



RENATA SCOPIM RIBEIRO

**ESTUDO DA EXPRESSÃO DE *TET2* E *DNMT3A*
EM SÍNDROME MIELODISPLÁSICA E
LEUCEMIA MIELOIDE AGUDA**

CAMPINAS
2014



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

Faculdade de Ciências Médicas

RENATA SCOPIIM RIBEIRO

**ESTUDO DA EXPRESSÃO DE *TET2* E *DNMT3A*
EM SÍNDROME MIELODISPLÁSICA E
LEUCEMIA MIELOIDE AGUDA**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa
de Pós-Graduação em Clínica Médica da Faculdade
de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas
para obtenção de título de Mestra em Ciências na
área de concentração Clínica Médica.

Orientador(a): Prof(a). Dr(a). Fabíola Traina

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO
FINAL DA DISSERTAÇÃO DEFENDIDA POR
RENATA SCOPIIM RIBEIRO E ORIENTADA PELA
PROFA. DRA. FABÍOLA TRAINA.

Assinatura do Orientador

CAMPINAS

2014

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca da Faculdade de Ciências Médicas
Maristella Soares dos Santos - CRB 8/8402

Sco68e Scopim-Ribeiro, Renata, 1987-
Estudo da expressão de TET2 e DNMT3A em síndrome mielodisplásica e leucemia mieloide aguda / Renata Scopim Ribeiro. – Campinas, SP : [s.n.], 2014.

Orientador: Fabíola Traina.
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Ciências Médicas.

1. Síndromes mielodisplásicas. 2. Leucemia mieloide aguda. 3. Metilação de DNA. 4. Epigenética. I. Traina, Fabíola. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Investigation of TET2 and DNMT3A expression. in myelodysplastic syndrome and acut myeloid leukemia

Palavras-chave em inglês:

Myelodysplastic syndromes

Acute myeloid leukemia

DNA methylation

Epigenetics

Área de concentração: Clínica Médica

Titulação: Mestra em Ciências

Banca examinadora:

Fabíola Traina [Orientador]

Elvira Deolinda Rodrigues Pereira Velloso

Erich Vinícius de Paula

Data de defesa: 08-05-2014

Programa de Pós-Graduação: Clínica Médica

BANCA EXAMINADORA DA DEFESA DE MESTRADO

RENATA SCOPIM RIBEIRO

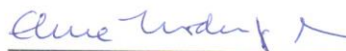
ORIENTADORA: PROF. DR. FABÍOLA TRAINA

MEMBROS:

1. PROF. DR. FABÍOLA TRAINA



2. PROF. DR. ELVIRA DEOLINDA RODRIGUES PEREIRA VELLOSO



3. PROF. DR. ERICH VINICIUS DE PAULA



Programa de Pós-Graduação em Clínica Médica da Faculdade de Ciências Médicas da
Universidade Estadual de Campinas.

Data: 08 de maio de 2014

Dedicatória

Dedico este trabalho aos meus pais, meus irmãos, meu namorado e à minha avó Maria, que ainda acredito compartilhar minhas vitórias de onde quer que esteja.

AGRADECIMENTOS

À minha família: meu pai Pedro, minha mãe Clarice e meus irmãos Daniela e Leonardo, por todas as referências e pelo suporte. Ao meu namorado Ricardo, por seu amor e paciência que permitiram aturar meus desesperos, sempre de maneira muito carinhosa e participativa.

À minha falecida avó Maria Joana, meu agradecimento tardio, sabendo que em vida talvez não tenha deixado claro o quanto seu olhar orgulhoso me motivava nos percursos mais difíceis.

À minha orientadora Profa. Dra. Fabiola Traina, por sua dedicação ao meu aprendizado desde a oportunidade inicial como estagiária, mostrando o caminho e demonstrando a confiança. Agradeço a disponibilidade, compreensão e acolhida durante todo o processo, deixando registrada aqui minha admiração por sua personalidade e currículo.

À Profa. Dra. Sara Saad, pela disponibilidade e apoio em seu laboratório. Seu trabalho árduo construiu um grupo de pesquisa forte e me forneceu não só recursos, mas também referência de comportamento profissional.

À Janine, por me ajudar tanto em minha chegada ao Hemocentro, oferecendo não somente seu apoio profissional, como a oportunidade de compartilhar a alegria do seu casamento e nascimento de sua primeira filha. É com muita alegria que vejo minha “ex-supervisora de estágio” hoje como amiga.

Aos meus amigos João e Paula, que foram peça fundamental na execução desse trabalho. Ao João, meu agradecimento por me ensinar pacientemente todos os procedimentos e análises, todos os detalhes precisos em cada figura e tabela e por fazer parte de todas as minhas conquistas acadêmicas até aqui. À Paula meu agradecimento pela imensa ajuda clínica (isto é, a incansável seleção de pacientes e extração de cada dado aqui utilizado, assim como todas as vezes em que me ajudou com minhas próprias queixas) e ambos pela amizade, que sempre foi combustível para prosseguir.

À Mariana Lazzarini, Letícia Fröhlich Archângelo e Patrícia Favaro, pela ajuda e orientação.

Aos alunos Matheus, João Kleber, Fernanda Roversi, Rita, Bruna, Flávia, Rafaela, Vanessa e Isabela e às funcionárias Tereza, Adriana, Fernanda, Audrey, Simone, Lena, Ana Leda, Irene e Karla.

Aos docentes da pós-graduação da FCM da UNICAMP, Dra. Carmem Silvia Passos Lima, Dr. Fernando F. Costa, Dra. Irene Lorand-Metze, Dr. Cármino A. de Souza pela organização do programa e pelas aulas.

A todos os pacientes do ambulatório, por fazer de um momento tão difícil e doloroso uma oportunidade para o avanço no tratamento de suas doenças. Que todas as vezes que nessa dissertação for lida a expressão “amostra de medula óssea” nos lembremos de que se trata de um procedimento doloroso e invasivo para indivíduos já fragilizados por sua condição.

À funcionária da FCM Luciana, pela disponibilidade e ajuda com tantos sequenciamentos gênicos.

À Cleide pelo auxílio estatístico.

Ao Michel pelo apoio didático durante a realização deste trabalho.

Às secretárias Patrícia e Raquel pela disponibilidade no serviço burocrático, correções ortográficas do inglês.

Ao atual secretário da pós-graduação Bruno e à Adriana pela disponibilidade no serviço burocrático.

Às agências financiadoras, FAPESP, CNPq e INCT do sangue.

Este estudo foi financiado com recursos fornecidos pela FAPESP (processos 2012/09982-8, 2011/15905-3 e 2011/51959-0) e pelo Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia do Sangue - INCT Sangue/CNPq (processo 2008/57895-1).

As neoplasias mieloides compreendem um grupo heterogêneo de doenças hematológicas que se originam de um precursor mielóide comum, em diferentes fases de diferenciação. As alterações celulares que levam ao desenvolvimento de neoplasias podem ocorrer através de mecanismos epigenéticos ou de alterações genéticas. DNMT3A codifica metiltransferases que adicionam grupamentos metil a resíduos de citosina do DNA e TET2 promove a hidroxilação da citosina metilada, o que os caracteriza como elementos importantes no controle epigenético. *DNMT3A* e *TET2* encontram-se frequentemente mutados em neoplasias mieloides, mas o impacto prognóstico destas mutações ainda é controverso. A consequência funcional da mutação de *DNMT3A* em neoplasias mieloides ainda não foi definida, mas o silenciamento da proteína em células progenitoras murinas favorece a autorrenovação e compromete a diferenciação celular. A mutação de *TET2* tem como consequência a perda de função do gene e participa da transformação neoplásica das células mieloides, favorecendo a proliferação da série mielomonocítica. Entretanto, a expressão de *TET2* e *DNMT3A* nestas doenças ainda é pouco elucidada. Assim, os objetivos deste estudo foram (1) investigar a expressão de *TET2* e *DNMT3A* em células hematopoéticas de indivíduos normais e pacientes com síndrome mielodisplásica (SMD) e leucemia mielóide aguda (LMA), (2) correlacionar a expressão de *TET2* e *DNMT3A* com o fenótipo clínico e sobrevida de pacientes com SMD; (3) investigar a expressão de *TET2* e *DNMT3A* durante a diferenciação celular hematopoética e (4) avaliar o efeito do silenciamento de DNMT3A no fenótipo de linhagens celulares leucêmicas.

No presente estudo, verificamos redução na expressão de *TET2* em células provenientes de pacientes com SMD e LMA quando comparada à expressão em controles

normais ($p < .001$), e redução em SMD alto risco quando comparada à SMD baixo risco ($p = .02$). Os resultados em amostras sequenciais de cinco pacientes com SMD indicaram redução da expressão de *TET2* no momento da progressão da doença. A análise univariada evidenciou que fatores clínicos tiveram impacto tanto na sobrevida livre de evento como sobrevida global, incluindo a classificação de risco pela OMS 2008 (alto vs. baixo, $p \leq .0001$), IPSS (int-2/alto vs. baixo/int-1, $p \leq .0001$), hemoglobina (< 10 vs. ≥ 10 , $p \leq .05$), contagem de leucócitos (< 3 vs. $\geq 3 \times 10^9/L$, $p \leq .05$), contagem absoluta de neutrófilos (< 1.5 vs. ≥ 1.5 , $p \leq .05$) e porcentagem de blastos na medula óssea (≥ 5 vs. < 5 ou ≥ 10 vs. < 10 , $p \leq .0004$). Além disso, a baixa expressão de *TET2* teve impacto negativo na sobrevida livre de evento (HR: 6.51 [2.42-17.49], $p = .0002$) e na sobrevida global (HR: 7.25 [2.77-18.99], $p < .0001$). A análise multivariada indicou que a baixa expressão de *TET2* ($p \leq .0001$), IPSS alto/intermediate-2 ($p \leq .0001$), e hemoglobina ≤ 10 g/dL ($P \leq .03$) são fatores prognósticos para menor sobrevida livre de evento e sobrevida global.

Durante a diferenciação eritroide de células $CD34^+$ de indivíduos normais e pacientes com SMD, observamos um aumento significativo da expressão de *TET2* ($p = .03$). Na avaliação da diferenciação celular de linhagens leucêmicas, observamos aumento significativo na expressão de *TET2* durante as diferenciações granulocítica ($p = .04$) e megacariocítica ($p = .03$); e um aumento não significativo durante a diferenciação eritrocítica.

A expressão de *DNMT3A* foi semelhante entre pacientes com LMA, SMD e controles normais, e não teve impacto significativo na sobrevida dos pacientes com SMD. A expressão de *DNMT3A* não foi modulada durante a diferenciação eritroide de células $CD34^+$ de indivíduos normais e pacientes com SMD. Nos modelos de diferenciação celular

de linhagens leucêmicas, observamos aumento significativo da expressão de *DNMT3A* durante a diferenciação granulocítica, mas não durante a diferenciação eritrocítica e megacariocítica. A redução na expressão de *DNMT3A* não resultou em alteração significativa na apoptose, na proliferação e no ciclo celular em linhagens leucêmicas HL60 e U937. A expressão gênica e proteica de PTEN não foi modulada em células leucêmicas submetidas à inibição de *DNMT3A*.

Os achados aqui descritos sugerem que, similarmente à presença de mutação no *TET2*, a baixa expressão de *TET2* pode participar do processo de transformação celular em SMD de alto risco e LMA; estudos clínicos deveriam considerar a investigação da expressão gênica de *TET2* em conjunto com a pesquisa de mutação *TET2* na definição de prognóstico. Os resultados de expressão e função de *DNMT3A* sugerem que a mutação, e não a expressão, deva ser o principal mecanismo pelo qual o *DNMT3A* participa da transformação neoplásica e que a função de *DNMT3A* pode depender da linhagem celular estudada.

Myeloid neoplasms comprise a heterogeneous group of hematologic malignancies that originate from a common myeloid precursor at different stages of differentiation. Cellular changes that lead to development of malignancies may occur through epigenetic mechanisms or genetic alterations. *DNMT3A* encodes methyltransferases that add methyl groups to cytosine residues in DNA, *TET2* promotes hydroxylation of methylated cytosine, and both proteins are important elements in epigenetic control. *TET2* and *DNMT3A* are recurrently mutated in myeloid malignancies, but the prognostic consequence of *TET2* and *DNMT3A* mutation is still controversial. The functional consequences of *DNMT3A* mutation has not been defined, but the protein silencing in murine progenitor cells promotes self-renewal and reduces cell differentiation. *TET2* mutation results in loss of function and participates in the neoplastic transformation of myeloid cells, favoring the proliferation of granulomonocytic cells. However, the expression of *TET2* and *DNMT3A* in these diseases has been rarely addressed. Then, the aims of this study were (1) to evaluate *TET2* and *DNMT3A* gene expression in hematopoietic cells from healthy individuals and from patients with myelodysplastic syndrome (MDS) and acute myeloid leukemia (AML); (2) to correlate *TET2* and *DNMT3A* expression with clinical phenotype and outcomes of MDS patients; (3) to investigate *TET2* and *DNMT3A* expression during hematopoietic cell differentiation; and (4) to evaluate the effect of *DNMT3A* silencing in the phenotype of leukemia cell lines.

In this study, the expression of *TET2* was decreased in cells from patients with MDS and AML compared to healthy donors ($p<.001$) and reduced high-risk MDS compared to low risk MDS ($p=.02$). The results in sequential samples from five patients

with MDS indicate reduced expression of *TET2* at the time of disease progression. By univariate analysis, clinical factors that significantly affected both event free survival (EFS) and overall survival (OS) included risk stratification by WHO 2008 (high vs. low, $p \leq .0001$), IPSS (int-2/high vs. low/int-1, $p \leq .0001$), hemoglobin (<10 vs. ≥ 10 , $p \leq .05$), white blood cell counts (< 3 vs. $\geq 3 \times 10^9/L$, $p \leq .05$), absolute neutrophil counts (< 1.5 vs. ≥ 1.5 , $p \leq .05$) and bone marrow blast percentage (≥ 5 vs. <5 or ≥ 10 vs. <10 , $p \leq .0004$). Furthermore, low *TET2* expression negatively impacted both EFS (HR: 6.51 [2.42-17.49], $p = .0002$) and OS (HR: 7.25 [2.77-18.99], $p < .0001$). Multivariate analyses indicated that low *TET2* expression ($p \leq .0001$), along with IPSS high/intermediate-2 risk group ($p \leq .0001$), and hemoglobin ≤ 10 g/dL ($p \leq .03$) were independently prognostic for worse EFS and OS.

During erythroid differentiation of CD34⁺ cells from normal individuals and patients with low-risk MDS, we observed an increased expression of *TET2* ($p = .03$). During cell differentiation of leukemic cell lines, we observed a significantly increase in the expression of *TET2* during granulocytic and megakaryocytic differentiation ($p = .04$ and $p = .03$, respectively); there was also an increased expression during erythrocytic differentiation, but this was not statistically significant.

The expression of *DNMT3A* was similar between patients with AML, MDS and healthy donors, and it did not impact survival outcomes in MDS patients. *DNMT3A* expression was not modulated during erythroid differentiation of CD34⁺ cells from normal individuals and patients with MDS. In leukemic cell lines models of differentiation, we observed a significantly increase in the *DNMT3A* expression during granulocytic differentiation, but not in erythrocytic and megakaryocytic differentiation. The *DNMT3A*

silencing did not result in significant changes in apoptosis, proliferation and cell cycle in leukemic cell lines HL60 and U937. PTEN gene and protein expression was not modulated in leukemic cell lines submitted to inhibition of DNMT3A.

The findings reported here suggest that, similarly to the presence of *TET2* mutations, the low expression of *TET2* can participate in the process of cell transformation in high risk MDS and AML. Clinical studies should consider the investigation of *TET2* expression together with the studies of *TET2* mutation to defining prognosis. Our results of expression and function suggest that *DNMT3A* mutation, instead of the expression, should be the main mechanism by which DNMT3A participates in neoplastic transformation and that DNMT3A function may vary according to the cell line studied.

LISTA DE ABREVIACÕES

Akt - *v-akt murine thymoma viral oncogene homolog*
cDNA - *complementary DNA*
DNA - *Desoxiribonucleic Acid*
DNMT3A – *DNA methyltransferase 3A*
FAB - *French-American-British*
IPSS - *International Prognostic Score System*
LLA - *Leucemia linfóide aguda*
LMA - *Leucemia mieloide aguda*
LMC - *Leucemia mieloide crônica*
LMMC – *Leucemia mielomonocítica crônica*
LOH – *Loss of heterozygosity*
mTOR – *Mammalian target of rapamycin*
MTT - *Methylthiazolotetrazolium*
NGS – *Next generation sequencing*
NMP – *Neoplasia mieloproliferativa*
NOD-SCID – *Nonobese diabetic mice with severe combined immunodeficiency*
OMS – *Organização Mundial da Saúde*
PBS (*Phosphate buffered saline*)
PCR - *Polymerase Chain Reaction*
PCRq – *PCR quantitativo*
PI3K - *phosphoinositide-3-kinase*
P70S6K - *70 kDa ribosomal protein S6 kinase 1*
RNA - *Ribonucleic Acid*
shRNA – *short hairpin RNA*
SMD - *Síndrome mielodisplásica*
SNP-A – *Single nucleotide polymorphism - array*
TET2 – *Ten eleven translocation 3*
UPD – *Uniparental disomy*
WHO - *World Health Organization*

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Características dos pacientes com SMD e LMA	56
Tabela 2. Descrição das linhagens leucêmicas	57
Tabela 3. Sequências de iniciadores utilizados para PCR quantitativo	59
Tabela 4. Características clínicas dos pacientes com Síndrome Mielodisplásica ao diagnóstico e no momento da progressão da doença (utilizado na Figura 7).....	76
Tabela 5. Características clínicas e laboratoriais dos pacientes com Síndrome Mielodisplásica categorizados de acordo com a expressão de <i>TET2</i>	78
Tabela 6. Análise de sobrevida de pacientes com Síndrome Mielodisplásica	79
Tabela 7. Características clínicas e laboratoriais dos pacientes com Síndrome Mielodisplásica categorizados de acordo com a expressão de <i>DNMT3A</i>	82

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Modelo de desenvolvimento e progressão das síndromes mielodisplásicas (SMD). Alterações genéticas e epigenéticas iniciais podem alterar os processos de diferenciação celular com consequente ocorrência de SMD, expansão do clone neoplásico, aumento da apoptose intramedular e displasia. Durante a evolução, o clone neoplásico sofre eventos adicionais de alterações moleculares que conferem uma proliferação descontrolada (mutação *NRAS*, por exemplo) e/ou resistência a apoptose (mutação *TP53*, por exemplo), inibição da diferenciação celular e acúmulo de blastos, caracterizando a leucemia mieloide aguda (LMA) secundária (adaptado de ISSA [1]). 35
- Figura 2. Δ Rn e ciclos de amplificação do gene *TET2* e *DNMT3A*. As curvas de amplificação de *TET2* (A) e *DNMT3A* (B) são ilustradas na figura. O eixo y indica o Δ Rn (intensidade de fluorescência) e o eixo x indica o número de ciclos. 60
- Figura 3. Curva de dissociação de *TET2* e *DNMT3A* baseadas na temperatura de anelamento. As temperaturas resultantes da curva de dissociação para *TET2* (A) e *DNMT3A* (B) estão demonstradas na figura. A presença de apenas um pico na curva demonstra a especificidade dos iniciadores..... 61
- Figura 4. Curvas de eficiência de *DNMT3A*. Os 5 pontos obtidos no teste de eficiência estão ilustrados na figura. O eixo y indica o Ct e o eixo x a concentração do cDNA utilizado. Os iniciadores apresentaram eficiência próxima de 100% e uma inclinação de -3.46. 62
- Figura 5. Expressão gênica de *DNMT3A* e *TET2* em linhagens celulares leucêmicas. PCRq foi realizado a partir de cDNA de linhagens celulares leucêmias. O eixo y representa a intensidade relativa de expressão do RNAm de *TET2* (A) e *DNMT3A* (B). A amostra de K562 foi utilizada como amostra calibradora. 73
- Figura 6. Expressão do RNAm de *TET2* em células hematopoéticas de controles normais e de pacientes com Síndrome Mielodisplásica (SMD) e Leucemia Mieloide Aguda (LMA). PCRq foi realizado a partir de cDNA de células totais de medula óssea de pacientes com diagnóstico de SMD (n=58), LMA (n=53) ou de doadores normais (n=22). O eixo y representa a intensidade relativa de expressão do RNAm de *TET2*. Uma amostra de doador normal foi utilizada como calibradora. As linhas horizontais representam a mediana. Note que a expressão do RNAm de *TET2* foi significativamente menor em pacientes com SMD e LMA, quando comparadas à expressão em células hematopoéticas normais (A) e em pacientes SMD alto risco quando comparados com SMD baixo risco (B); *Mann-Whitney*..... 74
- Figura 7. Expressão do RNAm de *TET2* em células hematopoéticas de pacientes com Síndrome Mielodisplásica (SMD) ao diagnóstico e na progressão da doença. PCRq foi realizado a partir de cDNA de células totais de medula óssea de pacientes no momento do diagnóstico de SMD e na progressão da doença. Note que a expressão do RNAm de *TET2* foi significativamente menor em quatro dos cinco pacientes com SMD baixo risco que evoluíram para SMD alto risco ou LMA com alterações displásicas relacionadas à SMD (AML-ARM). 75
- Figura 8. Expressão do RNAm de *DNMT3A* em células hematopoéticas de controles normais e de pacientes com Síndrome Mielodisplásica (SMD) e Leucemia Mieloide Aguda (LMA). PCRq foi realizado a partir de cDNA de células totais de medula óssea de pacientes com diagnóstico de SMD (n=54), LMA (n=50) ou de controles normais

- (n=22). O eixo y representa a intensidade relativa de expressão do RNAm de *DNMT3A*. Uma amostra de doador normal foi utilizada como amostra calibradora. As linhas horizontais representam a mediana. Note que a expressão do RNAm de *DNMT3A* foi semelhante entre pacientes com SMD e LMA quando comparados com células hematopoéticas normais (A) e em pacientes SMD baixo risco quando comparados a SMD alto risco (B). 80
- Figura 9. Diferenciação eritroide de células CD34⁺ de medula óssea de doadores normais e de pacientes com Síndrome Mielodisplásica (SMD). *Dot plot* representativos de um doador normal (A) e um paciente com SMD (B) nos dias 6 e 12 de diferenciação eritroide. O aumento na expressão de ambos os marcadores de superfície celular Glicoforina A (GPA) e Transferrina (CD71), característicos de eritrócitos maduros, comprova a diferenciação das células no dia 12..... 83
- Figura 10. Diferenciação eritroide de células CD34⁺ de medula óssea de doadores normais e de pacientes com Síndrome Mielodisplásica (SMD). Análise por PCRq da expressão de *TET2* em células CD34⁺ de doadores normais (A) e pacientes com SMD (B) nos dias 6, 8 e 12 da diferenciação eritroide. A expressão de *TET2* aumentou significativamente no dia 12 de diferenciação. As linhas horizontais indicam os valores medianos. Os valores de *p* são indicados na figura..... 84
- Figura 11. Diferenciação eritroide de células CD34⁺ de medula óssea de doadores normais e de pacientes com Síndrome Mielodisplásica (SMD). Análise por PCRq da expressão de *DNMT3A* em células CD34⁺ de doadores normais (A) e pacientes com SMD (B) nos dias 6, 8 e 12 da diferenciação eritroide. A expressão de *DNMT3A* não se alterou durante os estágios de diferenciação. As linhas horizontais indicam os valores medianos..... 84
- Figura 12. Expressão de *TET2* e *DNMT3A* durante a diferenciação megacariocítica de células K562 tratadas ou não com indutor de diferenciação PMA. *Dot Plots* das células K562 tratadas ou não com PMA, comprovando a diferenciação megacariocítica através do aumento da expressão de CD61 (A). Análise por PCRq da expressão de *TET2* (B) e *DNMT3A* (C) em células K562 tratadas ou não com PMA. A expressão de *TET2* aumentou significativamente nas células tratadas, enquanto a de *DNMT3A* apresenta um aumento não significativo durante a diferenciação megacariocítica. Os valores de *p* são indicados na figura. 86
- Figura 13. Expressão de *TET2* e *DNMT3A* durante a diferenciação granulocítica de células NB4 tratadas ou não com indutor de diferenciação ATRA. *Dot Plots* das células NB4 tratadas ou não com ATRA, comprovando a diferenciação granulocítica através do aumento da expressão de CD11b (A). Análise por PCRq da expressão de *TET2* (B) e *DNMT3A* (C) em células NB4 tratadas ou não com ATRA. A expressão de *TET2* e *DNMT3A* aumentou significativamente nas células induzidas à diferenciação granulocítica. Os valores de *p* são indicados na figura..... 87
- Figura 14. Expressão de *TET2* e *DNMT3A* durante a diferenciação eritroide de células KU812 tratadas ou não com indutores de diferenciação HE e HU. Análise morfológica através de microscopia óptica das células KU812 tratadas ou não com HE e HU, comprovando a diferenciação eritroide através da verificação de modificações no formato celular e presença de hemoglobina nas células após tratamento (A). Análise por PCRq da expressão de *TET2* (B) e *DNMT3A* (C) em células KU812 tratadas ou não com HE e HU. A expressão de *TET2* apresentou um aumento não significativo e a

