METILAÇÃO E EXPRESSÃO DE GENES HOXA EM MIELOFIBROSE PRIMÁRIA

Robledo ML[1], Vieira RR[1], Benedito SS[1], Pires V[1], Diniz C[1], Daumas A[2], Solza C[3], Zalcberg I[1], Mor BM[1]

[1]Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva

[2]Hospital Universitário Antônio Pedro

[3]Hospital Universitário Pedro Ernesto

INTRODUÇÃO

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. Mutações em ASXL1 conferem pior prognóstico à doença e maior risco de transformação de MFP para leucemia mieloide aguda (LMA) secundária. 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.

OBJETIVO

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

MATERIAL E MÉTODOS

Para isso, foram avaliados diferentes contextos biológicos: granulócitos primários de MFP em fase crônica; células CD34+ de paciente com LMA pós-MFP, ao longo da diferenciação *in vitro* para granulócitos; e linhagem de células tronco de pluripotência induzida (iPSC) de LMA pós-MFP, ao longo da diferenciação *in vitro* para corpos embrioides (EB) (Figura 1).

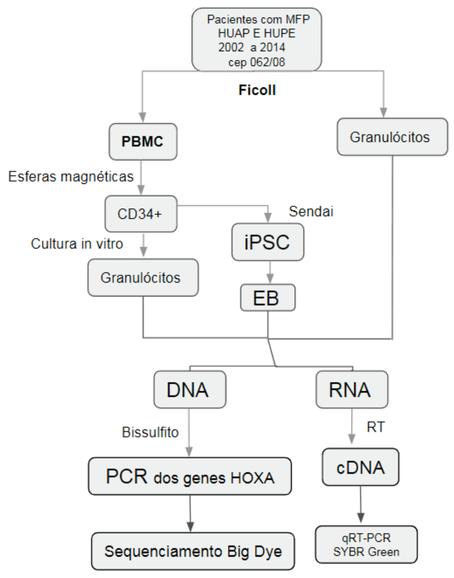

Figura 1: **Esquema ilustrativo do material e métodos utilizado neste estudo.**

RESULTADOS

No estudo dos granulócitos primários de pacientes MFP, portadores de ASXL1 selvagem (WT) ou mutado (MUT) (Tabela 1), as regiões analisadas nos genes HOXA7-13 estavam desmetiladas 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 WT e MUT. A seguir, na análise de células CD34+, verificamos que HOXA6 apresentou-se parcialmente metilado nas células derivadas de doador saudável (CNT) e desmetilado nas derivadas de LMA pós-MFP. Dados preliminares indicaram que este gene estava mais expresso nas células CD34+ de LMA, comparado ao CNT. Por outro lado, ao fim da diferenciação in vitro, tanto granulócitos derivados de CNT quanto de LMA apresentaram metilação parcial em HOXA6 (Figuras 2 e 3).

Finalmente, avaliamos a metilação e expressão de HOXA nas iPSC, tanto derivados de CNT quanto de LMA. As regiões analisadas em HOXA6 e HOXA9 estavam parcialmente metiladas, enquanto em 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 LMA. A maioria dos sítios CpG avaliados para HOXA9 estavam desmetilados nos EBs. Com relação à expressão gênica, dados preliminares indicaram que HOXA6 estava mais expresso nas iPSC LMA, quando comparado às iPSC CNT, enquanto HOXA9 pareceu estar mais expresso nos EBs-LMA, quando comparado aos EBs-CNT (Figura 4)."

Tabela 1: Dados das mutações encontradas na coorte de paciente do estudo. As lacunas preenchidas em azul representam os pacientes com mutação

	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																								■	

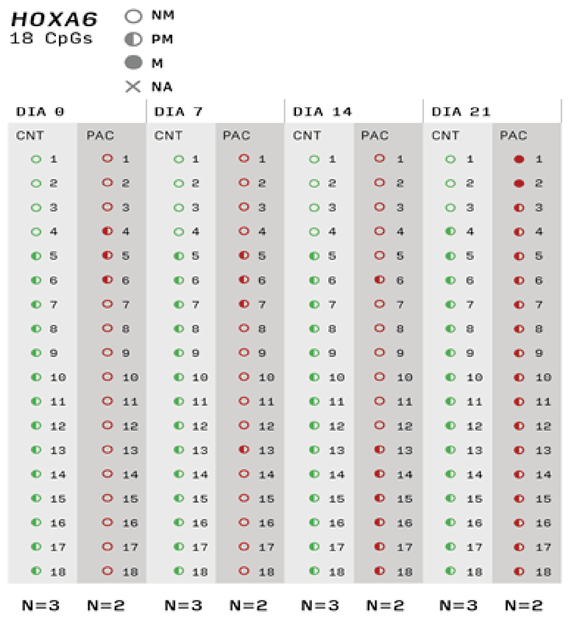

Figura 2: **Metilação de DNA no gene *HOXA6* em células CD34+ e durante a diferenciação granulocítica *in vitro.***

