIGT, P., Tee, W.-W., & Reinberg, D. (2013). *A double take on bivalent promoters.* *Genes & Development*, *27*(12), 1318–1338.

WANG, J., Z. Li, Y. He, F. Pan, S. Chen, S. Rhodes, L. Nguyen, J. Yuan, L. Jiang, X. Yang, O. Weeks, Z. Liu, J. Zhou, H. Ni, C. L. Cai, M. Xu and F. C. Yang (2014). **Loss of *Asxl1* leads to myelodysplastic syndrome-like disease in mice.** *Blood* **123**(4): 541-553.

YANG, H., S. Kurtenbach, Y. Guo, I. Lohse, M. A. Durante, J. Li, Z. Li, H. Al-Ali, L. Li, Z. Chen, M. G. Field, P. Zhang, S. Chen, S. Yamamoto, Z. Li, Y. Zhou, S. D. Nimer, J. W. Harbour, C. Wahlestedt, M. Xu and F. C. Yang (2018). **Gain of function of *ASXL1* truncating protein in the pathogenesis of myeloid malignancies.** *Blood* **131**(3): 328-341.

ANEXOS

ANEXO 1

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (para doadores de sangue)

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (para pacientes)

TERMO DE AUTORIZAÇÃO PARA PUBLICAÇÃO ELETRÔNICA DO INCA

FORMULÁRIO PARA AVALIAÇÃO DE DISSERTAÇÃO/TESE