- expressão de *DNMT3A* não se alterou nas células induzidas a diferenciação eritroide. 88
- Figura 15. ShRNA específico para TET2 mediado por lentivírus não resultou no silenciamento efetivo de TET2 em células HL60 e U937. A quantificação da expressão de *TET2* nas células HL60 (A) e U937 (B) shTET2 não diferiu estatisticamente das células shControle. Expressão dos níveis de *TET2* foi normalizada pelo controle endógeno *HPRT* (A). Os resultados foram analisados usando $2^{-\Delta\Delta CT}$ 89
- Figura 16. ShRNA específico para DNMT3A mediado por lentivírus resultou no silenciamento efetivo de DNMT3A em células HL60 e U937. A quantificação da expressão de DNMT3A nas células shDNMT3A em relação a células shControle. Expressão dos níveis de *DNMT3A* foi normalizada pelo controle endógeno *HPRT* (A). Os resultados foram analisados usando $2^{-\Delta\Delta CT}$. Análise por *Western Blot* de extratos proteicos de células shDNMT3A e shControl (B). A membrana foi incubada com anticorpos anti- DNMT3A (100 kDa) ou anti-Actina (42 kDa) como controle da quantidade de proteína aplicada no gel. A membrana de nitrocelulose foi revelada com *ECL Western Blot Analysis System*. Os gráficos de barras representam a média±DP das intensidades de bandas de 3 experimentos independentes. A expressão proteica de DNMT3A foi corrigida pela expressão de actina correspondente (Scion Image software). Teste *t Student*. 91
- Figura 17. O silenciamento de *DNMT3A* não altera a proliferação celular em células HL60 e U937. A proliferação celular foi determinada pelo ensaio de MTT após 48 horas de incubação de células shDNMT3A e shControle em células HL60 (A) e U937 (B). Os resultados são apresentados como média± DP de seis replicatas e é representativo de 3 experimentos independentes. Teste de *Mann-Whitney*. 92
- Figura 18. O silenciamento do DNMT3A não altera a clonogenicidade em células HL60 e U937. Colônias contendo células viáveis foram detectadas pela adição de MTT após 8 dias de incubação de células HL60 (A) e U937 (B) shDNMT3A e shControle. Os resultados são apresentados como média±DP de 3 experimentos independentes realizados em duplicatas. Teste *t Student*. 93
- Figura 19. O silenciamento de DNMT3A não altera o ciclo celular em células HL60 e U937. Fases do ciclo celular foram detectadas por citometria de fluxo em células HL60 (A) e U937 (B) shControle e shDNMT3A incubadas por 48 horas, utilizando marcação com anexina-V e PI. Resultados são expressos como porcentagem do total de células nas fases G0/G1, S e G2/M. Três experimentos independentes foram realizados e a média±DP são apresentadas. Teste *t Student*. 94
- Figura 20. O silenciamento de DNMT3A não altera a apoptose em células HL60 e U937. A apoptose foi detectada por citometria de fluxo em células HL60 (A) e U937 (B) shControle e shDNMT3A incubadas por 48 horas, utilizando marcação com anexina-V e PI. Os números indicam a porcentagem de células nos quadrantes. O quadrante inferior direito contém a população de células apoptóticas (anexina-V+/PI-). Os resultados são representativos de três experimentos independentes. 95
- Figura 21. O silenciamento de DNMT3A não altera a expressão gênica de *PTEN* em células HL60 e U937. Quantificação da expressão de RNAm de *PTEN* nas células HL60 (A) e U937 (B) shDNMT3A em relação a células shControle. A expressão relativa de *PTEN* foi normalizada pelo controle endógeno *HPRT*. O eixo y representa a intensidade

relativa de expressão do RNAm de <i>PTEN</i> . As linhas horizontais representam a mediana. Teste <i>t Student</i>	96
Figura 22. O silenciamento de DNMT3A não modulou a expressão proteica e a fosforilação de PTEN e P70S6K em células HL60 e U937. Extrato proteico de células HL60 (A) e U937 (B) controle (shControle) e inibidas para DNMT3A (shDNMT3A) foi submetido a <i>Western blot</i> para avaliação da expressão de PTEN e P70S6K fosforilados (p); as membranas foram reincubadas com o anticorpo para detecção da proteína total respectiva. A membrana foi incubada com anticorpos anti-Actina (42 kDa) como controle da quantidade de proteína aplicada no gel.....	97

SUMÁRIO

RESUMO.....	xi
ABSTRACT.....	xv
LISTA DE ABREVIACÕES.....	xix
LISTA DE TABELAS.....	xxi
LISTA DE FIGURAS.....	xxiii
INTRODUÇÃO.....	29
Síndromes mielodisplásicas e leucemias mieloides agudas	31
Instabilidade genômica e neoplasias.....	35
Alterações epigenéticas e neoplasias mieloides	36
Alterações genéticas e neoplasias mieloides	38
TET2 e sua participação no desenvolvimento de neoplasias mieloides	41
DNMT3A e sua participação no desenvolvimento de neoplasias mieloides.....	44
OBJETIVOS	49
Objetivo Geral	51
Objetivos específicos:.....	51
MATERIAIS E MÉTODOS.....	53
Casuística.....	55
Células hematopoéticas normais	55
Células hematopoéticas de pacientes com diagnóstico de SMD e LMA	55
Linhagens celulares	57
Extração do RNA.....	58
Transcrição do cDNA.....	58
PCR quantitativo (PCRq)	59
Diferenciação eritroide de células CD34 ⁺ de doadores normais e pacientes com SMD ..	63
Diferenciação das linhagens celulares leucêmicas	64
Transdução de lentivírus para o silenciamento do <i>DNMT3A</i>	64
Padronização do silenciamento de TET2 através da metodologia de lentivirus	65
<i>Western Blot</i>	66
Ensaio de Methylthiazoletetrazolium (MTT)	68
Ensaio de formação de colônia.....	68
Análise do ciclo celular	69
Avaliação de apoptose por marcação com anexina-V e PI	69
Análises Estatísticas	69
RESULTADOS.....	71
Expressão de <i>TET2</i> e <i>DNMT3A</i> em linhagens leucêmicas.....	73
Análise da expressão gênica de <i>TET2</i> em amostras de medula óssea de controles e de pacientes com SMD ou LMA.....	74

Análise da expressão gênica de <i>TET2</i> em amostras sequenciais de pacientes com SMD ao diagnóstico e na progressão da doença	75
Impacto da expressão de <i>TET2</i> no fenótipo clínico e sobrevida dos pacientes com SMD	76
Análise da expressão gênica de <i>DNMT3A</i> em amostras de medula óssea de controles normais e de pacientes com SMD ou LMA	80
Impacto da expressão de <i>DNMT3A</i> no fenótipo clínico e sobrevida dos pacientes com SMD.....	81
Análise da expressão de <i>TET2</i> e <i>DNMT3A</i> durante a diferenciação eritroide de células CD34 ⁺ derivadas de medula óssea de doadores normais e pacientes com SMD	83
Análise da expressão gênica de <i>TET2</i> e <i>DNMT3A</i> durante a diferenciação celular em modelos de linhagem leucêmica.....	85
Padronização do silenciamento do TET2 em células HL60 e U937 por shRNA mediado por lentivírus	89
Avaliação da efetividade do silenciamento do DNMT3A.....	91
Avaliação do efeito do silenciamento do DNMT3A na proliferação de células HL60 e U937	92
Avaliação do efeito do silenciamento do DNMT3A na formação de colônias em células HL60 e U937	93
Avaliação do efeito do silenciamento do DNMT3A no ciclo celular em células HL60 e U937	94
Avaliação do efeito do silenciamento do DNMT3A na apoptose em células HL60 e U937	95
Avaliação do efeito do silenciamento do DNMT3A na via de sinalização mTOR/Akt...	96
DISCUSSÃO	99
CONCLUSÃO	109
REFERÊNCIAS.....	113
ANEXO I	121
ANEXO II.....	123
ANEXO III.....	125
ANEXO IV	127

As neoplasias mieloides compreendem um grupo heterogêneo de doenças hematológicas. A transformação celular resulta de uma combinação de eventos genéticos e epigenéticos que conferem a capacidade de proliferação e/ou defeitos na diferenciação e apoptose celular [1]. Nas síndromes mielodisplásicas (SMD), defeitos na apoptose, proliferação e diferenciação celular tem como consequência uma hematopoese displásica. Nas leucemias mieloides agudas (LMA) ocorre alta taxa de proliferação celular de células imaturas, com consequente acúmulo de blastos. Em neoplasias mieloproliferativas crônicas (NMP), ocorre aumento da proliferação celular e acúmulo de células diferenciadas [2].

Síndromes mielodisplásicas e leucemias mieloides agudas

Síndromes Mielodisplásicas (SMD) são desordens clonais caracterizadas por hematopoese ineficaz, citopenias do sangue periférico e risco de progressão para LMA [3-6]. O fenótipo clínico dos pacientes com SMD é diverso no que diz respeito ao número e gravidade das citopenias, celularidade e contagem de blastos na medula óssea, taxa de progressão para LMA, sobrevida global e resposta ao tratamento. Grande parte dessa diversidade se deve provavelmente a variedade de alterações genéticas que contribuem para a patogênese da doença [7]. Desvendar a complexidade genética das SMD pode auxiliar no entendimento da fisiopatologia da doença, refinar a taxonomia dos sistemas de classificação prognóstica e indicar novos alvos terapêuticos.

As alterações que sabidamente levam ao desenvolvimento da SMD são as duplicações e deleções cromossômicas que podem ser detectadas através da citogenética convencional, a qual está alterada em aproximadamente 40% dos pacientes com SMD [8].

Novas tecnologias mais sensíveis, como os microarranjos de DNA identificam alterações no número de cópias ou dissomias uniparentais adquiridas em 75% dos pacientes com SMD [9-11]. Outras alterações que contribuem para a ocorrência de SMD são as mutações que alteram a sequência de nucleotídeos dos genes e as anormalidades epigenéticas. A maioria dos pacientes possui mutações que alteram a sequência e função de oncogenes ou supressores de tumor e alterações epigenéticas, que resultam em expressão gênica aberrante [7, 12, 13]. Os estágios associados à patogênese das SMD são:

1. Aquisição da capacidade de autorrenovação em uma célula progenitora;
2. Aumento da capacidade de proliferação no clone transformado;
3. Bloqueio ou diminuição da diferenciação celular;
4. Instabilidade genômica;
5. Mecanismos antiapoptóticos ativados na célula transformada;
6. Evasão do sistema imune;
7. Supressão da hematopoese normal.

Um microambiente anormal na medula óssea pode favorecer o aparecimento do clone neoplásico e a expansão clonal adicional pode surgir do aumento da proliferação ou da resistência à apoptose. A maneira como cada processo celular é afetado pode determinar a manifestação clínica da doença, incluindo diferentes graus de citopenias e diferentes riscos de evolução para LMA e sobrevida global [7].

Alterações citogenéticas foram inicialmente incorporadas na estratificação de risco dos pacientes com SMD a partir do estudo que definiu o *International Prognostic Score System* (IPSS) [14] e passaram a ser incorporadas na classificação da doença pela Organização Mundial da Saúde (OMS) (*World Health Organization*, WHO) a partir de

2000 [15]. Entretanto, mutações pontuais, padrão epigenético e padrão de expressão gênica não foram integrados aos sistemas de classificação diagnóstica ou prognóstica até o momento. O catálogo dos genes que participam da fisiopatologia das SMD tem aumentado rapidamente nos últimos anos e estudos recentes têm direcionado a investigação da biologia e consequência clínica de cada alteração genética conhecida [16].

As SMD primárias foram classificadas em 1982 pelo grupo cooperativo Franco-Americano-Britânico (FAB) nas seguintes categorias: anemia refratária (AR), anemia refratária com sideroblastos em anel (ARSA), anemia refratária com excesso de blastos (AREB), anemia refratária com excesso de blastos em transformação (AREBt), e leucemia mielomonocítica crônica (LMMC), apresentando dentre estas classes um número variado de precursores imaturos na medula (de 0% até <30% de blastos) [3]. Em 2008, a OMS propôs uma revisão na classificação, com modificações que melhoram o valor prognóstico da mesma [15, 17]. As modificações dizem respeito a: 1) diminuição do número de blastos na medula óssea para definir leucemia mieloide aguda (de <30 para <20%), eliminando o subgrupo anemia refratária com excesso de blastos em transformação; 2) separação dos subgrupos AR e ARSA em 4 entidades, dependendo se há comprometimento único ou múltiplo das linhagens hematopoéticas, ou se há deleção do cromossomo 5q; 3) subdivisão do subgrupo AREB em duas categorias dependendo do número de blastos na medula óssea (5-9% blastos ou 10-19% blastos); 4) transferência do subgrupo leucemia mielomonocítica crônica (LMMC) das SMD para um novo grupo de neoplasias hematológicas denominado SMD/NMP. Deste modo, as SMD são classificadas, segundo a OMS 2008, nas seguintes categorias: anemia refratária com sideroblastos em anel (ARSA), citopenia refratária com displasia unilinear (CRDU), citopenia refratária com displasia multilinear (CRDM), anemia

refratária com excesso de blastos-1 e 2 (AREB-1 e AREB-2), SMD não classificada e SMD com deleção isolada no cromossomo 5q.

O IPSS foi definido a partir do estudo de 816 pacientes com SMD e é capaz de prever a sobrevida e risco de evolução para LMA, a depender do número de citopenias, número de blastos no aspirado de medula óssea e citogenética [14]. O IPSS foi revisado em 2012, em um estudo que incluiu 7012 pacientes, propondo modificações nos parâmetros prognósticos [18]. As alterações mais importantes foram a incorporação da gravidade de citopenias e a nova definição de risco baseada nas alterações citogenéticas, incluindo novas anomalias citogenéticas que definiram cinco categorias de prognóstico: muito bom, bom, intermediário, ruim, e muito ruim. Alterações citogenéticas com ≥ 3 anormalidades foram consideradas de prognóstico muito ruim, enquanto que a presença de 3 anormalidades foi definida como prognóstico ruim. A del(7q) ou monossomia do 7 foram definidas como prognóstico intermediário, enquanto que as alterações no cromossomo 7 associadas a outra alteração citogenética foram considerada como prognóstico ruim [8, 18].

As leucemias agudas constituem um grupo heterogêneo de doenças malignas caracterizadas por defeitos na diferenciação e elevada proliferação de progenitores hematopoéticos, resultando na expansão e acúmulo de blastos [2, 19, 20]. Anemia, neutropenia, trombocitopenia e potencial para infiltração de órgãos como fígado, baço, e linfonodos são características da doença. As leucemias agudas são subdivididas em leucemia mieloide aguda (LMA) e leucemia linfóide aguda (LLA) dependendo da presença de mieloblastos ou linfoblastos, respectivamente. A LMA pode ser *de novo* ou pode ser decorrente da evolução de SMD, neste caso, definida como LMA com alterações

displásicas relacionadas à SMD [19]. O modelo da patogênese da SMD e sua evolução para LMA estão ilustrado na Figura 1.

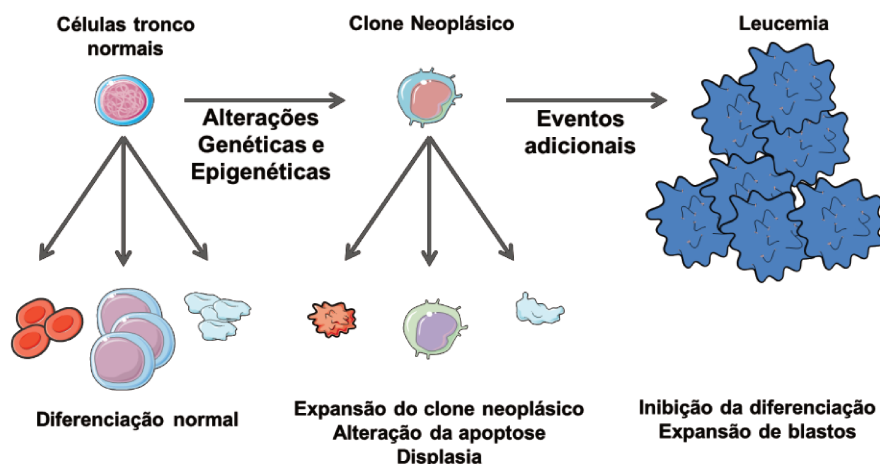


Figura 1. Modelo de desenvolvimento e progressão das síndromes mielodisplásicas (SMD). Alterações genéticas e epigenéticas iniciais podem alterar os processos de diferenciação celular com consequente ocorrência de SMD, expansão do clone neoplásico, aumento da apoptose intramedular e displasia. Durante a evolução, o clone neoplásico sofre eventos adicionais de alterações moleculares que conferem uma proliferação descontrolada (mutação *NRAS*, por exemplo) e/ou resistência a apoptose (mutação *TP53*, por exemplo), inibição da diferenciação celular e acúmulo de blastos, caracterizando a leucemia mieloide aguda (LMA) secundária (adaptado de ISSA [1]).

Certos genótipos mutantes conferem vantagem seletiva a subclones de células, permitindo seu crescimento e eventual domínio em um ambiente tecidual local. Assim, a progressão do câncer resulta de uma sucessão de expansões clonais, desencadeadas pela aquisição ou ativação de um genótipo mutante. A inativação de genes supressores tumorais pode ocorrer através de alterações na sequência de nucleotídeos ou através de mecanismos epigenéticos como metilação do DNA e modificações de histonas, que não alteram nucleotídeos, mas afetam a regulação da expressão gênica. Danos em um ou mais componentes da maquinaria de reparo do DNA podem ser decorrentes da exposição a

agentes mutagênicos, com consequente aumento da susceptibilidade às mutações. Adicionalmente, o acúmulo de mutações pode ser acelerado por comprometer os sistemas de vigilância que monitora normalmente a integridade e forçam células geneticamente danificadas à senescência ou à apoptose. Avanços na análise molecular de células cancerosas têm fornecido evidências de alterações que levam à instabilidade genômica durante a progressão tumoral [21, 22].

Alterações epigenéticas e neoplasias mieloides

As alterações epigenéticas compreendem as alterações estáveis na expressão gênica controladas por outros fatores que não alterações na sequência de nucleotídeos. Os principais mecanismos epigenéticos são a metilação de promotores, trimetilação de histonas e desacetilação das histonas. As alterações epigenéticas podem causar impacto significativo na estrutura da cromatina e na atividade transcricional e, ao contrário das alterações genéticas, são um fenômeno reversível [23, 24].

Metilação do DNA é uma modificação epigenética e importante mecanismo de controle celular constitutivamente ativado, promovendo *imprinting* parental e inativação do cromossomo X [25]. O processo consiste na adição de grupos metil na posição C5 do anel pirimídico da citosina, convertendo 5-citosina (5C) a 5-metilcitosina (5mC). Essa reação ocorre quando citosina é seguida por guanina (chamada de dinucleotídeo CpG), é mediada por metiltransferases do DNA (DNMTs) e S- adenosil-metionina é o doador de grupos metil [26]. Regiões ricas em CpG (chamadas ilhas CpG) são pouco encontradas em mamíferos devido às propriedades mutagênicas do 5-mC, mas encontram-se associadas a

regiões promotoras em aproximadamente 60% dos genes em humanos, principalmente aqueles tecido específicos e relacionados ao desenvolvimento. O que se verifica ao longo do desenvolvimento embrionário é a perda de metilação no zigoto, sendo a metilação *de novo* responsável pela perda da pluripotência, permitindo o comprometimento com linhagens celulares específicas [27]. Células tronco embrionárias são derivadas da massa celular interna do blastocisto e pluripotentes, podendo diferenciar-se nas três camadas germinativas. Modificações epigenéticas contribuem para determinar a identidade tecido-específica das células [28]. Padrões de metilação aberrantes, que podem induzir ao silenciamento transcricional por impedir a ligação de fatores de transcrição ou recrutar proteínas repressoras foram identificados como mecanismo epigenético chave no processo de transformação maligna [29, 30]. Em células normais, apenas os dinucleotídeos CpG que não compõem ilhas CpG (presentes ao longo do gene e fora de regiões promotoras) encontram-se metilados. Isso inibe a transcrição críptica e mantém a estabilidade genômica. Em células cancerosas, o que se verifica é hipometilação global, que pode estar relacionada à tumorigênese por promover instabilidade genômica e hipermetilação de ilhas CpG em promotores gênicos, e está associada ao compactamento da cromatina e ao silenciamento do gene. Um grande número de genes envolvidos em diferentes vias de sinalização celular tem sido descrito como afetados por metilação associada ao silenciamento transcricional em desordens hematopoéticas e o estudo desse padrão aberrante tem influenciado o tratamento de pacientes através do desenvolvimento de agentes reguladores epigenéticos [31].

A identificação de alterações epigenéticas em SMD permitiu a aprovação do uso de inibidores de metiltransferases de DNA (DNMTs), azacitidina e decitabina (5-aza-2'-

deoxycytidine), para pacientes com SMD de alto risco, resultando em 20% de resposta global e melhora significativa na sobrevida destes pacientes [32-34]. Interessantemente, o grau de hipermetilação de promotores não define resposta aos inibidores de DNMTs [35]. Recentemente, mutações em *TET2* e *DNMT3A* foram identificadas como fatores preditivos de resposta a agentes hipometilantes em SMD e LMA [36-38], mas o mecanismo biológico que justifica esta associação ainda não foi definido. Os inibidores de DNMTs podem induzir a re-expressão de genes supressores de tumor inapropriadamente silenciados, mas esta explicação é provavelmente muito simplista, uma vez que estas drogas e seus alvos possuem muitos efeitos.

Alterações genéticas e neoplasias mieloides

Alterações genéticas são irreversíveis, envolvem mudanças cromossômicas e alterações na sequência do DNA e podem resultar na ativação de oncogenes, inativação de genes supressores de tumor ou na formação de genes quiméricos com função modificada e consequente fenótipo maligno das células [39]. Desde que Janet Rowley identificou a translocação cromossômica t(9;22)(q34;q11) associada à leucemia mieloide crônica (LMC) [40], um conjunto de dados tem sido descrito evidenciando a importância de alterações citogenéticas no diagnóstico e na terapêutica de neoplasias mieloides específicas [41-43]. A relevância das alterações citogenéticas na estratificação de risco em SMD foi bem definida pelo IPSS em 1997 [14] e revisada pelo R-IPSS em 2012 [8, 18]. Estudos recentes evidenciaram a importância de mutações em genes específicos, não detectáveis através da

citogenética convencional, além de alterações epigenéticas que regulam a expressão gênica [12].

Mutações podem ser inserções, deleções ou troca de bases nitrogenadas isoladamente (mutações de ponto) e tem efeitos distintos na célula de acordo com a região e função do gene atingido. Em uma célula normal, proto-oncogenes codificam proteínas que dependem de sinalização celular para ativar o ciclo celular e inativar a apoptose. Mutações em proto-oncogenes fazem com que a atividade da proteína resultante fique desacoplada da sua via regulatória normal, levando à sua expressão desregulada contínua. Mutações podem resultar em funções alteradas de uma proteína transdutora de sinal, e translocações cromossômicas podem originar proteínas de fusão com atividade oncogênica, que por sua vez podem alterar a expressão de uma proteína envolvida na sobrevivência celular. Em contrapartida, genes supressores tumorais codificam reguladores negativos de ciclo celular ou reguladores positivos da apoptose. Portanto, mutações em homozigose em genes supressores de tumor, podem resultar na inibição da função de uma proteína que controla a proliferação celular e/ou promove a apoptose e consequentemente a célula perde o freio para a proliferação celular. Mutações em proto-oncogenes possuem propriedades oncogênicas que levam ao ganho de função da proteína na promoção do ciclo celular e inibição da apoptose, mesmo em heterozigose [44].

O uso de novas tecnologias incluindo *arrays* de polimorfismos de único nucleotídeo (*Single Nucleotide Polimorfism Array*- SNP-A) [45, 46] e o sequenciamento de segunda geração ou próxima geração (*Next Generation Sequence* - NGS) [47] permitiu a identificação de genes mutados em SMD e LMA e que participam da fisiopatologia da doença [48-52]. A tecnologia de SNP-A permite detecção de lesões não visualizadas na

citogenética convencional, a avaliação do número de cópias alélicas e genotipagem. Dessa forma, sua grande vantagem é a detecção de perda neutra de heterozigose ou dissomia uniparental (*Uniparental dissomy* - UPD), que consiste na perda de um alelo e duplicação do alelo remanescente. A identificação de regiões comumente deletadas, UPDs ou trissomia sugere a existência de regiões que contenham um gene supressor de tumor ou oncogene potencialmente mutado [46]. A identificação de região de UPD no cromossomo 4q em indivíduos com SMD e o sequenciamento dos genes presentes nessa região permitiu a identificação de mutação no gene *TET2* [50, 53]. A tecnologia de sequenciamento de segunda geração permitiu a identificação de mutações em outros genes em neoplasias mieloides, incluindo o *DNMT3A* [49].