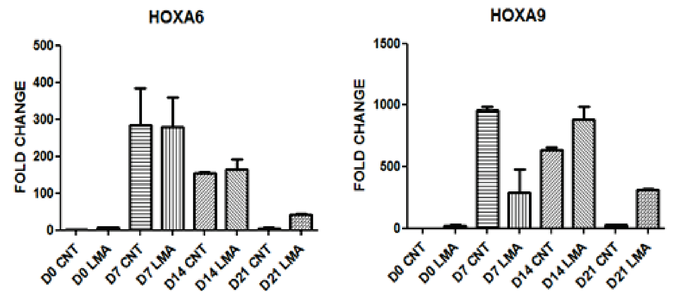

Figura 3: **Expressão gênica relativa de *HOXA6* e *9* em células CD34+ e durante a diferenciação granulocítica *in vitro*.**

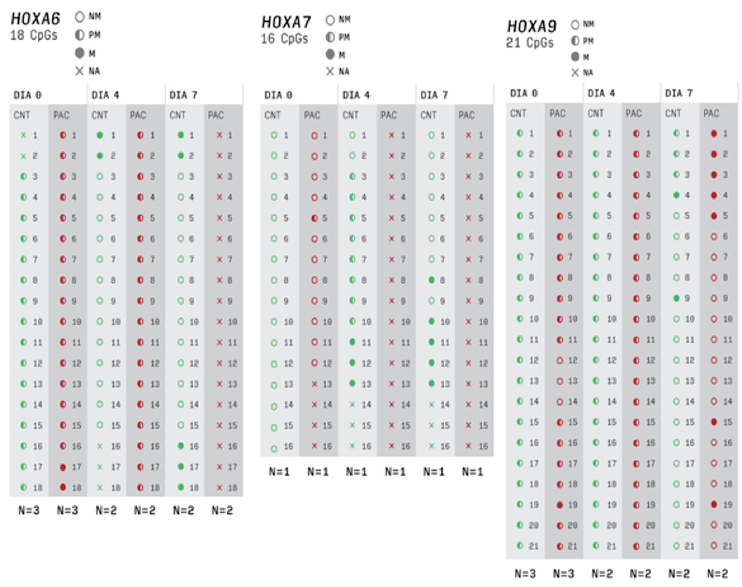

Figura 4: Metilação de DNA nos genes *HOXA 6, 7* E *9* em células tronco de pluripotência induzida (IPSC) e ao longo da diferenciação para corpos embrioides (Ebs).

DISCUSSÃO

Expressão aberrante de genes HOXA em paceintes MFP que cursam com mutações em ASXL1 poderia favorecer transformação para LMA. Neste trabalho não encontramos diferenças significativas na expressão de genes HOXA6-13 nos contextos biologicos estudados. Na diferenciação mielóide normal, é descrita na literatura uma diminuição gradual nos níveis de expressão de genes HOXA 3´ e um aumento dos HOXA 5´. de estágios iniciais para os mais diferenciados.Isto pode ser regulado por mecanismos epigenticos como a metilação de DNA. Nosso estudo permitiu a identificação de diferencias entre a metilação de genes HOXA 5´nas células de LMA pós MFP e CNT.

CONCLUSÃO

Com a perspectiva de verificar se o efeito na regulação epigenética de HOXA nas células de LMA pós-MFP é decorrente da mutação em ASXL1, modelos isogênicos, com ASXL1 WT, deverão ser desenvolvidos e avaliados. Assim como a inclusão de mais pacientes ao estudo.

Projeto Gráfico: Área de Edição e Produção de Materiais Técnico-Científicos / INCA

INCA SUS MINISTÉRIO DA SAÚDE PÁTRIA AMADA BRASIL GOVERNO FEDERAL