Uma combinação de duas ou mais mutações pode ser necessária em conjunto com alterações epigenéticas para o fenótipo neoplásico. Mutações em diferentes vias de sinalização, acometendo genes envolvidos na modificação das histonas (*EZH2*, *ASXL1*, *UTX*), regulação epigenética (*DNMT3A*, *TET2*, *IDH1/2*), sinalização celular (*RAS*, *JAK2*, *CBL*), fatores de transcrição (*RUNX1*, *TP53*) e *splicing* de RNA (*SF3B1*, *SRSF2*, *U2AF1*) foram descritas em neoplasias hematológicas, incluindo as SMD e LMA [39, 49-52, 54-61]. A identificação de um grande número de genes mutados em SMD e LMA como *TET2* e *DNMT3A* sugeriu novos genes como envolvidos na hematopoese normal e neoplásica e abriu uma nova frente de investigação. Um novo desafio passou a ser o estudo funcional desses genes e de sua participação na hematopoese e na fisiopatologia das neoplasias mieloides.

TET2 e sua participação no desenvolvimento de neoplasias mieloides

As proteínas da família TET, TET1, TET2 e TET3, são 2-oxiglutarato dioxigenases Fe(II)-dependentes que têm a capacidade de converter 5-metilcitosina (5mC) em 5-hidroximetilcitosina (5hmC) *in vitro* e *in vivo*. Além da subunidade catalítica conservada de ligação ao ferro, TET1 e TET3 também possuem um domínio CXXC. Este domínio de ligação de DNA tem sido descrito como um sítio de ligação à CpG, que pode estar envolvido no recrutamento de TET1 e TET3 ao DNA [62].

As proteínas TET apresentam expressão diferencial em células tronco embrionárias, TET1 é altamente expresso e TET2 tem expressão reduzida. A atividade enzimática de TET2 parece estar relacionada à desmetilação de genes pluripotenciais de células-tronco, garantindo que essas possam se comprometer com alguma linhagem específica [63] embora outra função independente de sua atividade enzimática, realizada através de recrutamento e ligação a diferentes proteínas, pareça reprimir a expressão gênica ao invés de induzi-la através de desmetilação [64, 65]. Os níveis de 5hmC também variam significativamente entre os tecidos, com níveis altos reportados para células cerebrais e células-tronco embrionárias, por exemplo, e níveis baixos encontrados em outros tipos celulares diferenciados [64]. Outro fato interessante é que 5hmC parece alterar o ambiente local da cromatina através do recrutamento ou deslocamento de outras proteínas: a maioria das proteínas que se ligam à 5mC não reconhecem 5hmC e se dissociam do DNA quando 5mC é convertido [65].

A geração de 5hmC pode estar envolvida com a desmetilação do DNA. Inicialmente, esta pode dar-se por meio de um mecanismo passivo em que 5hmC, diferente

de 5mC, não é mantido através de replicação do DNA. A desmetilação passiva do DNA seria particularmente relevante em células que se dividem rapidamente, como as células tronco embrionárias. O fato de que as células do cérebro não se dividem rapidamente e apresentam altos níveis de 5hmC suporta esse modelo. Além disso, tem sido demonstrado que DNMT1 metila DNA contendo 5hmC com uma menor eficiência do que metila o DNA hemimetilado. Em segundo lugar, a produção de 5hmC poderia ser um intermediário em uma via de desmetilação ativa que, em última análise, substitui 5mC por citosina em células que não se dividem [66, 67].

Mutações no *TET2* foram observadas em pacientes com NMP, SMD, SMD/NMP e LMA [50, 53, 68]. Em alguns casos, uma grande deleção é verificada no braço longo do cromossomo 4 e, em outros, a deleção afeta apenas o gene *TET2*. Além disso, regiões com UPD envolvendo *TET2* foram encontradas em pacientes com neoplasias mieloides. UPD ocorre devido à recombinação mitótica e acredita-se que leve a formação de genes homozigoticamente mutantes. A co-ocorrência de UPD envolvendo o cromossomo 4q24 e mutações homozigóticas no gene *TET2* foi confirmada por vários estudos. Mutações em *TET2* foram encontradas juntamente com a deleção de outro alelo, mas também sem deleção ou UPD [53]. A identificação de mutações em homozigose em pacientes reforça a hipótese de que *TET2* seria um supressor de tumor. Essas mutações foram observadas também em células primitivas CD34⁺CD38⁻, o que as associa à amplificação do clone mutado nos estágios iniciais da diferenciação hematopoética [50].

Sabe-se que a mutação de *TET2* representa perda da função catalítica da enzima e consequente redução nos níveis de 5hmC [63]. A mutação em *TET2* leva à diminuição dos níveis de 5hmC em granulócitos de pacientes com NMP quando comparados aos

indivíduos normais. De maneira semelhante, a inibição de *TET2* em células progenitoras CD34⁺ e em linhagens celulares leucêmicas reduziu os níveis globais de 5hmC [69]. Em uma análise comparativa, curiosamente, alguns pacientes com SMD, NMP e LMA selvagens para *TET2* também apresentaram baixos níveis de 5hmC. O padrão de metilação global não difere quando comparados controles, indivíduos com altos níveis de 5hmC e indivíduos com baixos níveis de 5hmC. No entanto, ao comparar a metilação em ilhas CpG e fora delas, verificou-se hipo e hipermetilação respectivamente. A comparação de controles e 28 amostras de tumor com baixo nível de 5hmC identificou 2512 regiões diferencialmente metiladas em pacientes, com hipometilação global [63]. Em contraste a esses resultados, Figueroa e colaboradores demonstraram que pacientes com LMA com mutação em *TET2* apresentam fenótipo de hipermetilação global do DNA [48].

Estudos recentes investigaram a participação do TET2 na hematopoese através do silenciamento de *TET2* em células CD34⁺ de indivíduos normais [69], silenciamento de *Tet2* em células CD34⁺ de camundongos [70] e em camundongos knockout para *Tet2* [71]. O silenciamento de *TET2* em células CD34⁺ de indivíduos normais teve como consequência o aumento da diferenciação mielomonocítica e redução da diferenciação eritrocítica [69]. Camundongos knockout para *Tet2* apresentaram hepatomegalia e esplenomegalia, com bloqueio na diferenciação granulocítica ou eritrocítica. Análises *in vitro* demonstraram que mutação em *TET2*, com consequente dano em seu domínio catalítico, promove um atraso na diferenciação de células tronco hematopoéticas e aumento de macrófagos e monócitos [71]. Moran-Crusio e colaboradores verificaram que a haploinsuficiência de *Tet2* em células hematopoéticas de camundongos levou a aumento da autorrenovação de células tronco e a hematopoese extramedular [70].

O impacto clínico da mutação de *TET2* nas neoplasias mieloides ainda é controverso [51, 68, 72-76], e os resultados podem ser explicados por diferenças nos grupos de pacientes estudados e metodologias adotadas. Por outro lado, o impacto clínico da expressão de *TET2* nestas doenças ainda não foi elucidado.

DNMT3A e sua participação no desenvolvimento de neoplasias mieloides

Os genes humanos *DNMT1*, *DNMT3A* e *DNMT3B* codificam metiltransferases do DNA, enzimas que catalizam a adição de grupos metil ao resíduo de citosina do dinucleotídeo CpG. *DNMT3A* e *DNMT3B* codificam metiltransferases ativas que são responsáveis por estabelecer o padrão primário de metilação do DNA nos primeiros estágios do desenvolvimento de mamíferos e em células germinativas, sendo por isso denominadas metiltransferases *de novo*. A proteína DNMT3A é constituída de uma porção N-terminal, que contém uma região rica em cisteína chamada domínio ADD (ATRX-DNMT3-DNMT3L) e também é conhecida como PHD (plant homeodomain). O domínio ADD adiciona íons zinco e constitui uma plataforma de interação entre proteínas, interage com a histona H3K4 e pode guiar a metilação do DNA em resposta a modificações específicas nas histonas. A proteína DNMT3A possui também um domínio PWWP, e uma porção C-terminal, que contém os sítios conservados C5 metiltransferases do DNA (domínio metiltransferase [MTase domain]) [77].

Recentemente, mutações no *DNMT3A* foram descritas como recorrentes em pacientes com neoplasias mieloides e este achado indicou uma participação do DNMT3A

na hematopoese normal e neoplásica. A maioria das mutações descritas se localiza no domínio metiltransferase da proteína, sendo o aminoácido arginina 882 (Arg882) o mais frequentemente mutado [49, 78, 79].

A análise estrutural do modelo computacional do complexo DNMT3A, histonas H3 e DNA demonstrou que Arg882 deve participar da homodimerização do DNMT3A ou da sua interação com DNA. O estudo enzimático de proteínas purificadas selvagens e mutantes para DNMT3A de *Escherichia coli* demonstrou que, comparados ao selvagem, mutantes Arg882 demonstraram redução em sua atividade de metilação do DNA. Esses estudos bioquímicos sugerem que as mutações no *DNMT3A* conferem função anormal de metilação do DNA ou de ligação à histona *in vivo*. Estudos com células 32D, uma linhagem celular mieloide murina dependente de interleucina-3 (IL3), demonstraram que aumento da expressão de mutantes Arg882His e Arg882Cys promoveu a proliferação celular mesmo na ausência de IL-3. O mesmo estudo comparou o padrão de expressão gênica entre amostras de pacientes com LMA M5, seis pacientes com mutação Arg822 e 4 pacientes sem mutação, através de microarranjos de DNA (Affymetrix). Dentre 20723 genes analisados, diferenças no nível de expressão foram observadas em 889 genes. Aumento na expressão gênica de membros da família dos genes HOX e IDH foram observados em indivíduos com mutação, assim como alteração na metilação de genes [78]. A família de proteínas HOX participa da regulação da hematopoese normal, e expressão protéica anormal de HOX é importante na patogênese da LMA e de outros cânceres [80, 81]. O mesmo grupo de pesquisadores encontrou correlação entre os níveis de expressão gênica e o perfil de metilação em 75 genes: vinte e oito genes estavam hiperexpressos e hipometilados, e 47 genes hipoexpressos e hipermetilados em amostras de pacientes com mutação em

DNMT3A. Dentre esses genes, aqueles relacionados a hematopoese e regulação epigenética apresentaram-se tanto hipermetilados como hipometilados. Hipermetilação nos genes da família HOX também foi verificada por outros autores [74]. Entretanto, Ley e colaboradores [49] descreveram que pacientes com LMA e mutação *DNMT3A* não apresentaram alteração no conteúdo total de 5-metilcitosina ou alteração na metilação gênica quando comparados aos pacientes não mutados. Igualmente importante é o fato de que a mutação *DNMT3A* Arg882 parece ocorrer exclusivamente em heterozigose, sugerindo um ganho de função ou a aquisição de uma nova função [49].

Em células de adenocarcinoma hepático, a inibição de DNMT3A resultou na inibição da proliferação celular e aumento da expressão gênica de vários genes, especialmente PTEN, através da desmetilação da região promotora desse gene [82]. PTEN é um gene supressor de tumor que pode estar silenciado através de metilação ou mutação em diferentes tipos de neoplasias, incluindo tumores sólidos e neoplasias hematológicas. PTEN exerce papel fundamental na regulação da via PI3K/AKT/mTOR, essencial para a sobrevivência celular. A perda de PTEN resulta na ativação de AKT que favorece a sobrevivência, proliferação e invasão celular [83]. Os estudos em adenocarcinoma hepático sugerem que a inibição de DNMT3A atua na proliferação celular através do seu efeito na desmetilação de supressores de tumor como PTEN [82]. O silenciamento de DNMT3A em células de melanoma murino resultou em inibição do crescimento celular e metástase [84].

A participação do *Dnmt3a* na hematopoese normal foi evidenciada em estudos utilizando modelos murinos. O silenciamento de *Dnmt3a* em células hematopoéticas progenitoras aumentou a expressão de genes envolvidos com a capacidade de autorrenovação e reduziu a expressão de genes responsáveis pelo comprometimento celular

com diferenciação celular. Células hematopoéticas silenciadas para o *Dnmt3a* exibiram hipometilação global e incompleta inibição dos genes responsáveis pelo fenótipo pluripotente [85].

Em SMD, LMA de risco citogenético intermediário e LMA M5 a presença de mutação *DNMT3A* foi associada com pior prognóstico [49, 78, 79]. Em um grupo heterogêneo de pacientes com LMA a mutação em *DNMT3A* esteve associada a uma elevada contagem de leucócitos e de blastos na medula óssea. Quando considerados apenas os pacientes sem marcadores de prognóstico citogenéticos, com exceção apenas dos rearranjos de 11q23, a mutação em *DNMT3A* esteve associada a menor taxa de resposta completa ao tratamento e pior prognóstico [74]. Apesar do impacto negativo da mutação *DNMT3A* em neoplasia mieloide ter sido identificado por diferentes grupos [86], a expressão de *DNMT3A* em neoplasias mieloide foi pouco estudada até o momento [87]. Diferentemente de *TET2*, que já está bem definido como um gene supressor de tumor e cuja mutação leva a perda de função e fenótipo neoplásico, o significado funcional da presença de mutação no *DNMT3A* ainda não foi esclarecido [88].

OBJETIVOS

Objetivo Geral

Investigar a expressão de *TET2* e *DNMT3A* em síndrome mielodisplásica e leucemia mieloide aguda.

Objetivos específicos:

- Investigar a expressão de *TET2* e *DNMT3A* em células hematopoéticas de medula óssea de indivíduos normais e de pacientes com diagnóstico de SMD e LMA
- Estudar o impacto da expressão de *TET2* e *DNMT3A* no fenótipo clínico e prognóstico de pacientes com SMD
- Investigar a expressão de *TET2* e *DNMT3A* durante a diferenciação eritroide de células CD34⁺ de indivíduos normais e pacientes com SMD
- Avaliar a expressão de *TET2* e *DNMT3A* durante a diferenciação eritrocítica, granulocítica e megacariocítica em modelos de linhagens leucêmicas
- Estudar a consequência funcional da inibição de DNMT3A na proliferação, apoptose celular, e via de sinalização do PTEN em linhagens leucêmicas HL60 e U937

Casuística

O projeto de pesquisa foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina da Unicamp (Parecer CEP 1130/2011 – Anexos I e II) e os indivíduos participantes assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Anexos III e IV).

Células hematopoéticas normais

As células hematopoéticas normais foram obtidas de medula óssea de controles normais (n=22), incluindo doadores de medula óssea para transplante alogênico de medula óssea aparentado e indivíduos submetidos a cirurgia ortopédica sem comorbidades sistêmicas, com idade mediana de 34 anos (16-69 anos).

Células hematopoéticas de pacientes com diagnóstico de SMD e LMA

Amostras de medula óssea foram obtidas de pacientes atendidos no ambulatório de Hematologia do Hemocentro da Unicamp que consentiram em participar do estudo. As amostras foram coletadas no momento do diagnóstico de LMA, no momento do diagnóstico ou durante o seguimento de SMD antes de qualquer tratamento. Utilizamos neste estudo as amostras que foram coletadas entre o período de Março de 2005 a Março de 2013, que apresentavam os dados hematológicos do diagnóstico de LMA e do momento da coleta dos pacientes com SMD, confirmação do diagnóstico de SMD ou de LMA através de mielograma, citoquímica e/ou imunofenotipagem, e que apresentavam RNA de boa qualidade no momento da realização dos experimentos. Foi incluído um total de 63 pacientes com diagnóstico de SMD e 53 pacientes com diagnóstico de LMA. As

características clínicas e o risco citogenético para os pacientes com SMD [14] e LMA [89] estão descritos na Tabela 1.

Tabela 1. Características dos pacientes com SMD e LMA

Pacientes	Número
SMD	63
Gênero	
Masculino/Feminino	38/25
Idade (anos), mediana (intervalo):	69 (16-87)
Classificação OMS 2008	
Baixo risco (AR/ARSA/CRDM/del(5q))	5/5/35/1
Alto risco (AREB-1/AREB-2)	10/7
Número de citopenias	
0/1	8/22
2/3	21/12
Risco Citogenético ¹	
Baixo risco	53
Intermediário/Alto risco	5/3
Indisponível	2
Blastos na MO (%)	
<5%	44
≥5 and < 10%	10
≥10 and < 20%	9
LMA	53
Gênero	
Masculino/Feminino	27/26
Idade (anos), mediana (intervalo):	60 (18-93)
Blastos (%), mediana (intervalo)	60 (20-98)
Risco Citogenético ²	
Baixo risco	4
Intermediário/Alto risco	29/11
Indisponível	9

Abreviações: SMD, síndrome mielodisplásica; OMS, Organização Mundial da Saúde; AR, anemia refratária; ARSA, anemia refratária com sideroblastos em anel; del(5q), SMD com del(5q) isolada; CRDM, citopenia refratária com displasia de multilinhagens; AREB-1, anemia refratária com excesso de blastos-1; AREB-2, anemia refratária com excesso de blastos-2; MO, medula óssea; LMA, leucemia mieloide aguda.

¹No grupo de pacientes com SMD, baixo risco citogenético incluiu pacientes com cariótipo normal (n=51), del(5q) (n=1) and -Y (n=1), risco intermediário incluiu trissomia do 8 (n=1) e outras anormalidades (n=4) e alto risco incluiu cariótipo complexo (n=2) e -7 (n=1).

²No grupo de pacientes com LMA, baixo risco citogenético incluiu t(8;21) (n=3) e inv(16) (n=1), risco intermediário incluiu cariótipo normal (n=21), trissomia do 8 (n=4) e outras anormalidades (n=4), alto risco incluiu cariótipo complexo (n=6), del(5q) (n=2) e -7 (n=3).

Linhagens celulares

As linhagens leucêmicas P39, NB4 e Karpas 422 foram gentilmente cedidas pela Prof. Dr Eva Hellström-Lindberg (Karolinska University, Stockholm, Sweden), Prof Dr. Eduardo Magalhães Rego (University of São Paulo, Ribeirão Preto, Brazil) e Prof. Dr Martin Dreyling (University Hospital Grosshadern/LMU, Munich, Germany), respectivamente. As demais linhagens celulares humanas de leucemias agudas foram adquiridas no ATCC, Philadelphia, USA. Foram utilizadas linhagens linfoides (Jurkat, MOLT4, Daudi, Namalwa, Raji e Karpas 422) e linhagens mieloides (K562, KU812, Nalm, NB4, HL60, P39, HEL, U937, THP1 e KG1). A descrição das linhagens leucêmicas está na Tabela 2.

Tabela 2. Descrição das linhagens leucêmicas

Linhagem	Descrição
Jurkat	Leucemia linfoide aguda T
MOLT4	Leucemia linfoide aguda T
Daudi	Leucemia linfoide aguda B/Linfoma de Burkitt
Namalwa	Linfoma de Burkitt
Raji	Leucemia linfoide aguda B/Linfoma de Burkitt
Karpas	Linfoma não-Hodgkin
K562	Leucemia mieloide crônica em fase blástica, t(9;22)
KU812	Leucemia mieloide crônica
Nalm	Leucemia linfoblástica aguda
NB4	Leucemia promielocítica aguda, t(15;17)
HL60	Leucemia mielocítica aguda
P39	Leucemia mielomonocítica secundária à mielodisplasia
HEL	Adenocarcinoma
U937	Linhagem leucêmica monocítica
THP1	Leucemia monocítica aguda
KG1	Eritroleucemia

Extração do RNA

Para obtenção de RNA, células de medula óssea (MO) foram coletadas em EDTA e submetidas à lise de hemácias com tampão contendo cloreto de amônio. O RNA de células foi isolado utilizando Trizol (Life Technologies, USA), uma adaptação do método desenvolvido por Chomczinski e Sacchi [90]. Ao precipitado, contendo 5×10^6 a 1×10^7 células, foi acrescentado 1 mL de Trizol e a amostra foi homogeneizada até que se tornasse bastante fluida.

O RNA total das células foi tratado com DNase livre de RNase 1 U/ μ L (Life Technologies), utilizando 1 U da enzima para tratar 5 μ g de RNA por 15 minutos a temperatura ambiente, a fim de eliminar uma possível contaminação deste material com DNA genômico. A reação foi interrompida pela adição de uma solução de EDTA com concentração final de 2 mM. A enzima foi inativada por uma incubação de 10 minutos a 65°C.

A quantificação do RNA obtido foi realizada através da leitura da densidade óptica (DO) de uma alíquota da amostra em espectrofotômetro com comprimento de onda equivalente a 260 nm, considerando que 1 DO a 260 nm equivale a 40 μ g/mL de RNA. A relação entre as leituras realizadas a 260 e 280 nm foi utilizada como parâmetro na estimativa do grau de contaminação do RNA por proteínas e essa varia normalmente entre 1,6 e 1,8.

Transcrição do cDNA

As amostras de RNA total, contendo 5 μ g de RNA e tratadas com DNase I, foram transcritas reversamente em cDNA (híbrido RNA-cDNA) em uma reação de volume final

de 20 µL (Life Technologies). A reação foi iniciada adicionando 1 µL de oligonucleotídeo (dT) 500 µg/mL aos 5 µg de RNA tratado. Essa mistura foi aquecida por 5 minutos a 65°C, e, em seguida, incubada no gelo. Adicionou-se então o mix contendo tampão, dNTP, a enzima Ribuloc e a enzima Revertaid. Essa mistura foi incubada por 50 minutos a 42°C. A seguir, foi feita a desnaturação da reação por 15 minutos a 70°C. As amostras de cDNA foram quantificadas através do espectrofotômetro de luz ultravioleta (Gene Quant-Pharmacia).

PCR quantitativo (PCRq)

Com auxílio dos programas Gene Runner e Primer Express (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) um par de iniciadores para *DNMT3A* foi definido, e a especificidade, temperatura de dissociação e formação de estruturas secundárias do par de iniciadores foi verificada. A sequência dos iniciadores para *TET2* foi escolhida baseada em publicação anterior [69]. As sequências dos iniciadores escolhidos e as concentrações utilizadas estão descritas na Tabela 3.

Tabela 3. Sequências de iniciadores utilizados para PCR quantitativo

	Concentração	Sequência de iniciadores
<i>DNMT3A</i>	300 nM	FW 5' TAT TGA TGA GCG CAC AAG AGA GC 3'
		RW 5' GGG TGT TCC AGG GTA ACA TTG AG 3'
<i>TET2</i>	300 nM	FW 5' ACG CAA GCC AGG CTA AAC A 3'
		RW 5' GCT GGG ACT GCT GCA TGA 3'
<i>HPRT</i>	150 nM	FW: 5' GAA CGT CTT GCT CGA GAT GTG A 3'
		RW: 5' TCC AGC AGG TCA GCA AAG AAT 3'

Com o objetivo de escolher a menor concentração dos iniciadores para *TET2* e *DNMT3A* que obtivesse o menor ciclo *threshold* (Ct) com o maior delta de reporter normalizado (ΔRn), uma curva com as concentrações de 150nM, 300nM, 400nM, 600nM e 800nM foi realizada e a concentração escolhida foi de 300nM. O PCRq foi realizado no 7500 Real Time PCR System (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). As curvas de amplificação e de dissociação dos genes *TET2* e *DNMT3A* estão ilustradas nas Figuras 2 e 3, respectivamente.

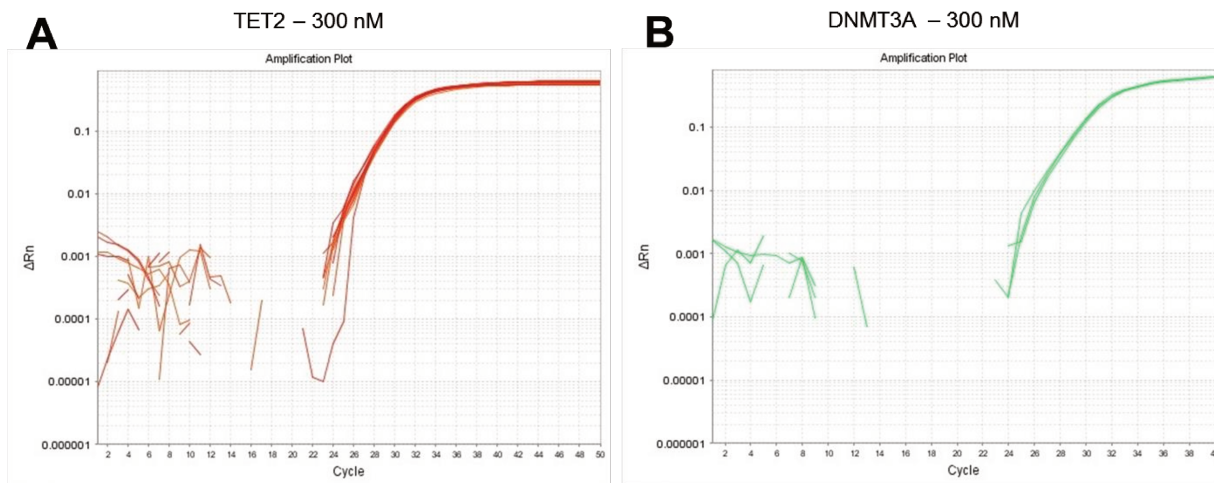


Figura 2. ΔRn e ciclos de amplificação do gene *TET2* e *DNMT3A*. As curvas de amplificação de *TET2* (A) e *DNMT3A* (B) são ilustradas na figura. O eixo y indica o ΔRn (intensidade de fluorescência) e o eixo x indica o número de ciclos.

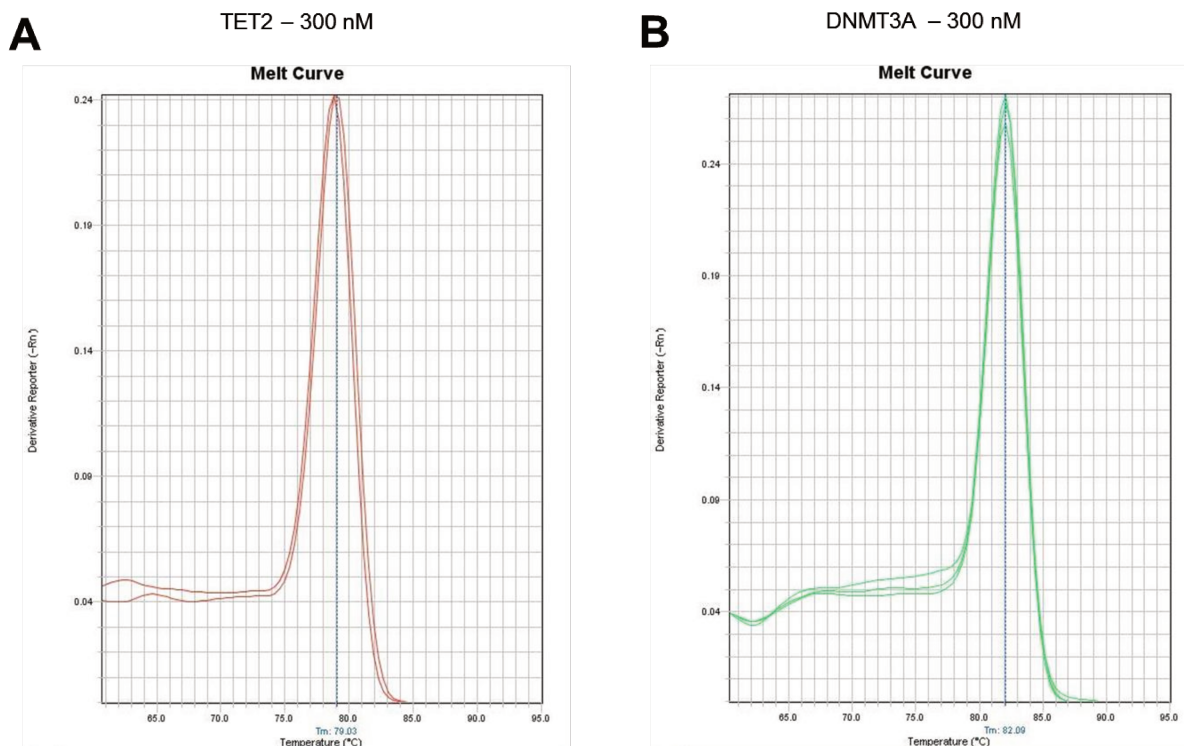


Figura 3. Curva de dissociação de *TET2* e *DNMT3A* baseadas na temperatura de anelamento. As temperaturas resultantes da curva de dissociação para *TET2* (A) e *DNMT3A* (B) estão demonstradas na figura. A presença de apenas um pico na curva demonstra a especificidade dos iniciadores.

Para avaliar a eficiência do iniciador de *DNMT3A*, realizamos uma curva com cinco diluições seriadas na ordem de 1:2 na concentração do cDNA. Cada diluição do experimento foi realizada em duplicata. Utilizamos cDNA da linhagem leucêmica K562 por ter uma alta expressão do gene *DNMT3A* e a concentração inicial de cDNA utilizada foi de 240ng. Consideram-se eficientes os iniciadores com valores toleráveis de 10 % a mais ou a menos dos 100 % e com inclinação em torno de -3,32. Após análise, os iniciadores foram considerados eficientes. A curva de eficiência dos iniciadores de *DNMT3A* é ilustrada na Figura 4. A eficiência do par de iniciadores específico para o *TET2* havia sido previamente comprovada [69].

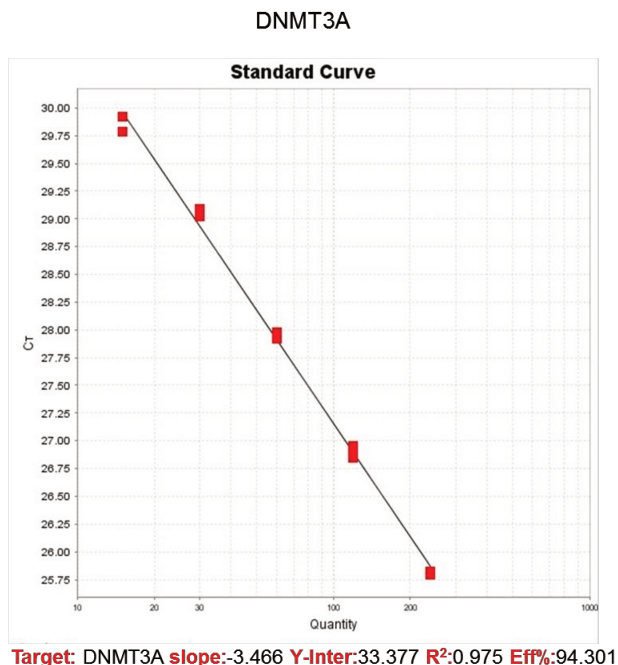


Figura 4. Curvas de eficiência de *DNMT3A*. Os 5 pontos obtidos no teste de eficiência estão ilustrados na figura. O eixo y indica o Ct e o eixo x a concentração do cDNA utilizado. Os iniciadores apresentaram eficiência próxima de 100% e uma inclinação de -3.46.

O gene *HPRT* tem sido utilizado com frequência na análise de expressão gênica por PCRq, inclusive em doenças onco-hematológicas [91, 92]. Além disso, o gene *HPRT* apresentou um Ct de expressão muito próximo aos dos genes alvo e teve a menor variação entre as amostras, sendo escolhido, portanto, para normalização de expressão relativa de *TET2* e *DNMT3A*.

Realizamos o PCRq para determinar a expressão dos genes *TET2* e *DNMT3A* nos pacientes selecionados e em controles normais. Cada amostra foi avaliada com os genes alvo e o controle endógeno. Todas as reações foram realizadas em triplicata, usando a concentração de cDNA de 120 ng/ul. Um controle negativo, sem adição de cDNA, foi realizado para cada par de iniciadores. O protocolo de dissociação foi realizado no final de cada reação para verificar amplificações não específicas. A amostra de um controle normal foi utilizada como amostra calibradora.

Diferenciação eritroide de células CD34⁺ de doadores normais e pacientes com SMD

Para separação de progenitores CD34⁺, as células mononucleares de medula óssea ou de sangue periférico foram isoladas em gradiente de Ficoll-Hypaque (Sigma, St. Louis, MO) e separadas através de colunas de imunoafinidade MIDI-MACS, de acordo com as instruções do fabricante (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Alemanha). Após purificação, as células foram submetidas a ensaios de diferenciação.

Para a diferenciação eritroide, foram coletadas amostras de medula óssea de oito pacientes com SMD (IPSS: risco baixo e intermediário-1), e amostras de medula óssea ou sangue periférico de nove doadores normais. Células CD34⁺ foram semeadas em placas de cultura de plástico contendo meio de metilcelulose com eritropoietina (Epo) (3 IU/mL) (Janssen-Cilag), *Steam Cell Factor* (50 ng/mL) (Peptotec, Colonia Banjidal, México) e Interleucina 3 (30 IU/mL) (Peptotec) e foram incubadas a 37°C em uma atmosfera de 5% de dióxido de carbono durante 6 dias. As células resultantes (unidades formadoras de colônias eritroides e proeritroblastos) foram então cultivadas em alfa-MEM (Gibco BR, Carisbad, CA, EUA), contendo 30% SFB (Sigma, St. Louis, MO, EUA), 10⁻⁵ M 2-mercaptoetanol (Sigma), 2 IU/mL EPO, 300 mg/mL holotransferrina (Sigma), e 1% de albumina de soro bovino (Calbiochem, Darmstadt, Alemanha) por mais oito dias. Após 6, 8 e 12 dias de cultura, as células foram coletadas e submetidas à PCRq. Após 6 e 12 dias de cultura, as células foram também submetidas à imunofenotipagem. Células eritroides foram avaliadas através da análise da expressão de marcadores de superfície celular por dupla marcação com anticorpos anti-receptor de transferrina conjugado com FITC (CD71) e anti-Glicoforina-A conjugado com PE (GPA) (Dako, Ely, Reino Unido), que foram incubados junto com as células por 30 minutos, à 4°C, no escuro. As células foram lavadas com PBS

(*Phosphate buffered saline*) e ressuspendidas em paraformaldeído 1%. Dez mil eventos foram adquiridos com um FACSCalibur (Becton–Dickinson, CA, USA) e analisados através do CellQuest Software (Becton-Dickinson, San Jose, CA, EUA). A marcação não específica foi criada a partir do controle isotópico correspondente e subtraída do percentual de população correspondente positivo.

Diferenciação das linhagens celulares leucêmicas

Células KU812 tiveram a diferenciação eritroide induzida através do tratamento com 50 μ M de hemina (HE) (Sigma; St. Louis, MO, USA) e 100 μ M de hidroxuréia (HU) (Sigma) por 4 dias e a efetividade da diferenciação foi avaliada por ensaio com benzidina e análise da expressão de α -globina, β -globina e γ -globina. Células NB4 foram induzidas à diferenciação granulocítica através do tratamento com 10^{-6} μ M de *all-trans retinoic acid* (ATRA) (Roche; Basel, Switzerland) por 4 dias e a efetividade da diferenciação foi avaliada através de análise morfológica e de expressão de CD11b por imunofenotipagem. Células K562 foram induzidas à diferenciação megacariocítica através do tratamento com 20 nM de phorbol-13 myristate-12 acetate (PMA) (Sigma) por 4 dias e a efetividade da diferenciação foi avaliada através da expressão de CD61 por imunofenotipagem.

Transdução de lentivírus para o silenciamento do *DNMT3A*

Células HL60 e U937 foram transduzidas com lentivírus contendo *short hairpin* RNA controle não específico (sc-108080) ou shRNA alvo DNMT3A (sc-37757) da Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA) e nomeadas como

células shControle e shDNMT3A, respectivamente. Resumidamente, 2×10^5 células foram transduzidas com lentivírus através da técnica de inoculação através da centrifugação, que consiste em centrifugar as células por 30 minutos a 800g na presença de 3 $\mu\text{g/mL}$ de polibrene (Sigma, St. Louis, MO, EUA). O número de partículas virais por célula (multiplicity of infection; MOI) foi igual a 1. Após a transdução, as células foram selecionadas com 1,75 $\mu\text{g/mL}$ de puromicina (Sigma, St. Louis, MO, EUA) por 15 dias antes dos experimentos. Após a seleção por puromicina, a expressão de DNMT3A foi determinada por PCRq e *Western blot*.

Padronização do silenciamento de TET2 através da metodologia de lentivirus

A metodologia proposta para a inibição da expressão de TET2 foi diferente da descrita para a inibição do DNMT3A, pois células transduzidas com lentivírus contendo *short hairpin* RNA alvo TET2 da Santa Cruz Biotechnology (sc-88934 - Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA) não se mostrou eficiente. Dessa forma, uma sequência de oligonucleotídeos específica para inibir TET2 foi escolhida a partir de dados da literatura [69] e o sistema utilizado foi BLOCK-iT HiPerform Lentiviral Pol II miR RNAi Expression System with EMGFP (Cat. No. K4934-00 – Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). O oligonucleotídeo foi diluído a concentração de 200 μM e anelado, utilizando-se o annealing buffer. Após o anelamento o oligo foi diluído na concentração final de 10nM , ligado ao pcDNA 6.2 gw sob ação de T4 DNA ligase e transformado em OneShot TOP10 em placa com antibiótico espectinomicina. O vetor linearizado foi precipitado com etanol/NaAc para remoção de sais. Reação de recombinação foi realizada com pDONOR

através das enzimas ClonaseII e Proteinase K e a amostra recombinada foi transformadas em OneShot TOP10, crescendo em placa com antibiótico kanamicina. Foi realizada nova recombinação com pEntr/CMV e pLenti 6.4/R4R2/V5 através das enzimas ClonaseII Plus e Proteinase K. O clone recombinado foi transformado em OneShot Stlb3 em placa com antibiótico ampicilina e incubado por 72h em Lipofectamina. Esta metodologia ainda está em andamento.

Western Blot

Ao precipitado celular contendo 5×10^6 a 1×10^7 células foi acrescentado tampão de extração de proteínas contendo 100 mM Tris (pH 7.6), 1% Triton X-100, 150 mM NaCl, 0,1 mg Aprotinina, 35 mg PMSF/mL, 10 mM Na_3VO_4 , 100 mM NaF, 10 mM $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$, e 4 mM EDTA. As amostras foram homogeneizadas até que se tornassem bastante fluidas. Após 30 minutos a 4°C , essas amostras passaram por um processo de centrifugação a 4°C durante 20 minutos para remoção dos restos celulares. Ao produto do extrato total proteico, adicionou-se tampão de Laemmli contendo 100 mmol/L de ditioneitol e aqueceu-se em água fervente por 4 minutos. Após isso, as amostras foram submetidas à eletroforese ou armazenadas a -80°C . Para produção de imunoprecitado adicionou-se às alíquotas o anticorpo de interesse e proteína A-Sepharose 6MB. Após o término da incubação e da lavagem, os precipitados foram ressuspensos em tampão de Laemmli contendo 100 mmol/L de ditioneitol e aquecidas em água fervente por 5 minutos. Em seguida, as proteínas imunoprecipitadas foram submetidas à eletroforese em gel de poliácridamida 8%-SDS-PAGE em aparelho de eletroforese (Mini-Protean, Bio-Rad Laboratories, Richmond, Ca). A eletrotransferência das proteínas do gel para a membrana foi realizada em 90

minutos a 120 V (constante) em aparelho miniaturizado de transferência da Bio-Rad. A ligação dos anticorpos a proteínas não específicas foi reduzida por pré-incubação da membrana por 1 hora com tampão de bloqueio (5% leite em pó magro, 10 mmol/L Tris, 150 mmol/L NaCl, e 0.02% Tween 20) a 4°C. A membrana de nitrocelulose foi então incubada com anticorpos específicos diluídos em tampão de bloqueio (0.3% de leite em pó magro) por 12 horas a 4°C e então lavadas 3 vezes com solução basal (10 mmol/L Tris, 150 mmol/L NaCl, and 0.02% Tween 20). Os anticorpos primários que reconhecem P70S6K (sc-8418), actina (sc-1616), p-P70S6K (sc-7984) foram obtidos da Santa Cruz Biotechnology. Os anticorpos que reconhecem o p-PTEN (S380), o PTEN (D4-3XP) e DNMT3A (2160S) foram obtidos da Cell Signalling. O sistema de revelação usado foi baseado em quimioluminescência, e realizado de acordo com orientações do fabricante, ECLTM *Western Blot Analysis System* (Amersham Pharmacia Biotech, UK). Em suma, as membranas foram incubadas por 1 hora com o anticorpo secundário, conjugado à HRP (Horseradish peroxidase), lavadas novamente, e então submetidas ao substrato da enzima, resultando em um produto luminescente, detectado por autoradiografias em filmes Kodak XAR (Eastman Kodak, Rochester, NY). Análises quantitativas da intensidade das bandas de proteínas foram determinadas utilizando-se o *Scion Image software* (ScionCorp, Frederick, MD, USA). A intensidade de expressão proteica foi normalizada pela expressão da actina e a intensidade da fosforilação proteica foi normalizada pela expressão da proteína correspondente.

Ensaio de Methylthiazoletetrazolium (MTT)

O crescimento celular foi mensurado pelo ensaio de Methylthiazoletetrazolium (MTT; Sigma, St. Louis, MO, EUA). Células shControle e shDNMT3A foram submetidas à privação de soro fetal bovino (SFB) à 0.5% por 12 horas. Um total de 5×10^4 células por poço foram plaqueadas em uma placa de 96 poços em meio RPMI 10% SFB.. Em resumo, 10 μ L de uma solução à 5mg/mL de MTT foram adicionadas nos poços e incubadas a 37°C por 4 horas. A reação foi parada pela adição de 100 μ L de 0,1N HCl em isopropanol. O crescimento celular foi avaliado pela mensuração da absorbância a 570 nm, utilizando um leitor automático de placas. Todas as condições foram testadas em seis replicatas para três experimentos independentes.

Ensaio de formação de colônia

A formação de colônias foi realizada em meio semissólido de metilcelulose (0,5X10³ células/mL; MethoCult 4230; StemCell Technologies Inc., Vancouver, BC, Canada). As colônias foram detectadas após 8 dias de cultura pela adição de 1 mg/mL de reagente MTT e as contagens foram realizadas com o auxílio do *Image J quantification software* (U.S. National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA). Células shControle e shDNMT3A foram submetidas ao ensaio de formação de colônias. Todas as condições foram testadas em duplicatas para três experimentos independentes.

Análise do ciclo celular

As células foram fixadas em etanol 70%, por pelo menos 2 horas a 4°C antes das análises e incubadas com 20 µg/mL de iodeto de propídio (propidium iodide; PI) contendo 10 µg/mL de RNase A por 30 minutos a temperatura ambiente. As análises da fluorescência celular foram realizadas com um FACSCalibur (Becton–Dickinson, CA, USA). Os resultados das distribuições do DNA foram analisados pelo Modifit (Verify Software House Inc., Topsham, ME, USA) para se determinar as proporções de células nas fases do ciclo celular.

Avaliação de apoptose por marcação com anexina-V e PI

Células shControle e shDNMT3A foram semeadas em placas de 12 poços. As células foram então lavadas duas vezes com PBS gelado e ressuspensas em tampão de ligação contendo 1µg/mL de PI e 1µg/mL de FITC anexina-V (Becton–Dickinson, CA, USA). Após incubação no escuro durante 15 minutos a temperatura ambiente, todas as amostras foram analisadas em um FACSCalibur. Dez mil eventos foram adquiridos para cada amostra.

Análises Estatísticas

A comparação dos valores da quantidade relativa de expressão do RNAm de *DNMTA* e *TET2* entre os pacientes e doadores normais foi realizada através do teste estatístico de *Mann-Whitney*.

Para as análises do impacto da expressão de *TET2* e *DNMT3A* no fenótipo clínico e sobrevida dos pacientes com SMD, análises estatísticas foram realizadas utilizando-se o

GraphPad Instat 5 (GraphPad Software, Inc., San. Diego, CA, USA) ou SAS System for windows 9.2 (SAS Institute, Inc., Cary, NC, USA). Os pacientes foram divididos em dois grupos baseados na expressão de *TET2* e em dois grupos baseados na expressão de *DNMT3A*: baixa expressão (tercil inferior) e alta expressão (dois tercís superiores). Para comparações, teste exato de *Fisher's* foi utilizado para avaliação das variáveis categóricas, teste de *Mann-Whitney* foi utilizado para variáveis contínuas. *Log-rank (Mantel-Cox)* foi utilizada para estimar a sobrevida livre de evento e a sobrevida global. Sobrevida livre de evento foi definida como intervalo entre a data da coleta e data da morte (por qualquer causa) ou progressão da doença (para SMD alto risco ou LMA secundária a mielodisplasia), ou data da última avaliação. Sobrevida global foi definida como intervalo entre a data da coleta e a data do óbito (por qualquer causa) ou data da última avaliação. Valor de $p < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo.

Nos estudos comparando células U937 e HL60 submetidas ou não a inibição de DNMT3A, as comparações entre dois grupos ou condições foram realizadas através dos testes estatísticos de *Mann-Whitney* ou *t Student*.

Expressão de *TET2* e *DNMT3A* em linhagens leucêmicas

Para avaliar a expressão gênica de *DNMT3A* e *TET2* foram utilizadas 10 linhagens celulares leucêmicas mieloides (K562, KU812, Nalm-30, NB4, HL60, P39, HEL, U937, KG1, THP1) e 6 linhagens celulares leucêmicas linfoides (Jurkat, MOLT4, Daudi, Raji, Namalwa e Karpas 422). O estudo através de PCRq em tempo real revelou que *TET2* e *DNMT3A* são expressos de maneira variada em todas as linhagens leucêmicas estudadas, incluindo linhagens linfoides e mieloides (Figura 5).

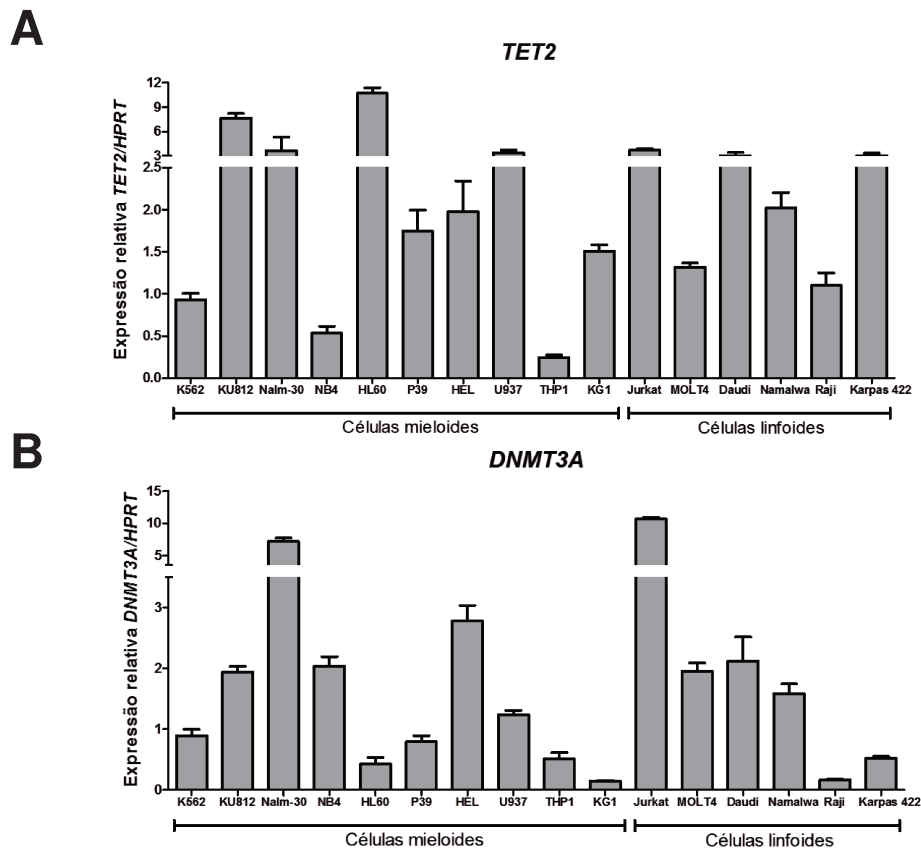


Figura 5. Expressão gênica de *DNMT3A* e *TET2* em linhagens celulares leucêmicas. PCRq foi realizado a partir de cDNA de linhagens celulares leucêmicas. O eixo y representa a intensidade relativa de expressão do RNAm de *TET2* (A) e *DNMT3A* (B). A amostra de K562 foi utilizada como amostra calibradora.

Análise da expressão gênica de *TET2* em amostras de medula óssea de controles e de pacientes com SMD ou LMA

O RNAm de *TET2* apresentou-se menos expresso em amostras de medula óssea de pacientes com diagnóstico de SMD (1.02 [0.03-21.30]) e LMA (0.52 [0.01-32.69]), quando comparadas às amostras de células hematopoéticas normais (2.72 [0.43-31.49]) ($p<.001$), e em LMA comparadas a SMD ($p=.02$) (Figura 6A). Entre os pacientes com diagnóstico de SMD, foi observada redução significativa na expressão de *TET2* em pacientes SMD alto risco quando comparados aos SMD baixo risco de acordo com a classificação da OMS 2008 (0.55 [0.06–7.25] vs. 1.31 [0.03–21.30], respectivamente, $p=.02$) (Figura 6B). Os resultados são apresentados como mediana [mínimo-máximo].

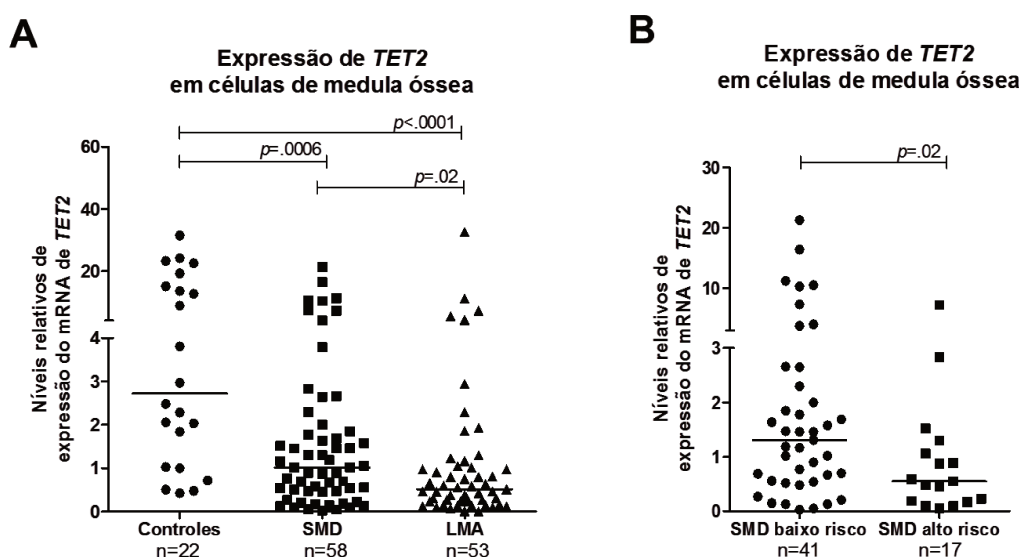


Figura 6. Expressão do RNAm de *TET2* em células hematopoéticas de controles normais e de pacientes com Síndrome Mielodisplásica (SMD) e Leucemia Mieloide Aguda (LMA). PCRq foi realizado a partir de cDNA de células totais de medula óssea de pacientes com diagnóstico de SMD (n=58), LMA (n=53) ou de doadores normais (n=22). O eixo y representa a intensidade relativa de expressão do RNAm de *TET2*. Uma amostra de doador normal foi utilizada como calibradora. As linhas horizontais representam a mediana. Note que a expressão do RNAm de *TET2* foi significativamente menor em pacientes com SMD e LMA, quando comparadas à expressão em células hematopoéticas normais (A) e em pacientes SMD alto risco quando comparados com SMD baixo risco (B); *Mann-Whitney*.

Análise da expressão gênica de *TET2* em amostras sequenciais de pacientes com SMD ao diagnóstico e na progressão da doença

Uma vez que *TET2* apresentou-se menos expresso em amostras de medula óssea de pacientes com diagnóstico de SMD alto risco quando comparados aos SMD baixo risco, consideramos pertinente avaliar a expressão de *TET2* em cinco casos de pacientes com SMD baixo risco em seguimento no ambulatório do Hemocentro da Unicamp que evoluíram para SMD de alto risco ou LMA com alterações displásicas relacionadas à SMD. As características dos pacientes são descritas na Tabela 4. Dos cinco pacientes avaliados, quatro apresentaram redução da expressão de *TET2* após evolução da doença, com média de redução de 38% (Figura 7).

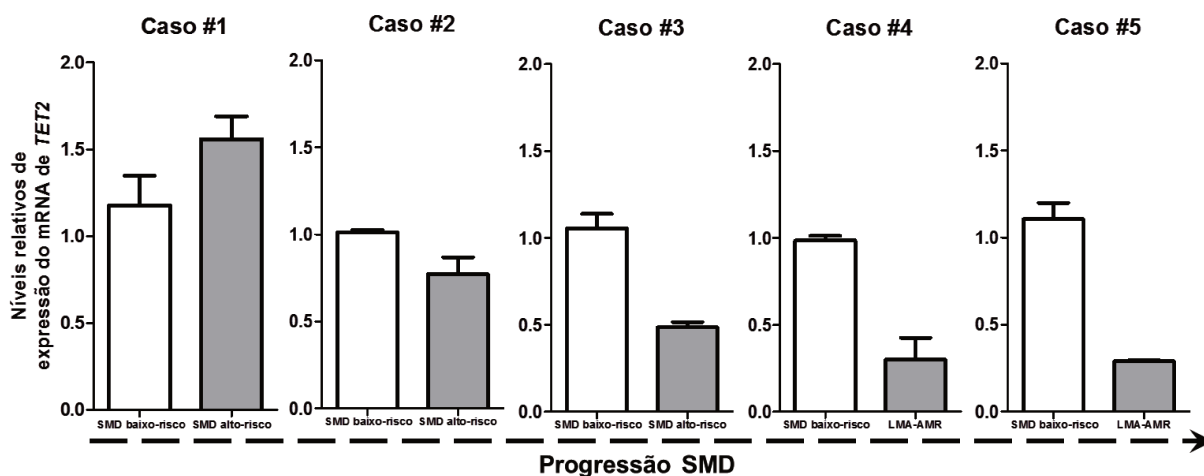


Figura 7. Expressão do RNAm de *TET2* em células hematopoéticas de pacientes com Síndrome Mielodisplásica (SMD) ao diagnóstico e na progressão da doença. PCRq foi realizado a partir de cDNA de células totais de medula óssea de pacientes no momento do diagnóstico de SMD e na progressão da doença. Note que a expressão do RNAm de *TET2* foi significativamente menor em quatro dos cinco pacientes com SMD baixo risco que evoluíram para SMD alto risco ou LMA com alterações displásicas relacionadas à SMD (AML-ARM).

Tabela 4. Características clínicas dos pacientes com Síndrome Mielodisplásica ao diagnóstico e no momento da progressão da doença (utilizado na Figura 7).

Caso	Classificação OMS	% Blastos MO	Citogenética	Número de citopenias
Caso #1	CRDM	4	46,XY	2
	AREB-1	7	46,XY	2
Caso #2	ARSA	0	47,XX, +8	2
	AREB-2	12	47,XX, +8	2
Caso #3	CRDM	0	46,XY	1
	AREB-2	10	46,XY	3
Caso #4	SMD com del(5q)	0	46,XX,del(5)(q13)	2
	LMA-ARM	38	46,XX,del(5)(q13)	3
Caso #5	ARSA	0	46,XX	1
	LMA-ARM	69	46,XX	2

Abreviações: OMS, Organização Mundial da Saúde; ARSA, anemia refratária com sideroblastos em anel; SMD com del(5q), síndrome mielodisplásica com deleção do 5q; CRDM, citopenia refratária com displasia de multilinhagens; AREB-1, anemia refratária com excesso de blastos-1; AREB-2, anemia refratária com excesso de blastos-2; LMA-ARM, leucemia mieloide aguda com alterações displásicas relacionadas à SMD; MO, medula óssea.

Impacto da expressão de *TET2* no fenótipo clínico e sobrevida dos pacientes com SMD

Diante dos resultados da modulação da expressão de *TET2* em SMD de baixo e alto risco, e da redução da expressão de *TET2* no momento da progressão da doença observada em amostras sequenciais de pacientes com SMD, os pacientes com SMD foram categorizados em dois grupos baseados na expressão de *TET2*: baixa expressão de *TET2* [tercil inferior, 0.48, 0.03-0.77] e alta expressão de *TET2* [dois tercís superiores, 1.69, 0.88-21.30] (Tabela 5). Testes estatísticos apropriados foram realizados na tentativa de definir o impacto da expressão de *TET2* no fenótipo clínico dos pacientes. Foram verificadas associações significativas entre a baixa expressão de *TET2* e a baixa contagem de hemoglobina (8.4 [6.3-14] vs. 9.8 [3-15] $p=0.01$). Não houve diferença clínica entre os pacientes com baixa e alta expressão de *TET2* em relação à idade, porcentagem de blastos

na medula óssea, estratificação de risco pela OMS 2008, IPSS e risco citogenético, número de citopenias e contagem de neutrófilos e plaquetas no sangue periférico (Tabela 5).

Na coorte de pacientes com SMD, a análise univariada revelou que a baixa expressão de *TET2* teve impacto negativo na sobrevida livre de evento (HR: 6.51 (2.42-17.49), $p=.0002$) e na sobrevida global (HR: 7.25 (2.77-18.99), $p<.0001$), assim como a estratificação de risco pela classificação OMS 2008 (alto *versus* baixo, $p\leq.0001$), IPSS (int-2/alto *versus* int-1/baixo, $p\leq.0001$), hemoglobina (<10 *versus* ≥ 10 , $p\leq.05$), contagem de leucócitos (< 3 *versus* $\geq 3 \times 10^9/L$, $p\leq.05$), contagem absoluta de neutrófilos (< 1.5 *versus* ≥ 1.5 , $p\leq.05$) e porcentagem de blastos na medula (≥ 5 *versus* <5 or ≥ 10 *versus* <10 , $p\leq.0004$). A análise multivariada evidenciou que a baixa expressão de *TET2* ($p\leq.0001$), IPSS intermediário-2/alto ($p\leq.0001$) e hemoglobina ≤ 10 g/dL ($p\leq.03$) foram fatores prognósticos independentes de sobrevida livre de evento e sobrevida global (Tabela 6).

Tabela 5. Características clínicas e laboratoriais dos pacientes com Síndrome Mielodisplásica categorizados de acordo com a expressão de *TET2*

Fatores	Baixa expressão <i>TET2</i> ¹ n=19	Alta expressão <i>TET2</i> ¹ n=39	<i>p</i> ²
Gênero, n (%)			
Masculino	12 (63)	22 (53)	
Feminino	7 (37)	17 (44)	.78
Idade, mediana (intervalo)	71 (28-87)	68 (16-85)	.18
Blastos MO, mediana % (intervalo)	4 (0-15)	2 (0-17)	.33
Idade na coleta			
< 60	3 (16)	13 (33)	
≥ 60	16 (84)	26 (67)	.22
Estratificação de risco OMS, n (%)			
Baixo risco	11 (58)	30 (77)	.21
Alto risco	8 (42)	9 (23)	
Estratificação de risco IPSS³, n (%)			
Baixo risco	14 (82)	33 (85)	1.0
Alto risco	3 (18)	6 (15)	
Risco Citogenético³, n (%)			
Baixo risco	13 (68)	35 (90)	
Alto risco	4 (21)	4 (10)	.23
Contagem SP, mediana (intervalo)			
Hemoglobina, g/dL	8.4 (6.3-14)	9.8 (3-15)	.01
Leucócitos, x10 ⁹ /L	2.8 (1.2-10.6)	3.4 (0.9-11.7)	.17
Neutrófilos, x10 ⁹ /L	1.2 (0.2-4.6)	1.7 (0.2-8.3)	.26
Plaquetas, x10 ⁹ /L	80 (7-544)	124 (7-589)	.31
Número de Citopenias			
0,1	6 (32)	20 (51)	
>1	13 (68)	19 (49)	.17
Blastos na medula óssea, %			
<5	11 (58)	29 (74)	
≥ 5	8 (42)	10 (26)	.24 ⁴
<10	14 (82)	35 (90)	
≥ 10	5 (18)	4 (10)	.14 ⁵

¹ Pacientes SMD foram categorizados em dois grupos de acordo com a expressão de *TET2*; baixa expressão de *TET2* (tercil inferior) e alta expressão de *TET2* (dois tercis superiores).

² Teste exato de *Fisher* e teste de *Mann-Whitney* foram utilizados para variáveis categóricas e numéricas, respectivamente.

³ Metáfases ausentes em dois pacientes.

⁴ Comparação de pacientes com % blastos na medula óssea <5 vs. ≥ 5.

⁵ Comparação de pacientes com % blastos na medula óssea <10 vs. ≥ 10.

Tabela 6. Análise de sobrevida de pacientes com Síndrome Mielodisplásica

	Análise Univariada						Análise Multivariada					
	Sobrevida Livre de Evento			Sobrevida Global			Sobrevida Livre de Evento			Sobrevida Global		
Fator	HR¹	(95% C.I.)	<i>p</i>	HR	(95% C.I.)	<i>p</i>	HR	(95% C.I.)	<i>p</i>	HR	(95% C.I.)	<i>p</i>
Gênero												
Masculino vs feminino	2.15	0.83-5.50	.11	2.08	0.81-5.34	.12	-	-	-	-	-	-
Idade na coleta												
≥ 60 vs. <60	1.21	0.47-3.13	.16	1.31	0.52-3.39	.56	-	-	-	-	-	-
Estratificação de risco WHO												
Alto risco vs. baixo risco	8.47	3.07-23.40	<.0001	7.89	2.91-21.41	<.0001	-	-	-	-	-	-
Grupo de risco IPSS²												
Alto/Int-2 vs. Int-1/Baixo	11.08	4.10-29.92	<.0001	10.53	3.70-29.95	<.0001	29.90	8.06-110.92	<.0001	66.80	13.27-336.20	<.0001
Risco Citogenético²												
Intermediário/Ruim vs. Baixo	2.66	0.96-7.35	.06	2.58	0.93-7.13	.06	-	-	-	-	-	-
Hemoglobina, g/dL												
<10 vs. ≥ 10	2.95	1.10-7.95	.03	3.23	1.21-8.64	.01	4.47	1.08-8.91	.03	4.87	1.70-13.92	0.003
Leucócitos, x10⁹/L												
< 3 vs. ≥ 3	2.73	1.16-6.41	.02	2.98	1.27-6.98	.01	-	-	-	-	-	-
Neutrófilos, x10⁹/L												
< 1.5 vs. ≥ 1.5	2.87	1.12-7.37	.02	2.81	1.10-7.22	.03	-	-	-	-	-	-
Plaquetas, x10⁹/L												
< 100 vs. ≥ 100	1.83	0.78-4.29	.15	1.69	0.72-3.95	.22	-	-	-	-	-	-
Número de citopenias												
3/2 vs. 1/0	1.97	0.82-4.76	.12	1.93	0.80-4.65	.13	-	-	-	-	-	-
Blastos na MO, %												
≥ 5 vs. <5	4.98	2.08-11.92	.0003	4.86	2.03-11.65	.0004	-	-	-	-	-	-
≥ 10 vs. <10	9.05	3.43-23.90	<.0001	10.69	3.81-29.92	<.0001	-	-	-	-	-	-
Expressão de TET2												
Baixa expressão vs. Alta expressão	6.51	2.42-17.49	.0002	7.25	2.77-18.99	<.0001	12.13	3.46-42.43	<.0001	25.91	6.21-108.02	<.0001

¹ HR: Hazard Ratio. Hazard ratios >1 indicam que o primeiro fator confere pior prognóstico.

² Metáfases ausentes em dois pacientes.

Análise da expressão gênica de *DNMT3A* em amostras de medula óssea de controles normais e de pacientes com SMD ou LMA

A expressão de *DNMT3A* foi semelhante entre amostras de medula óssea de pacientes com diagnóstico de SMD e LMA, quando comparadas às amostras de células hematopoéticas normais (0.59 [0.01-3.46], 0.87 [0.0-6.46] vs. 0.74 [0.22-1.53], respectivamente). A expressão de *DNMT3A* foi significativamente elevada nos pacientes com LMA quando comparados aos pacientes com SMD ($p=.03$) (Figura 8A). Entre os pacientes com diagnóstico de SMD, também não foi observada diferença na expressão de *DNMT3A* em pacientes SMD baixo risco quando comparados aos SMD alto risco de acordo com a classificação OMS 2008 (0.56 [0.01–2.76] vs. 0.66 [0.01–3.46]) (Figura 8B). Os resultados são apresentados como mediana [mínimo-máximo].

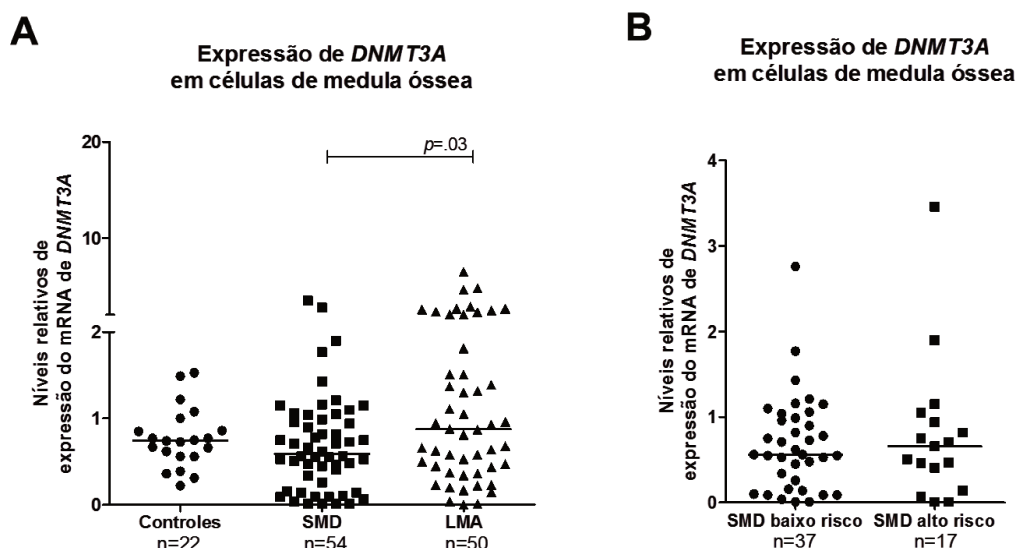


Figura 8. Expressão do RNAm de *DNMT3A* em células hematopoéticas de controles normais e de pacientes com Síndrome Mielodisplásica (SMD) e Leucemia Mieloide Aguda (LMA). PCRq foi realizado a partir de cDNA de células totais de medula óssea de pacientes com diagnóstico de SMD (n=54), LMA (n=50) ou de controles normais (n=22). O eixo y representa a intensidade relativa de expressão do RNAm de *DNMT3A*. Uma amostra de doador normal foi utilizada como amostra calibradora. As linhas horizontais representam a mediana. Note que a expressão do RNAm de *DNMT3A* foi semelhante entre pacientes com SMD e LMA quando comparados com células hematopoéticas normais (A) e em pacientes SMD baixo risco quando comparados a SMD alto risco (B).

Impacto da expressão de *DNMT3A* no fenótipo clínico e sobrevida dos pacientes com SMD

Os pacientes com SMD foram categorizados em dois grupos baseados na expressão de *DNMT3A*: baixa expressão de *DNMT3A* (tercil inferior, 0.10, 0.001-0.46) e alta expressão de *DNMT3A* (dois tercís superiores, 0.82, 0.47-3.46) (Tabela 7). Na coorte de pacientes com SMD, a expressão de *DNMT3A* não teve impacto significativo no fenótipo clínico (Tabela 7), e a baixa expressão de *DNMT3A* não teve impacto significativo na sobrevida livre de evento e na sobrevida global (HR: 0.71 [0.23-2.19], $p=.55$; HR: 0.97 [0.31-3.02], $p=0.9$, respectivamente).

Tabela 7. Características clínicas e laboratoriais dos pacientes com Síndrome Mielodisplásica categorizados de acordo com a expressão de *DNMT3A*

Fatores	Baixa expressão <i>DNMT3A</i> ¹ n=18	Alta expressão <i>DNMT3A</i> ¹ n=36	<i>p</i> ²
Gênero, n (%)			
Masculino	9 (50)	21 (58)	
Feminino	9 (50)	15 (42)	.58
Idade, mediana (intervalo)	69 (53-87)	69 (28-85)	.53
Blastos MO, mediana % (intervalo)	1.8 (0-16)	3 (0-17)	.40
Idade na coleta			
< 60	2 (11)	12 (33)	
≥ 60	16 (89)	24 (67)	.10
Estratificação de risco OMS, n (%)			
Baixo risco	12 (67)	24 (67)	
Alto risco	6 (33)	12 (33)	1.0
Estratificação de risco IPSS³, n (%)			
Baixo risco	13 (81)	30 (83)	
Alto risco	3 (18)	6 (17)	1.0
Risco Citogenético³, n (%)			
Baixo risco	13 (81)	31 (86)	
Alto risco	3 (19)	5 (14)	0.69
Contagem SP, mediana (intervalo)			
Hemoglobina, g/dL	8.42 (3-13.5)	9.9 (6.2-13.3)	.08
Leucócitos, x10 ⁹ /L	3.2 (1.2-10.6)	3.3. (8.5-11.7)	.97
Neutrófilos, x10 ⁹ /L	1.8 (0.6-8.2)	1.1 (0.2-6.9)	.22
Plaquetas, x10 ⁹ /L	164 (10-589)	111 (6.7-487)	.31
Número de Citopenias			
0,1	8 (44)	16 (44)	
>1	10 (56)	20 (56)	1.0
Blastos na medula óssea, %			
<5	12 (67)	24 (67)	
≥ 5	6 (33)	12 (33)	1.0
<10	14 (78)	31 (86)	
≥ 10	4 (22)	5 (14)	0.46

¹ Pacientes SMD foram categorizados em dois grupos de acordo com a expressão de *DNMT3A*; baixa expressão de *DNMT3A* (tercil inferior) e alta expressão de *DNMT3A* (dois tercís superiores).

² Teste exato de Fisher e teste de Mann-Whitney foram utilizados para variáveis categóricas e numéricas, respectivamente.

³ Metáfases ausentes em dois pacientes.

⁴ Comparação de pacientes com % blastos na medula óssea <5 vs. ≥ 5.

⁵ Comparação de pacientes com % blastos na medula óssea <10 vs. ≥ 10.

Análise da expressão de *TET2* e *DNMT3A* durante a diferenciação eritroide de células $CD34^+$ derivadas de medula óssea de doadores normais e pacientes com SMD

Células $CD34^+$ de medula óssea de doadores normais (n=9) e de pacientes com SMD de baixo risco de acordo com a classificação IPSS (n=8) foram submetidas à diferenciação eritroide, que foi determinada por citometria de fluxo. A diferenciação eritroide foi semelhante em células de doadores normais e de pacientes com SMD como evidenciado pela expressão dos marcadores Glicoforina A (GPA) e transferrina (CD71) (Figura 9).

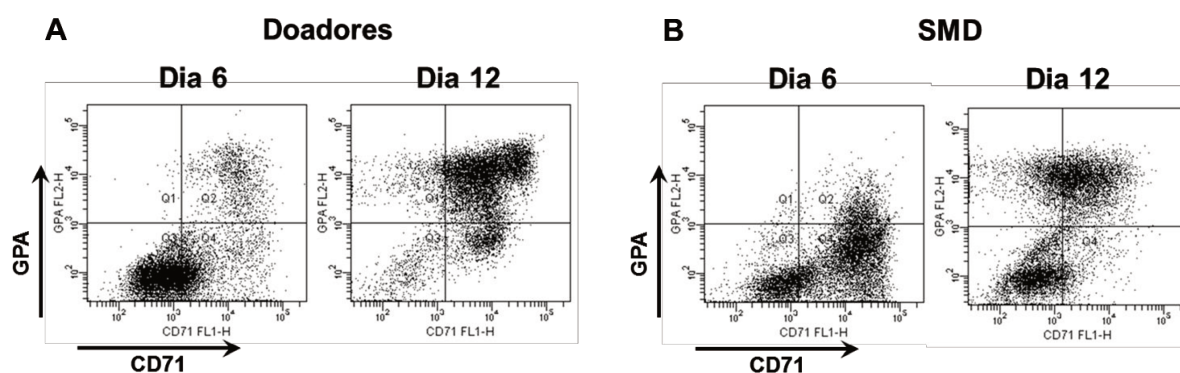


Figura 9. Diferenciação eritroide de células $CD34^+$ de medula óssea de doadores normais e de pacientes com Síndrome Mielodisplásica (SMD). Dot plot representativos de um doador normal (A) e um paciente com SMD (B) nos dias 6 e 12 de diferenciação eritroide. O aumento na expressão de ambos os marcadores de superfície celular Glicoforina A (GPA) e Transferrina (CD71), característicos de eritrócitos maduros, comprova a diferenciação das células no dia 12.

A expressão de *TET2* foi avaliada nos dias 6, 8 e 12 da diferenciação eritroide. Interessantemente, no dia 12 de cultura houve um aumento significativo na expressão de *TET2* tanto nas células de doadores normais como nas células de pacientes com SMD (Figura 10).

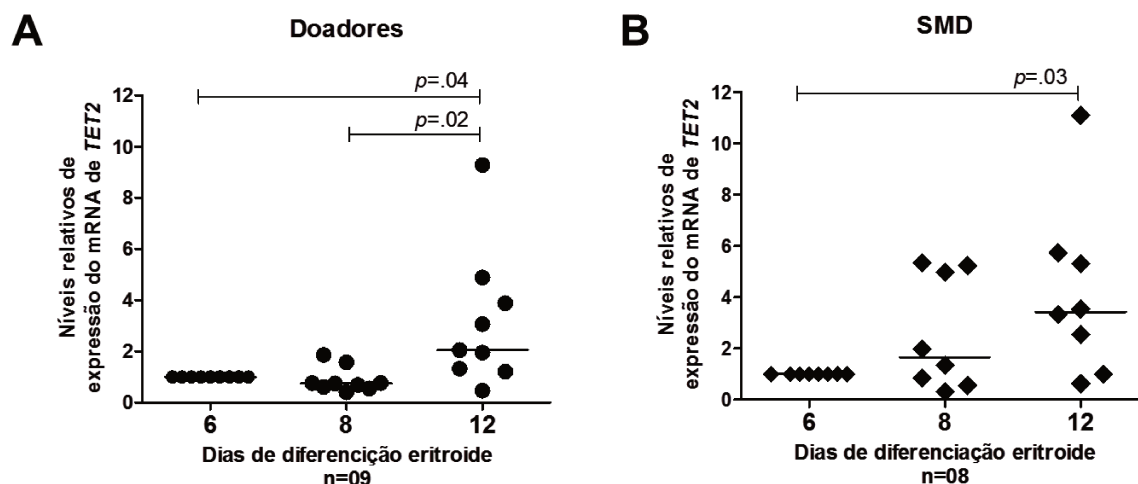


Figura 10. Diferenciação eritroide de células $CD34^+$ de medula óssea de doadores normais e de pacientes com Síndrome Mielodisplásica (SMD). Análise por PCRq da expressão de *TET2* em células $CD34^+$ de doadores normais (A) e pacientes com SMD (B) nos dias 6, 8 e 12 da diferenciação eritroide. A expressão de *TET2* aumentou significativamente no dia 12 de diferenciação. As linhas horizontais indicam os valores medianos. Os valores de p são indicados na figura.

Não foi observada alteração significativa na expressão de *DNMT3A* durante a diferenciação eritroide de células $CD34^+$ de doadores normais e de pacientes com SMD (Figura 11).

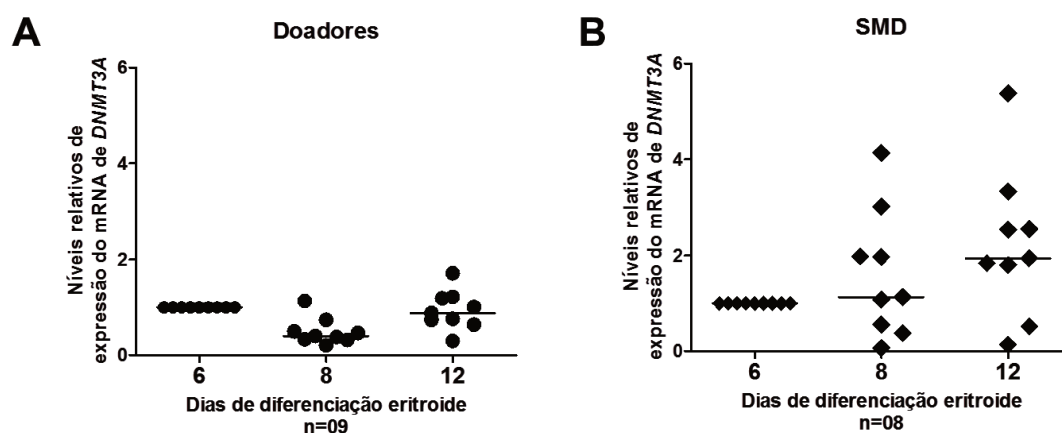


Figura 11. Diferenciação eritroide de células $CD34^+$ de medula óssea de doadores normais e de pacientes com Síndrome Mielodisplásica (SMD). Análise por PCRq da expressão de *DNMT3A* em células $CD34^+$ de doadores normais (A) e pacientes com SMD (B) nos dias 6, 8 e 12 da diferenciação eritroide. A expressão de *DNMT3A* não se alterou durante os estágios de diferenciação. As linhas horizontais indicam os valores medianos.

Análise da expressão gênica de *TET2* e *DNMT3A* durante a diferenciação celular em modelos de linhagem leucêmica

A expressão gênica de *TET2* e *DNMT3A* foi avaliada durante a diferenciação eritrocítica, granulocítica e megacariocítica em modelos de linhagem leucêmica.

A expressão de *TET2* aumentou significativamente durante a diferenciação megacariocítica e granulocítica, mas o aumento não foi significativo na diferenciação eritrocítica (Figuras 12 – 14). A expressão de *DNMT3A* aumentou significativamente apenas na diferenciação granulocítica, o aumento não foi significativo na diferenciação megacariocítica e a expressão não se alterou na diferenciação eritrocítica (Figuras 12 – 14).

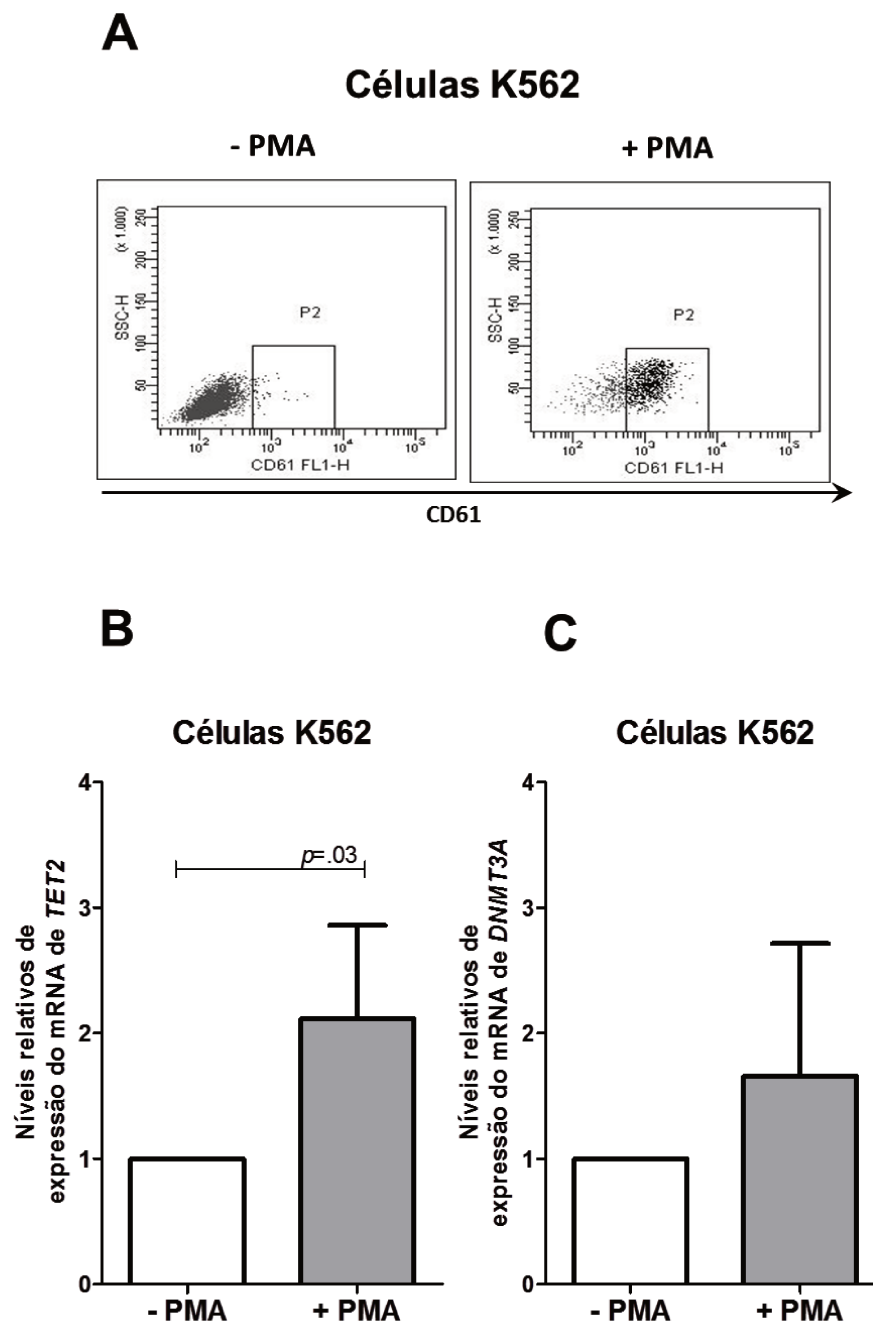


Figura 12. Expressão de *TET2* e *DNMT3A* durante a diferenciação megacariocítica de células K562 tratadas ou não com indutor de diferenciação PMA. *Dot Plots* das células K562 tratadas ou não com PMA, comprovando a diferenciação megacariocítica através do aumento da expressão de CD61 (A). Análise por PCRq da expressão de *TET2* (B) e *DNMT3A* (C) em células K562 tratadas ou não com PMA. A expressão de *TET2* aumentou significativamente nas células tratadas, enquanto a de *DNMT3A* apresenta um aumento não significativo durante a diferenciação megacariocítica. Os valores de *p* são indicados na figura.

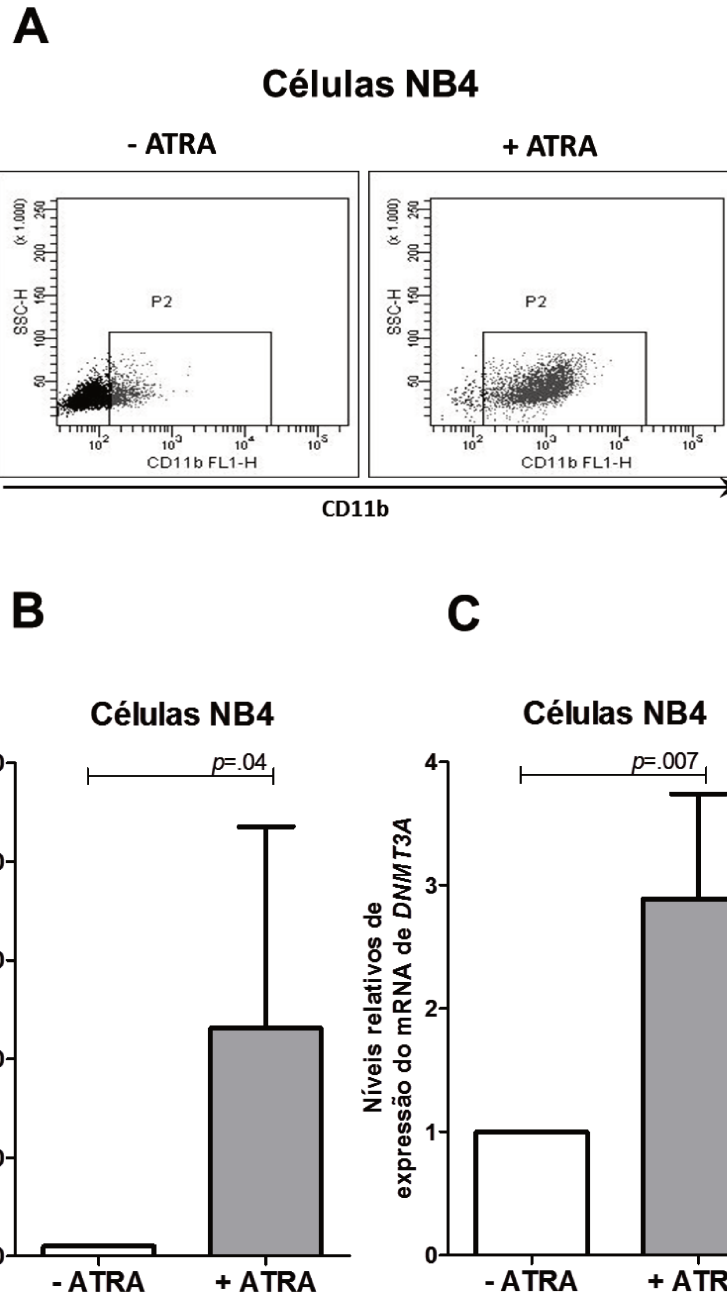


Figura 13. Expressão de *TET2* e *DNMT3A* durante a diferenciação granulocítica de células NB4 tratadas ou não com indutor de diferenciação ATRA. Dot Plots das células NB4 tratadas ou não com ATRA, comprovando a diferenciação granulocítica através do aumento da expressão de CD11b (A). Análise por PCRq da expressão de *TET2* (B) e *DNMT3A* (C) em células NB4 tratadas ou não com ATRA. A expressão de *TET2* e *DNMT3A* aumentou significativamente nas células induzidas à diferenciação granulocítica. Os valores de p são indicados na figura.

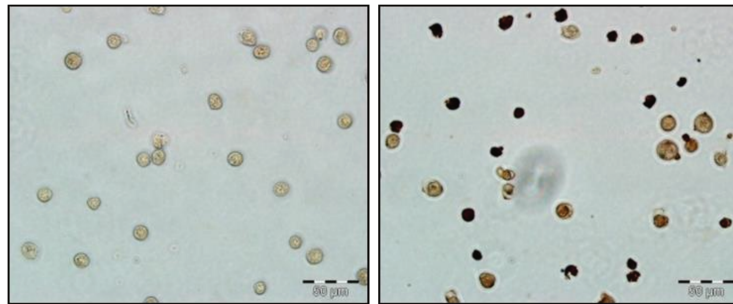
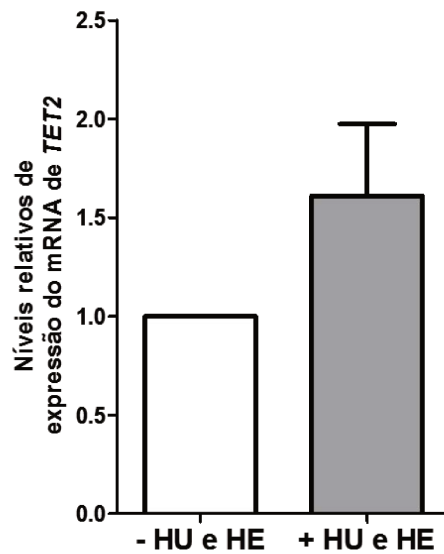
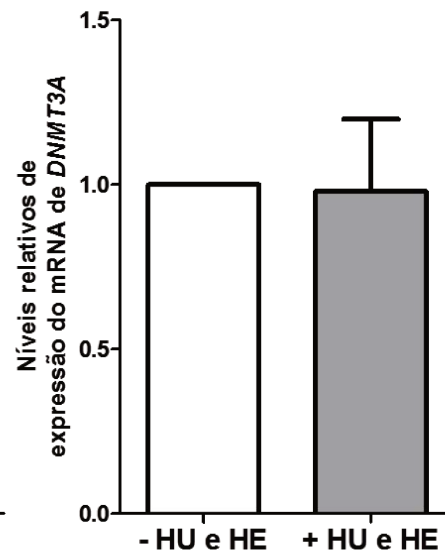
A**Células KU812****- HE e HU****+ HE e HU****B****Células KU812****C****Células KU812**

Figura 14. Expressão de *TET2* e *DNMT3A* durante a diferenciação eritroide de células KU812 tratadas ou não com indutores de diferenciação HE e HU. Análise morfológica através de microscopia óptica das células KU812 tratadas ou não com HE e HU, comprovando a diferenciação eritroide através da verificação de modificações no formato celular e presença de hemoglobina nas células após tratamento (A). Análise por PCRq da expressão de *TET2* (B) e *DNMT3A* (C) em células KU812 tratadas ou não com HE e HU. A expressão de *TET2* apresentou um aumento não significativo e a expressão de *DNMT3A* não se alterou nas células induzidas a diferenciação eritroide.

Padronização do silenciamento do TET2 em células HL60 e U937 por shRNA mediado por lentivírus

Inicialmente, um dos objetivos deste trabalho foi padronizar o silenciamento de TET2 para realização de estudos funcionais em modelos de linhagem leucêmica. Para tanto, células HL60 e U937 foram transduzidas com shRNA mediado por lentivírus específico para TET2 (shTET2; sc-88934) ou controle adequado (shControl; sc-108080) da Santa Cruz Biotechnology. Após a seleção por puromicina, a expressão de *TET2* foi determinada por PCRq. Não houve redução significativa na expressão gênica de *TET2* nas células shTET2 quando comparados com shControle (Figura 15).

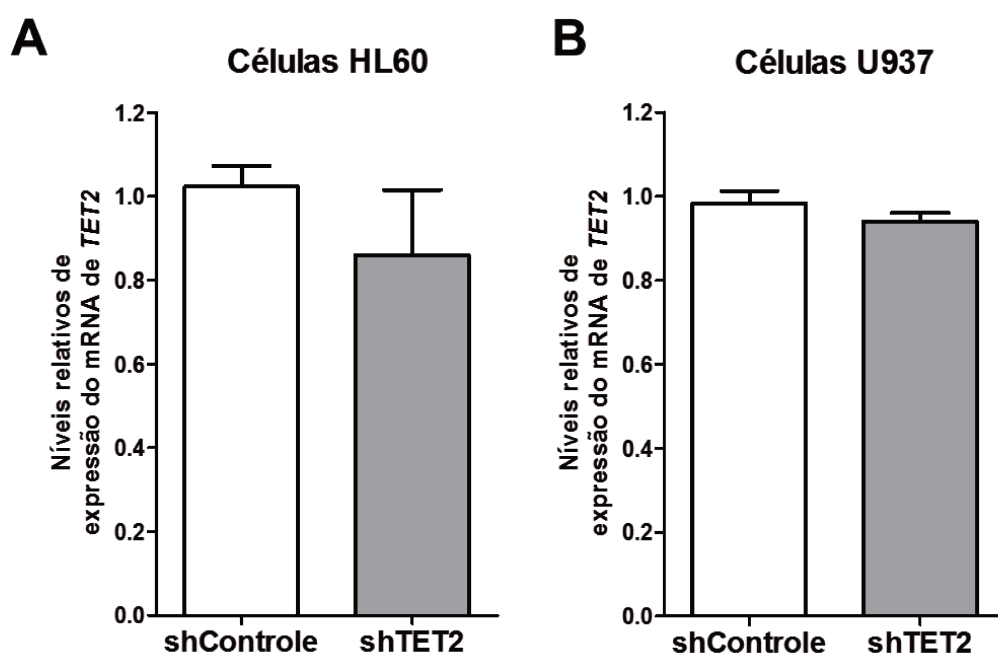


Figura 15. ShRNA específico para TET2 mediado por lentivírus não resultou no silenciamento efetivo de TET2 em células HL60 e U937. A quantificação da expressão de *TET2* nas células HL60 (A) e U937 (B) shTET2 não diferiu estatisticamente das células shControle. Expressão dos níveis de *TET2* foi normalizada pelo controle endógeno *HPRT* (A). Os resultados foram analisados usando $2^{-\Delta\Delta CT}$.

Com o objetivo de melhorar os resultados da inibição de TET2 um novo protocolo de silenciamento foi iniciado, desta vez utilizando um vetor apropriado para inibição também em células primárias CD34⁺. Apesar de nossos repetidos esforços na padronização do silenciamento através da metodologia BLOCK-iT HiPerform Lentiviral Pol II miRNAi Expression System with EMGFP (Cat. No. K4934-00 – Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). Não houve tempo suficiente para que pudéssemos titular, cultivar células e inibi-las para *TET2* durante o período de desenvolvimento deste trabalho. Armazenamos os clones recombinados com sucesso e esperamos obter resultados em experimentos futuros. Registramos esta etapa para auxiliar no desenvolvimento de projetos futuros.

Avaliação da efetividade do silenciamento do DNMT3A

Redução significativa na expressão gênica e proteica de *DNMT3A* (60% em células HL60 e 50% em células U937) foi detectada nas células shDNMT3A quando comparados com shControle (Figura 16).

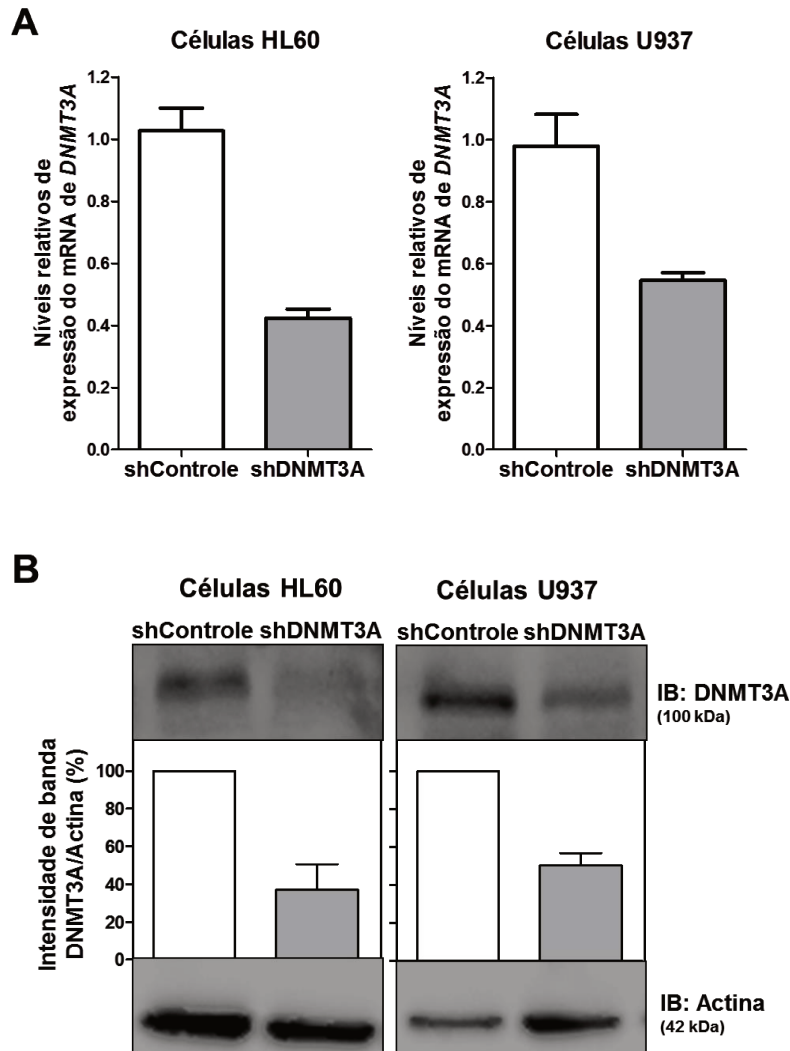


Figura 16. ShRNA específico para DNMT3A mediado por lentivírus resultou no silenciamento efetivo de DNMT3A em células HL60 e U937. A quantificação da expressão de DNMT3A nas células shDNMT3A em relação a células shControle. Expressão dos níveis de *DNMT3A* foi normalizada pelo controle endógeno *HPRT* (A). Os resultados foram analisados usando $2^{-\Delta\Delta CT}$. Análise por *Western Blot* de extratos proteicos de células shDNMT3A e shControl (B). A membrana foi incubada com anticorpos anti- DNMT3A (100 kDa) ou anti-Actina (42 kDa) como controle da quantidade de proteína aplicada no gel. A membrana de nitrocelulose foi revelada com *ECL Western Blot Analysis System*. Os gráficos de barras representam a média $\pm$ DP das intensidades de bandas de 3 experimentos independentes. A expressão proteica de DNMT3A foi corrigida pela expressão de actina correspondente (Scion Imagine software). Teste *t Student*.

Avaliação do efeito do silenciamento do DNMT3A na proliferação de células HL60 e U937

O efeito do silenciamento de DNMT3A na proliferação de células HL60 e U937 foi avaliado por MTT. Após 48 horas de cultura, não houve alteração na proliferação de células shDNMT3A quando comparadas com shControle (Figura 17).

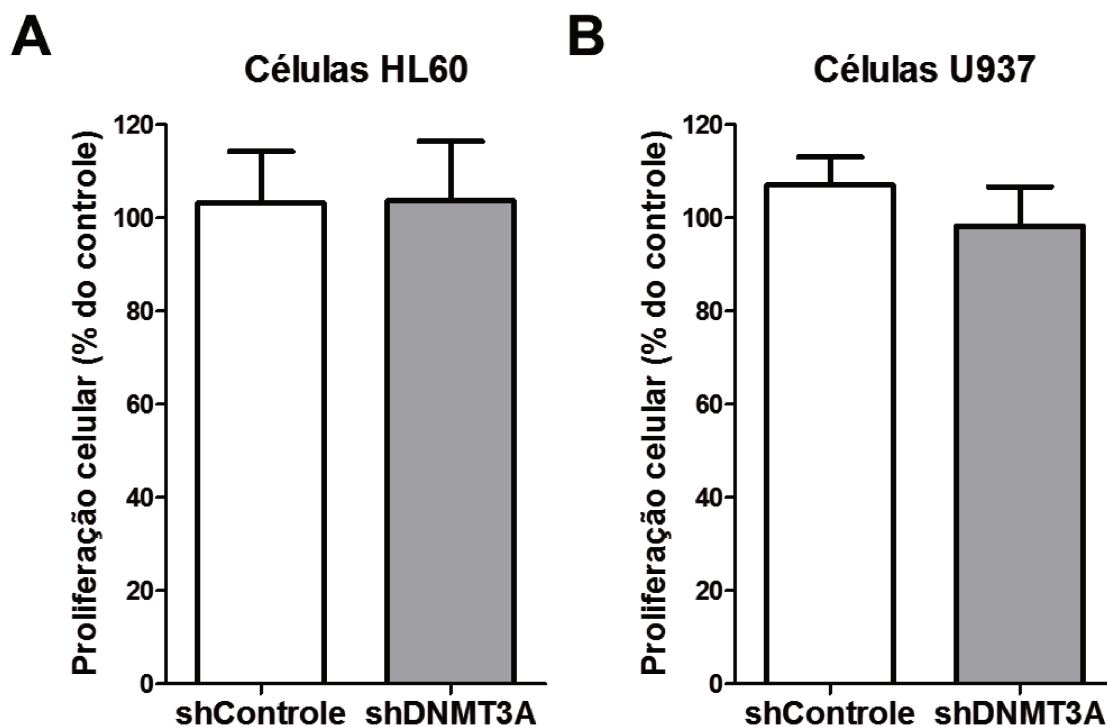


Figura 17. O silenciamento de *DNMT3A* não altera a proliferação celular em células HL60 e U937. A proliferação celular foi determinada pelo ensaio de MTT após 48 horas de incubação de células shDNMT3A e shControle em células HL60 (**A**) e U937 (**B**). Os resultados são apresentados como média $\pm$ DP de seis replicatas e é representativo de 3 experimentos independentes. Teste de *Mann-Whitney*.

Avaliação do efeito do silenciamento do DNMT3A na formação de colônias em células HL60 e U937

O ensaio de formação de colônias foi utilizado para determinar se o silenciamento de DNMT3A altera o crescimento clonal de células HL60 e U937. Não houve alteração significativa no número de colônias nas células shDNMT3A em comparação às células shControle (Figura 18).

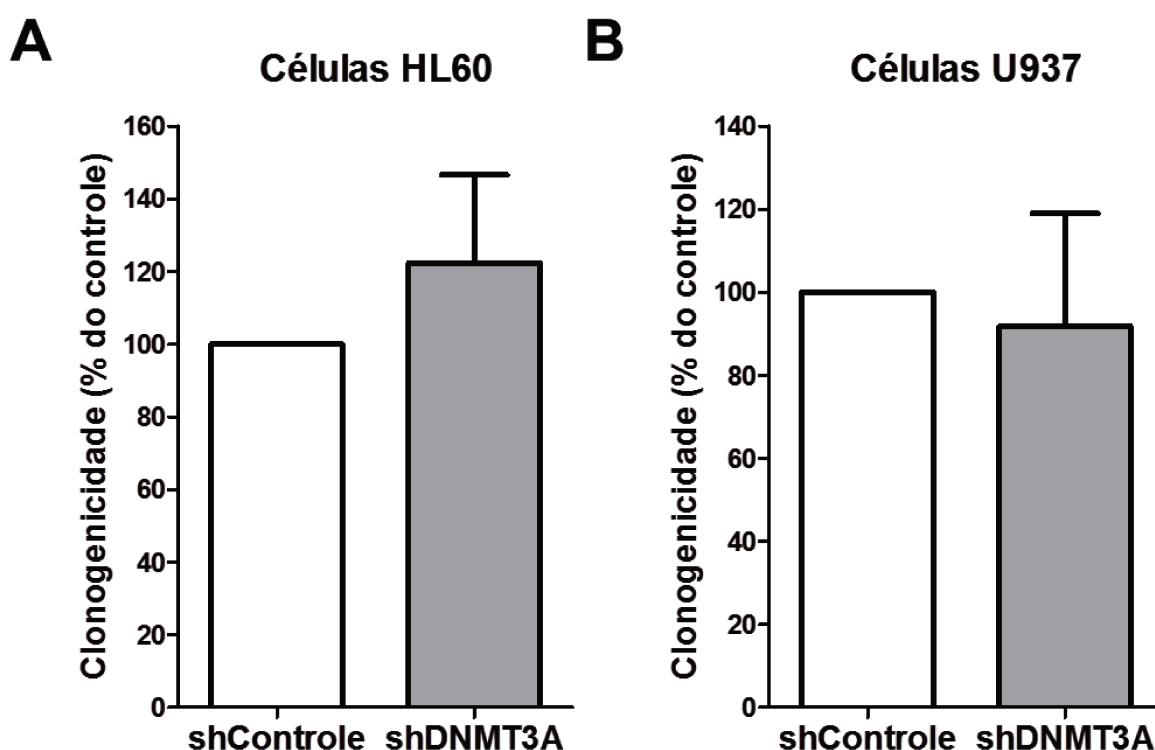


Figura 18. O silenciamento do DNMT3A não altera a clonogenicidade em células HL60 e U937. Colônias contendo células viáveis foram detectadas pela adição de MTT após 8 dias de incubação de células HL60 (A) e U937 (B) shDNMT3A e shControle. Os resultados são apresentados como média±DP de 3 experimentos independentes realizados em duplicatas. Teste *t Student*.

Avaliação do efeito do silenciamento do DNMT3A no ciclo celular em células HL60 e U937

A análise por citometria de fluxo revelou que o silenciamento de *DNMT3A* não alterou significativamente a porcentagem de células HL60 e U937 nas diferentes fases do ciclo celular, quando comparadas às células shControle (Figura 19).

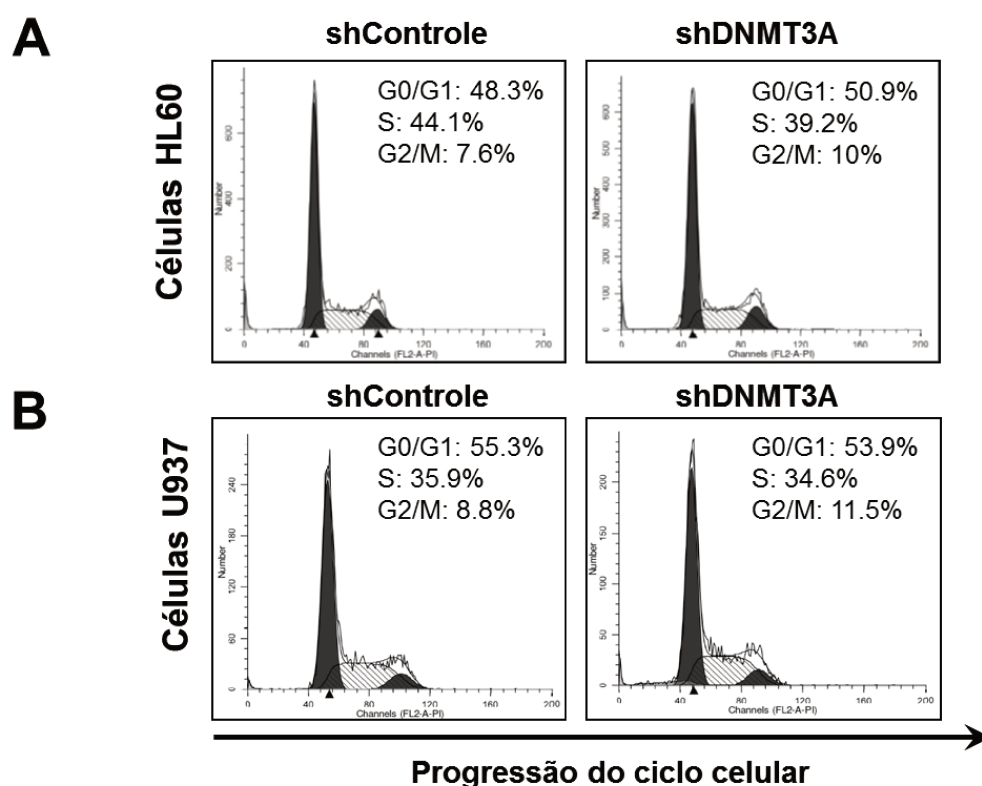


Figura 19. O silenciamento de DNMT3A não altera o ciclo celular em células HL60 e U937. Fases do ciclo celular foram detectadas por citometria de fluxo em células HL60 (A) e U937 (B) shControle e shDNMT3A incubadas por 48 horas, utilizando marcação com anexina-V e PI. Resultados são expressos como porcentagem do total de células nas fases G0/G1, S e G2/M. Três experimentos independentes foram realizados e a média±DP são apresentadas. Teste *t Student*.

Avaliação do efeito do silenciamento do DNMT3A na apoptose em células HL60 e U937

A análise por citometria de fluxo de células marcadas com Anexina-V e PI revelou que o silenciamento de *DNMT3A* não alterou a porcentagem de células apoptóticas (Figura 20).

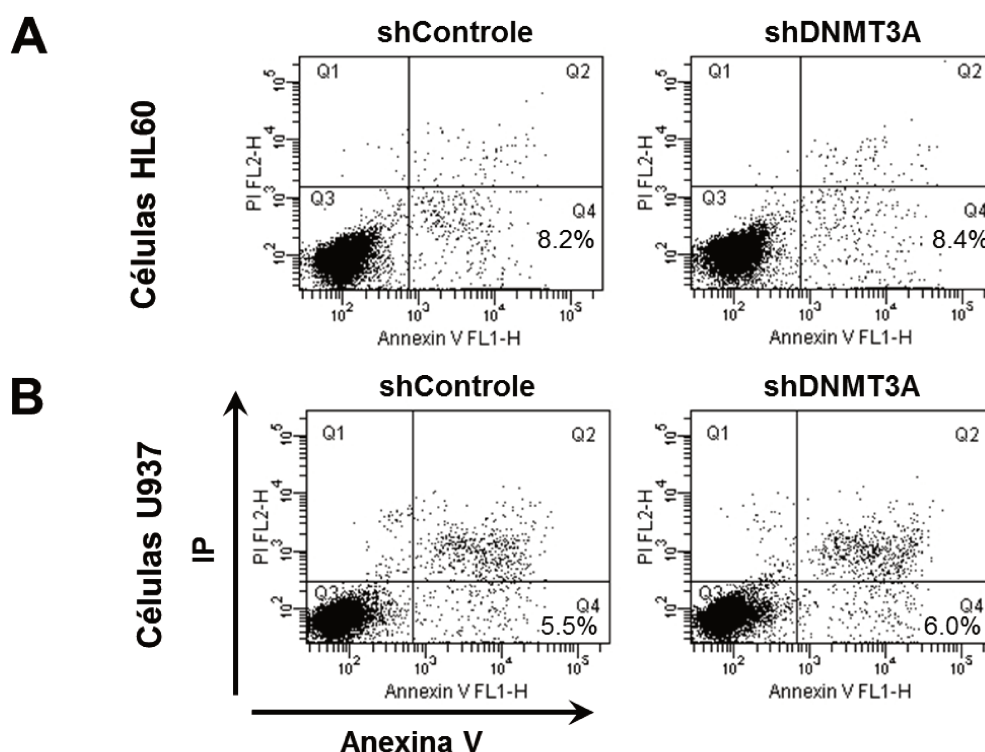


Figura 20. O silenciamento de DNMT3A não altera a apoptose em células HL60 e U937. A apoptose foi detectada por citometria de fluxo em células HL60 (A) e U937 (B) shControl e shDNMT3A incubadas por 48 horas, utilizando marcação com anexina-V e PI. Os números indicam a porcentagem de células nos quadrantes. O quadrante inferior direito contém a população de células apoptóticas (anexina-V+/PI-). Os resultados são representativos de três experimentos independentes.

Avaliação do efeito do silenciamento do DNMT3A na via de sinalização mTOR/Akt

Não houve diferença na expressão gênica de PTEN nas células shDNMT3A, quando comparadas às células shControle (Figura 21). Células silenciadas para DNMT3A não apresentaram modulação na expressão proteica, na fosforilação de PTEN e na fosforilação de P70S6K quando comparadas às células controle (Figura 22).

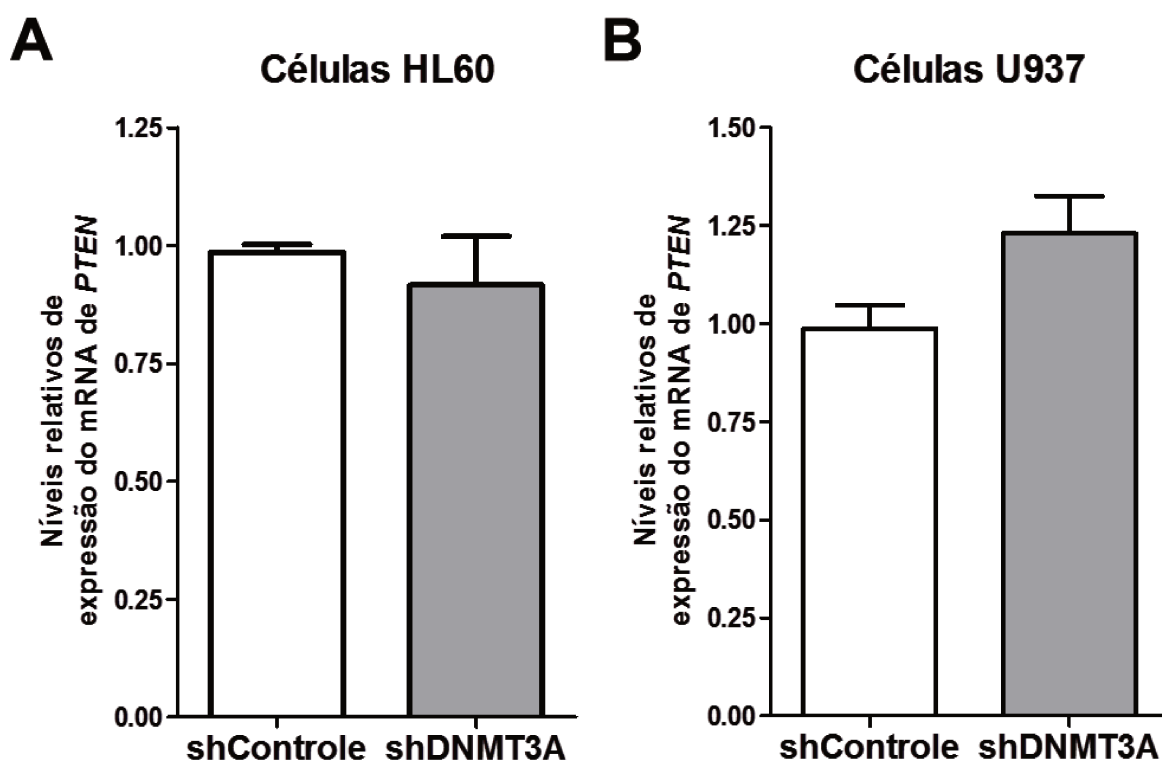


Figura 21. O silenciamento de DNMT3A não altera a expressão gênica de *PTEN* em células HL60 e U937. Quantificação da expressão de RNAm de *PTEN* nas células HL60 (A) e U937 (B) shDNMT3A em relação a células shControle. A expressão relativa de *PTEN* foi normalizada pelo controle endógeno *HPRT*. O eixo y representa a intensidade relativa de expressão do RNAm de *PTEN*. As linhas horizontais representam a mediana. Teste *t Student*

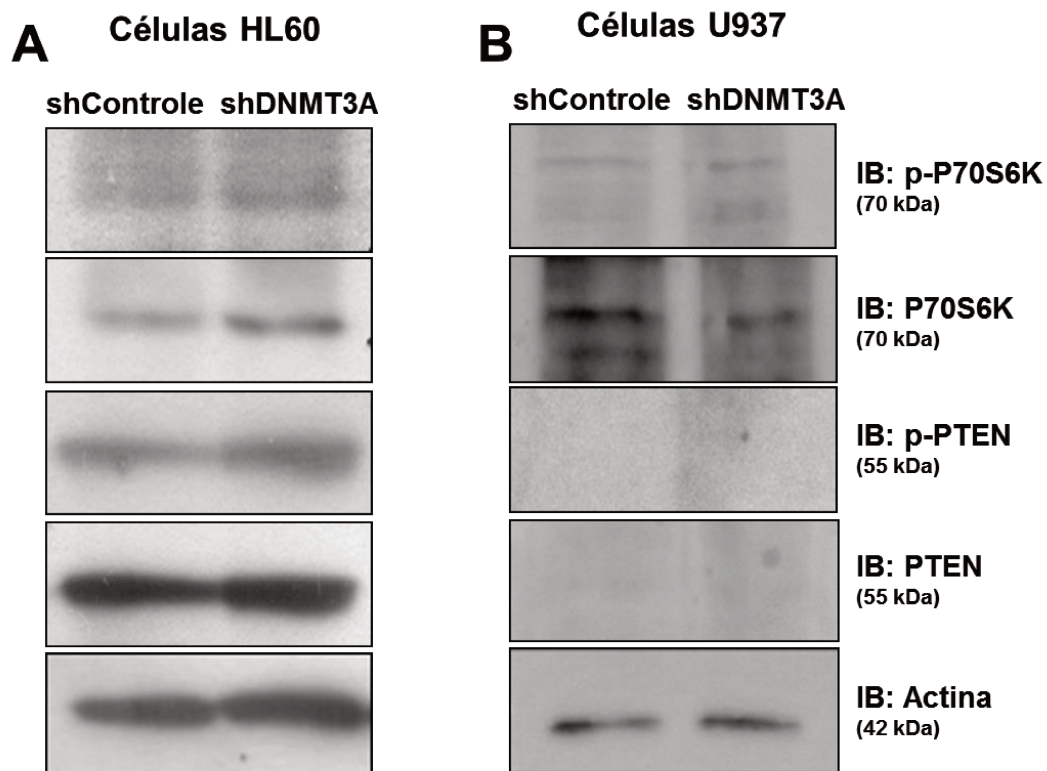


Figura 22. O silenciamento de DNMT3A não modulou a expressão proteica e a fosforilação de PTEN e P70S6K em células HL60 e U937. Extrato proteico de células HL60 (A) e U937 (B) controle (shControle) e inibidas para DNMT3A (shDNMT3A) foi submetido a *Western blot* para avaliação da expressão de PTEN e P70S6K fosforilados (p); as membranas foram reincubadas com o anticorpo para detecção da proteína total respectiva. A membrana foi incubada com anticorpos anti-Actina (42 kDa) como controle da quantidade de proteína aplicada no gel.

As neoplasias mieloides ocorrem como resultado de alterações genéticas e epigenéticas, com consequente alteração no controle da proliferação, apoptose e ciclo celular. Dessa forma, os objetivos iniciais desse trabalho foram estudar a expressão de DNMT3A em células hematopoéticas normais e leucêmicas, durante a diferenciação eritroide, assim como o efeito do silenciamento gênico em linhagens celulares leucêmicas. A partir de resultados preliminares apresentados, os objetivos foram então expandidos para a análise de *TET2*, uma vez que ambos os genes participam da regulação epigenética e são frequentemente mutados em neoplasias mieloides.

A expressão de *TET2* foi diminuída em células provenientes de pacientes com SMD e LMA quando comparada à expressão em controles normais, e reduzida em SMD alto risco quando comparado à SMD baixo risco. A menor expressão de *TET2* é condizente com dados já publicados. Jankowska e colaboradores avaliaram a expressão de *TET2* em células CD34⁺ de 16 pacientes com SMD/NMP [53] e não encontraram relação entre a expressão gênica e a presença ou ausência da mutação. Zhang e colaboradores avaliaram a expressão de *TET2* em células mononucleares de 32 pacientes com SMD e observaram reduzida expressão de *TET2* em SMD alto risco comparado a SMD baixo risco quando os pacientes foram estratificados pela OMS 2008 [93]. No entanto, nenhum estudo havia avaliado o impacto da expressão de *TET2* no fenótipo clínico e sobrevida de pacientes com SMD até o momento.

Evidências anteriores indicam uma relação entre a perda de função enzimática de *TET2* relacionada à presença da mutação, a vantagem proliferativa da célula mutada e a desregulação na diferenciação celular característica das neoplasias mieloides, que encorajaram nosso estudo da expressão gênica de *TET2* nas neoplasias mieloides SMD e LMA e na diferenciação de células hematopoéticas. Um estudo conduzido por Delhomeau

e colaboradores [50] demonstrou que mutações em *TET2* estão presentes em menor número na população CD34⁺CD38⁻ (que corresponde a células tronco e progenitores multipotentes) e sua frequência aumenta na população de progenitores maduros. O estudo também verificou que células primárias de pacientes com NMP mutantes para *TET2* podem ser implantadas em camundongos NOD-SCID (*Nonobese diabetic mice with severe combined immunodeficiency*) através de transplante xenográfico, o que reforça a hipótese de que a mutação deve ocorrer no estágio inicial de diferenciação (apenas células tronco hematopoéticas conseguem sustentar a reconstituição hematopoética de longo prazo em camundongos NOD-SCID) e de que a mutação confere vantagem seletiva às células malignas [50].

Camundongos *Tet2*^{-/-} ou *Tet2*^{+/-} apresentaram acentuada hepatomegalia, esplenomegalia, que foram mais acentuadas nos camundongos *Tet2*^{-/-}, e anemia foi observada em 1/3 destes animais. Infiltração por eritroblastos ou por células mieloides incluindo mieloblastos, monócitos, macrófagos e neutrófilos foi observada na medula óssea, fígado e baço dos animais, em contraste com a presença da hematopoese normal observada nos camundongos *Tet2* selvagem. Cerca de um terço dos camundongos morreu antes de completar um ano devido ao desenvolvimento de neoplasia mieloide com fenótipo de LMMC (neutrofilia, monocitose, esplenomegalia e hepatomegalia). O transplante de células de medula óssea total *Tet2*^{-/-}, mas não selvagem ou *Tet2*^{+/-} levou ao aumento da contagem de leucócitos, monócitos e esplenomegalia [71]. A inibição de *TET2* em CD34⁺ de sangue de cordão umbilical também levou à vantagem da diferenciação celular mieloide sobre a série eritrocítica [69]. Moran-Crusio observou que células hematopoéticas de camundongos silenciadas para *Tet2* têm sua capacidade proliferativa *in vitro* aumentada. Células hematopoéticas de camundongos deficientes para *Tet2* apresentaram aumento na

capacidade de reconstituição hematopoética compatível com aumento de função da célula tronco hematopoética *in vivo*. Nesses camundongos, a perda de *Tet2* levou a uma progressiva mieloproliferação característica de LMMC e a haploinsuficiência conferiu aumento da capacidade de autorrenovação à célula tronco progenitora e hematopoese extramedular, sugerindo que a perda de *Tet2* em heterozigose, comumente verificada em neoplasias mieloides, seja suficiente para a transformação mieloide *in vivo* [70].

De maneira semelhante, nosso grupo de pesquisa verificou aumento da expressão de *TET2* em todos os modelos diferenciação celular de linhagens leucêmicas, embora o aumento na diferenciação eritrocítica não tenha sido estatisticamente significativo, provavelmente devido ao baixo número de experimentos realizados até o momento. O aumento mais evidente na expressão de *TET2* foi observado durante a diferenciação granulocítica (cerca de 20 vezes), corroborando estudos acima citados que verificaram uma diminuição dessa diferenciação quando *TET2* é silenciado. Adicionalmente, verificamos aumento da expressão de *TET2* durante a diferenciação eritroide de células CD34⁺ de indivíduos normais e de pacientes com SMD, em que a perda de função da proteína pode ocorrer devido à presença de mutação ou baixa expressão. No entanto, o status mutacional do gene pode não estar associado a seu perfil de expressão gênica, e esta associação ainda foi pouco explorada provavelmente devido à limitação de amostras disponíveis para estudo.

O impacto da expressão de *TET2* na sobrevida de pacientes com neoplasias mieloides ainda não foi esclarecido [53, 93]. Em nossa coorte de pacientes, foram verificadas associações significativas entre a baixa expressão de *TET2* e a baixa contagem de hemoglobina, corroborando nossos resultados que evidenciam a importância de *TET2* durante a diferenciação eritroide. A baixa expressão de *TET2* teve impacto negativo na sobrevida livre de evento e na sobrevida global, assim como os fatores clínicos clássicos,

como estratificação de risco de acordo com a classificação da OMS 2008, IPSS, hemoglobina, contagem de leucócitos, contagem absoluta de neutrófilos e porcentagem de blastos na medula óssea. A análise multivariada evidenciou que a expressão de *TET2*, IPSS e hemoglobina são fatores prognósticos independentes de sobrevida livre de evento e sobrevida global. Em pacientes com SMD, Kosminder e colaboradores reportaram associação entre mutações em *TET2* e diminuição no risco de progressão da doença e aumento na sobrevida [72]. Liu e colaboradores reportaram que pacientes com SMD e baixos níveis de 5hmC apresentaram menor sobrevida global, mas o estudo não encontrou correlação entre mutação em *TET2* e sobrevida global em um grupo de 61 pacientes com SMD [73]. Mutações em *TET2* não apresentaram impacto significativo no prognóstico quando analisadas em conjunto com outras alterações moleculares em 1185 pacientes com LMA [74]. Por outro lado, mutações em *TET2* impactaram negativamente o prognóstico de pacientes com LMA de risco citogenético intermediário [75]. Em pacientes com LMA secundária e LMMC, mutações em *TET2* representaram menor sobrevida global [68, 76]. As diferentes consequências na sobrevida encontradas podem ser explicadas pela diversidade de pacientes analisados através de diferentes metodologias. Estudos futuros incluindo análise da mutação de *TET2* através de metodologias de NGS, juntamente com a análise da expressão de *TET2* e dos níveis de 5hmc, incluindo aqueles que considerem análises combinadas de múltiplas alterações moleculares serão necessários para melhor definir o impacto da perda de função de *TET2* no prognóstico das neoplasias mieloides.

Até o momento, não foi possível padronizarmos a inibição de *TET2* em células hematopoéticas primárias e em linhagens leucêmicas, uma vez que o lentivírus utilizado não resultou em inibição efetiva e não foi possível finalizar a transdução do lentivírus construído com o kit Blockit. Nossos esforços ainda estão voltados para concretização

desse objetivo e acreditamos que a padronização da inibição de TET2 pode permitir o desenho de novos estudos funcionais que contribuam para a elucidação da função de TET2 na hematopoese.

Outros genes envolvidos na manutenção da metilação do DNA, como DNMT1 e DNMT3A têm apresentado implicação na função de células tronco hematopoéticas, na diferenciação mieloide e, conseqüentemente, em neoplasias mieloides. Dessa maneira, outro objetivo do presente estudo foi avaliar a expressão e função de DNMT3A em pacientes com SMD e LMA. A expressão de *DNMT3A* foi semelhante entre pacientes com LMA, SMD e controles normais, assim como durante a diferenciação eritroide de células CD34⁺ de indivíduos normais e pacientes com SMD, o que sugere que a mutação altere a função proteica de forma distinta do silenciamento. A expressão de *DNMT3A* foi anteriormente investigada por Mizuno e colaboradores [87], que avaliou 50 pacientes com neoplasia hematológica, sendo 33 LMA e 17 LMC, e observou aumento da expressão gênica de *DNMT3A* nos pacientes com LMA comparado às células hematopoéticas normais, mas este dado não foi confirmado por outros autores até o momento.

Apesar dos nossos resultados negativos da expressão de *DNMT3A* em SMD e LMA, a mutação em *DNMT3A* foi descrita como fator de pior prognóstico em pacientes com SMD [79] e LMA [86]. Uma meta-análise de estudos anteriores sugeriu que mutações em *DNMT3A* têm impacto negativo na sobrevida de pacientes com diferentes subtipos de LMA, e conferem pior prognóstico com redução na sobrevida global ($p=0.0004$) e na sobrevida livre de recidiva ($p=0.002$). A presença de mutações no *DNMT3A* parece ser fator preditor independente de prognóstico para sobrevida global ($p=0.01$) e sobrevida livre de recidiva ($p=0.0005$) também em pacientes jovens com LMA cariótipo normal [86].

A consequência da mutação *DNMT3A* na função da proteína ainda não foi esclarecida. Ley e colaboradores [49] identificaram 182 regiões genômicas hipometiladas em 5 pacientes com LMA mutados para *DNMT3A* quando comparados com 5 pacientes com LMA selvagens para *DNMT3A*, sendo que os pacientes comparados apresentavam a mesma classificação FAB e a mesma porcentagem de blastos na medula óssea; mas o perfil de metilação global foi semelhante entre os dois grupos. Apesar das evidências iniciais indicarem que a mutação tenha como consequência a perda de função, a presença da mutação em heterozigose sugere que resulte na ativação de um oncogene ou na aquisição de uma nova função para a proteína. A associação funcional não foi elucidada, mas um estudo recente demonstrou que mutações no *DNMT3A* alteram sua oligomerização, resultando em enzimas ativas com propriedades catalíticas alteradas e que o modelo de perda de função não é suficiente para esclarecer as correlações observadas entre as mutações no *DNMT3A* e neoplasia [88]. De fato, todas as evidências clínicas sugerem que as SMD estejam associadas com fenótipo hipermetilado [94] e que inibidores de DNMTs estejam associados com aumento da sobrevida nessa doença [32-34].

Dados previamente publicados demonstram que a inibição de DNMT3A leva ao aumento da expressão de PTEN [82], importante regulador da via de sinalização Akt/mTOR, através de desmetilação da região promotora. O tratamento utilizando inibidores de DNMTs em pacientes com melanoma induziu a redução da metilação do PTEN, semelhante ao efeito da inibição de *DNMT3A*, e também resultou em aumento da expressão de PTEN e inibição da via de sinalização Akt/mTOR [95]. O silenciamento do DNMT3A em melanoma inibiu o crescimento do tumor e metástase em modelos de melanoma murino [84]. Dessa forma, nossa hipótese era que, se a ativação de *DNMT3A* contribuísse para a leucemogênese, o silenciamento do *DNMT3A* em células leucêmicas

poderia induzir a apoptose e reduzir a proliferação celular nestas células. Em nossa análise, contudo, não observamos modulação da sobrevivência celular e da expressão gênica e proteica de PTEN nas células leucêmicas submetidas à inibição de DNMT3A. Apesar de alcançar efetividade no silenciamento de DNMT3A, uma redução maior que 60% da expressão talvez seja necessária para garantir melhores resultados, uma vez que pouca expressão de DNMT3A pode ser suficiente para garantir atividade normal de PTEN. Outro fato que merece ser pontuado é que a mutação pode ter como consequência a aquisição de uma nova função e, neste caso, o nosso modelo de estudo não seria o ideal.

A participação de *Dnmt3a* na diferenciação das células hematopoéticas foi bem evidenciada em célula CD34⁺ de camundongo, que quando submetidas ao silenciamento de *Dnmt3a*, células tronco fenotipicamente normais se acumulam, mas perdem progressivamente sua capacidade de diferenciação [85]. Evidências anteriores indicaram que a inibição de *Dnmt3a* em células CD34⁺ de camundongos atua predominantemente na autorrenovação, uma vez que ensaios de formação de colônia *in vitro* e ensaios de transplante *in vivo* demonstraram que os potenciais de diferenciação linfóide e mieloide são mantidos em células tronco hematopoéticas *Dnmt3a*⁻, *Dnmt3b*⁻ ou *Dnmt3a*⁻/*Dnmt3b*⁻. No entanto, células tronco hematopoéticas *Dnmt3a*⁻/*Dnmt3b*⁻, mas não *Dnmt3a*⁻ ou *Dnmt3b*⁻ são incapazes de reconstituição a longo prazo em ensaios de transplante. Esses resultados estabelecem uma participação crítica da metilação do DNA realizada por Dnmt3a e Dnmt3b na autorrenovação de células tronco hematopoéticas murinas. [96]. Dessa forma, interpretamos que o modelo de diferenciação estudado por nosso grupo não é o ideal e que o DNMT3A deva mesmo atuar na autorrenovação do progenitor e que a modulação da diferenciação seja uma consequência. Estudos funcionais com hiperexpressão de DNMT3A

ou expressão de *DNMT3A* mutado podem auxiliar no melhor entendimento da função deste gene nas doenças mieloides.

Em conclusão, o presente estudo identificou que a expressão de *TET2* está reduzida em SMD e LMA, é fator preditivo de sobrevida nos pacientes com SMD, é modulada durante o processo de diferenciação eritroide de células CD34⁺ e durante o processo de diferenciação granulocítica e megacariocítica de linhagens celulares leucêmicas. Dessa forma, consideramos que similarmente à presença de mutação no *TET2*, a baixa expressão de *TET2* pode participar do processo de transformação celular na SMD alto risco e LMA, provavelmente através de sua participação nos processos de diferenciação do progenitor mieloide. Estudos clínicos devem considerar a investigação da expressão gênica de *TET2* em conjunto com a pesquisa de mutação *TET2* na definição de fenótipo neoplásico e prognóstico. Os resultados de expressão e função de *DNMT3A* sugerem que a mutação, e não a expressão, deva ser o principal mecanismo pelo qual o *DNMT3A* participa da transformação neoplásica. A função de *DNMT3A* pode depender da linhagem celular estudada, e é possível que a mutação resulte na aquisição de uma nova função.

Baseados nos resultados de expressão de *TET2*, concluímos que:

- Similarmente à presença de mutação, a baixa expressão de *TET2* pode participar do processo de transformação celular na SMD e LMA, provavelmente através de sua participação nos processos de diferenciação do progenitor mieloide.
- A baixa expressão de *TET2*, assim como IPSS intermediário-2/alto e hemoglobina <10g/dL são fatores independentes de pior sobrevida livre de evento e sobrevida global em pacientes com SMD
- Estudos clínicos devem considerar a investigação da expressão gênica de *TET2* em conjunto com a pesquisa de mutação *TET2* na definição de fenótipo neoplásico e prognóstico.

Baseados nos resultados de expressão e função de DNMT3A, concluímos que:

- A expressão de *DNMT3A* foi semelhante entre indivíduos normais e pacientes com SMD e LMA. A mutação, e não a expressão, deve ser o principal mecanismo pelo qual o DNMT3A participa da transformação neoplásica.
- O silenciamento da expressão de DNMT3A não modulou a apoptose, proliferação celular e ativação de PTEN em modelos de linhagem leucêmica HL60 e U937. A função de DNMT3A pode depender da linhagem celular estudada.
- A modulação da expressão gênica de *DNMT3A* parece não interferir no processo de transformação neoplásica. É possível que a mutação resulte na aquisição de uma nova função.

REFERÊNCIAS

1. Issa, J.P., *The myelodysplastic syndrome as a prototypical epigenetic disease*. Blood, 2013. 121(19): p. 3811-7.
2. Elert, E., *Living with leukaemia*. Nature, 2013. 498(7455): p. S2-3.
3. Bennett, J.M., et al., *Proposals for the classification of the myelodysplastic syndromes*. Br J Haematol, 1982. 51(2): p. 189-99.
4. Cazzola, M. and L. Malcovati, *Myelodysplastic syndromes--coping with ineffective hematopoiesis*. N Engl J Med, 2005. 352(6): p. 536-8.
5. Vardiman, J.W., *The new World Health Organization classification of myeloid neoplasms: Q&A with James W. Vardiman, MD*. Clin Adv Hematol Oncol, 2003. 1(1): p. 18, 21.
6. Ades, L., R. Itzykson, and P. Fenaux, *Myelodysplastic syndromes*. Lancet, 2014.
7. Bejar, R., R. Levine, and B.L. Ebert, *Unraveling the molecular pathophysiology of myelodysplastic syndromes*. J Clin Oncol, 2011. 29(5): p. 504-15.
8. Schanz, J., et al., *New comprehensive cytogenetic scoring system for primary myelodysplastic syndromes (MDS) and oligoblastic acute myeloid leukemia after MDS derived from an international database merge*. J Clin Oncol, 2012. 30(8): p. 820-9.
9. Look, A.T., *Molecular Pathogenesis of MDS*. Hematology Am Soc Hematol Educ Program, 2005: p. 156-60.
10. Gondek, L.P., et al., *Detection of cryptic chromosomal lesions including acquired segmental uniparental disomy in advanced and low-risk myelodysplastic syndromes*. Exp Hematol, 2007. 35(11): p. 1728-38.
11. Tiu, R.V., et al., *Prognostic impact of SNP array karyotyping in myelodysplastic syndromes and related myeloid malignancies*. Blood, 2011. 117(17): p. 4552-60.
12. Bejar, R. and B.L. Ebert, *The genetic basis of myelodysplastic syndromes*. Hematol Oncol Clin North Am, 2010. 24(2): p. 295-315.
13. Issa, J.P., *Epigenetic changes in the myelodysplastic syndrome*. Hematol Oncol Clin North Am, 2010. 24(2): p. 317-30.
14. Greenberg, P., et al., *International scoring system for evaluating prognosis in myelodysplastic syndromes*. Blood, 1997. 89(6): p. 2079-88.
15. Vardiman, J.W., N.L. Harris, and R.D. Brunning, *The World Health Organization (WHO) classification of the myeloid neoplasms*. Blood, 2002. 100(7): p. 2292-302.
16. Cazzola, M., M.G. Della Porta, and L. Malcovati, *The genetic basis of myelodysplasia and its clinical relevance*. Blood, 2013. 122(25): p. 4021-34.
17. Swerdlow S.H., C.E., Harris N.L., Jaffe E.S., Pileri S.A., Stein H., Thiele J., Vardiman J.W., *Myelodysplastic syndromes*, in *WHO Classification of Tumours of Hematopoietic and Lymphoid Tissues* 2008, IARC: Lyon. p. 87-104.
18. Greenberg, P.L., et al., *Revised international prognostic scoring system for myelodysplastic syndromes*. Blood, 2012. 120(12): p. 2454-65.
19. Swerdlow S.H., C.E., Harris N.L., Jaffe E.S., Pileri S.A., Stein H., Thiele J., Vardiman J.W., *Acute myeloid leukaemia (AML) and related precursor neoplasms*, in *WHO Classification of Tumours of Hematopoietic and Lymphoid Tissues* 2008, IARC: Lyon. p. 109-145.

20. Ferrara, F. and C.A. Schiffer, *Acute myeloid leukaemia in adults*. Lancet, 2013. 381(9865): p. 484-95.
21. Hanahan, D. and R.A. Weinberg, *The hallmarks of cancer*. Cell, 2000. 100(1): p. 57-70.
22. Hanahan, D. and R.A. Weinberg, *Hallmarks of cancer: the next generation*. Cell, 2011. 144(5): p. 646-74.
23. Herman, J.G. and S.B. Baylin, *Gene silencing in cancer in association with promoter hypermethylation*. N Engl J Med, 2003. 349(21): p. 2042-54.
24. Paz, M.F., et al., *A systematic profile of DNA methylation in human cancer cell lines*. Cancer Res, 2003. 63(5): p. 1114-21.
25. Bernstein, B.E., A. Meissner, and E.S. Lander, *The mammalian epigenome*. Cell, 2007. 128(4): p. 669-81.
26. Jones, P.A. and S.B. Baylin, *The fundamental role of epigenetic events in cancer*. Nat Rev Genet, 2002. 3(6): p. 415-28.
27. Blackledge, N.P. and R. Klose, *CpG island chromatin: a platform for gene regulation*. Epigenetics, 2011. 6(2): p. 147-52.
28. Meissner, A., et al., *Genome-scale DNA methylation maps of pluripotent and differentiated cells*. Nature, 2008. 454(7205): p. 766-70.
29. Feinberg, A.P. and B. Vogelstein, *Hypomethylation distinguishes genes of some human cancers from their normal counterparts*. Nature, 1983. 301(5895): p. 89-92.
30. Feinberg, A.P., R. Ohlsson, and S. Henikoff, *The epigenetic progenitor origin of human cancer*. Nat Rev Genet, 2006. 7(1): p. 21-33.
31. Bonifer, C. and D.T. Bowen, *Epigenetic mechanisms regulating normal and malignant haematopoiesis: new therapeutic targets for clinical medicine*. Expert Rev Mol Med, 2010. 12: p. e6.
32. Silverman, L.R., et al., *Randomized controlled trial of azacitidine in patients with the myelodysplastic syndrome: a study of the cancer and leukemia group B*. J Clin Oncol, 2002. 20(10): p. 2429-40.
33. Kantarjian, H., et al., *Decitabine improves patient outcomes in myelodysplastic syndromes: results of a phase III randomized study*. Cancer, 2006. 106(8): p. 1794-803.
34. Fenaux, P., et al., *Efficacy of azacitidine compared with that of conventional care regimens in the treatment of higher-risk myelodysplastic syndromes: a randomised, open-label, phase III study*. Lancet Oncol, 2009. 10(3): p. 223-32.
35. Fandy, T.E., et al., *Early epigenetic changes and DNA damage do not predict clinical response in an overlapping schedule of 5-azacytidine and entinostat in patients with myeloid malignancies*. Blood, 2009. 114(13): p. 2764-73.
36. Traina, F., et al., *Impact of molecular mutations on treatment response to DNMT inhibitors in myelodysplasia and related neoplasms*. Leukemia, 2014. 28(1): p. 78-87.
37. Itzykson, R., et al., *Impact of TET2 mutations on response rate to azacitidine in myelodysplastic syndromes and low blast count acute myeloid leukemias*. Leukemia, 2011. 25(7): p. 1147-52.
38. Metzeler, K.H., et al., *DNMT3A mutations and response to the hypomethylating agent decitabine in acute myeloid leukemia*. Leukemia, 2012. 26(5): p. 1106-7.

39. Frohling, S. and H. Dohner, *Chromosomal abnormalities in cancer*. N Engl J Med, 2008. 359(7): p. 722-34.
40. Rowley, J.D., *Letter: A new consistent chromosomal abnormality in chronic myelogenous leukaemia identified by quinacrine fluorescence and Giemsa staining*. Nature, 1973. 243(5405): p. 290-3.
41. de Lavallade, H., et al., *Imatinib for newly diagnosed patients with chronic myeloid leukemia: incidence of sustained responses in an intention-to-treat analysis*. J Clin Oncol, 2008. 26(20): p. 3358-63.
42. Tallman, M.S., et al., *All-trans-retinoic acid in acute promyelocytic leukemia*. N Engl J Med, 1997. 337(15): p. 1021-8.
43. List, A., et al., *Lenalidomide in the myelodysplastic syndrome with chromosome 5q deletion*. N Engl J Med, 2006. 355(14): p. 1456-65.
44. Alberts B, J.A., Lewis J, Raff M, Roberts K and Walter P, *Molecular biology of the cell*. 5th ed. 2010, Porto Alegre: ARTMED. p. 1231.
45. Sato-Otsubo, A., M. Sanada, and S. Ogawa, *Single-nucleotide polymorphism array karyotyping in clinical practice: where, when, and how?* Semin Oncol, 2012. 39(1): p. 13-25.
46. Maciejewski, J.P., R.V. Tiu, and C. O'Keefe, *Application of array-based whole genome scanning technologies as a cytogenetic tool in haematological malignancies*. Br J Haematol, 2009. 146(5): p. 479-88.
47. Meyerson, M., S. Gabriel, and G. Getz, *Advances in understanding cancer genomes through second-generation sequencing*. Nat Rev Genet, 2010. 11(10): p. 685-96.
48. Figueroa, M.E., et al., *Leukemic IDH1 and IDH2 mutations result in a hypermethylation phenotype, disrupt TET2 function, and impair hematopoietic differentiation*. Cancer Cell, 2010. 18(6): p. 553-67.
49. Ley, T.J., et al., *DNMT3A mutations in acute myeloid leukemia*. N Engl J Med, 2010. 363(25): p. 2424-33.
50. Delhommeau, F., et al., *Mutation in TET2 in myeloid cancers*. N Engl J Med, 2009. 360(22): p. 2289-301.
51. Tiu, R.V., et al., *Updates in cytogenetics and molecular markers in MDS*. Curr Hematol Malig Rep, 2011. 6(2): p. 126-35.
52. Papaemmanuil, E., et al., *Clinical and biological implications of driver mutations in myelodysplastic syndromes*. Blood, 2013. 122(22): p. 3616-27; quiz 3699.
53. Jankowska, A.M., et al., *Loss of heterozygosity 4q24 and TET2 mutations associated with myelodysplastic/myeloproliferative neoplasms*. Blood, 2009. 113(25): p. 6403-10.
54. Makishima, H., et al., *Novel homo- and hemizygous mutations in EZH2 in myeloid malignancies*. Leukemia, 2010. 24(10): p. 1799-804.
55. Boultonwood, J., et al., *Frequent mutation of the polycomb-associated gene ASXL1 in the myelodysplastic syndromes and in acute myeloid leukemia*. Leukemia, 2010. 24(5): p. 1062-5.
56. Yan, H., et al., *IDH1 and IDH2 mutations in gliomas*. N Engl J Med, 2009. 360(8): p. 765-73.
57. Makishima, H., et al., *Mutations of e3 ubiquitin ligase cbl family members constitute a novel common pathogenic lesion in myeloid malignancies*. J Clin Oncol, 2009. 27(36): p. 6109-16.

58. Yoshida, K., et al., *Frequent pathway mutations of splicing machinery in myelodysplasia*. *Nature*, 2011. 478(7367): p. 64-9.
59. Bejar, R., et al., *Clinical effect of point mutations in myelodysplastic syndromes*. *N Engl J Med*, 2011. 364(26): p. 2496-506.
60. Lindsley, R.C. and B.L. Ebert, *Molecular pathophysiology of myelodysplastic syndromes*. *Annu Rev Pathol*, 2013. 8: p. 21-47.
61. Kosmider, O., et al., *Mutations of IDH1 and IDH2 genes in early and accelerated phases of myelodysplastic syndromes and MDS/myeloproliferative neoplasms*. *Leukemia*, 2010. 24(5): p. 1094-6.
62. Tahiliani, M., et al., *Conversion of 5-methylcytosine to 5-hydroxymethylcytosine in mammalian DNA by MLL partner TET1*. *Science*, 2009. 324(5929): p. 930-5.
63. Ko, M., et al., *Impaired hydroxylation of 5-methylcytosine in myeloid cancers with mutant TET2*. *Nature*, 2010. 468(7325): p. 839-43.
64. Jin, S.G., S. Kadam, and G.P. Pfeifer, *Examination of the specificity of DNA methylation profiling techniques towards 5-methylcytosine and 5-hydroxymethylcytosine*. *Nucleic Acids Res*, 2010. 38(11): p. e125.
65. Valinluck, V., et al., *Oxidative damage to methyl-CpG sequences inhibits the binding of the methyl-CpG binding domain (MBD) of methyl-CpG binding protein 2 (MeCP2)*. *Nucleic Acids Res*, 2004. 32(14): p. 4100-8.
66. Valinluck, V. and L.C. Sowers, *Endogenous cytosine damage products alter the site selectivity of human DNA maintenance methyltransferase DNMT1*. *Cancer Res*, 2007. 67(3): p. 946-50.
67. Guo, J.U., et al., *Emerging roles of TET proteins and 5-hydroxymethylcytosines in active DNA demethylation and beyond*. *Cell Cycle*, 2011. 10(16): p. 2662-8.
68. Abdel-Wahab, O., et al., *Genetic characterization of TET1, TET2, and TET3 alterations in myeloid malignancies*. *Blood*, 2009. 114(1): p. 144-7.
69. Pronier, E., et al., *Inhibition of TET2-mediated conversion of 5-methylcytosine to 5-hydroxymethylcytosine disturbs erythroid and granulomonocytic differentiation of human hematopoietic progenitors*. *Blood*, 2011. 118(9): p. 2551-5.
70. Moran-Crusio, K., et al., *Tet2 loss leads to increased hematopoietic stem cell self-renewal and myeloid transformation*. *Cancer Cell*, 2011. 20(1): p. 11-24.
71. Li, Z., et al., *Deletion of Tet2 in mice leads to dysregulated hematopoietic stem cells and subsequent development of myeloid malignancies*. *Blood*, 2011. 118(17): p. 4509-18.
72. Kosmider, O., et al., *TET2 mutation is an independent favorable prognostic factor in myelodysplastic syndromes (MDSs)*. *Blood*, 2009. 114(15): p. 3285-91.
73. Liu, X., et al., *Decreased 5-hydroxymethylcytosine levels are associated with TET2 mutation and unfavorable overall survival in myelodysplastic syndromes*. *Leuk Lymphoma*, 2013. 54(11): p. 2466-73.
74. Shen, Y., et al., *Gene mutation patterns and their prognostic impact in a cohort of 1185 patients with acute myeloid leukemia*. *Blood*, 2011. 118(20): p. 5593-603.
75. Chou, W.C., et al., *TET2 mutation is an unfavorable prognostic factor in acute myeloid leukemia patients with intermediate-risk cytogenetics*. *Blood*, 2011. 118(14): p. 3803-10.
76. Kosmider, O., et al., *TET2 gene mutation is a frequent and adverse event in chronic myelomonocytic leukemia*. *Haematologica*, 2009. 94(12): p. 1676-81.

77. Jeltsch, A. and W. Fischle, *Molecular epigenetics: connecting human biology and disease with little marks*. Chembiochem, 2011. 12(2): p. 183-4.
78. Yan, X.J., et al., *Exome sequencing identifies somatic mutations of DNA methyltransferase gene DNMT3A in acute monocytic leukemia*. Nat Genet, 2011. 43(4): p. 309-15.
79. Walter, M.J., et al., *Recurrent DNMT3A mutations in patients with myelodysplastic syndromes*. Leukemia, 2011. 25(7): p. 1153-8.
80. Shah, N. and S. Sukumar, *The Hox genes and their roles in oncogenesis*. Nat Rev Cancer, 2010. 10(5): p. 361-71.
81. Eklund, E.A., *The role of HOX genes in malignant myeloid disease*. Curr Opin Hematol, 2007. 14(2): p. 85-9.
82. Zhao, Z., et al., *Depletion of DNMT3A suppressed cell proliferation and restored PTEN in hepatocellular carcinoma cell*. J Biomed Biotechnol, 2010. 2010: p. 737535.
83. Hollander, M.C., G.M. Blumenthal, and P.A. Dennis, *PTEN loss in the continuum of common cancers, rare syndromes and mouse models*. Nat Rev Cancer, 2011. 11(4): p. 289-301.
84. Deng, T., et al., *An essential role for DNA methyltransferase 3a in melanoma tumorigenesis*. Biochem Biophys Res Commun, 2009. 387(3): p. 611-6.
85. Challen, G.A., et al., *Dnmt3a is essential for hematopoietic stem cell differentiation*. Nat Genet, 2012. 44(1): p. 23-31.
86. Shivarov, V., et al., *DNMT3A mutation is a poor prognosis biomarker in AML: results of a meta-analysis of 4500 AML patients*. Leuk Res, 2013. 37(11): p. 1445-50.
87. Mizuno, S., et al., *Expression of DNA methyltransferases DNMT1, 3A, and 3B in normal hematopoiesis and in acute and chronic myelogenous leukemia*. Blood, 2001. 97(5): p. 1172-9.
88. Holz-Schietinger, C. and N.O. Reich, *RNA modulation of the human DNA methyltransferase 3A*. Nucleic Acids Res, 2012. 40(17): p. 8550-7.
89. Grimwade, D., et al., *The importance of diagnostic cytogenetics on outcome in AML: analysis of 1,612 patients entered into the MRC AML 10 trial. The Medical Research Council Adult and Children's Leukaemia Working Parties*. Blood, 1998. 92(7): p. 2322-33.
90. Chomczynski, P. and N. Sacchi, *Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction*. Anal Biochem, 1987. 162(1): p. 156-9.
91. de Kok, J.B., et al., *Normalization of gene expression measurements in tumor tissues: comparison of 13 endogenous control genes*. Lab Invest, 2005. 85(1): p. 154-9.
92. Korz, C., et al., *Evidence for distinct pathomechanisms in B-cell chronic lymphocytic leukemia and mantle cell lymphoma by quantitative expression analysis of cell cycle and apoptosis-associated genes*. Blood, 2002. 99(12): p. 4554-61.
93. Zhang, W., et al., *TET2 Expression in Bone Marrow Mononuclear Cells of Patients with Myelodysplastic Syndromes and Its Clinical Significances*. Cancer Biol Med, 2012. 9(1): p. 34-7.

94. Figueroa, M.E., et al., *MDS and secondary AML display unique patterns and abundance of aberrant DNA methylation*. *Blood*, 2009. 114(16): p. 3448-58.
95. Mirmohammadsadegh, A., et al., *Epigenetic silencing of the PTEN gene in melanoma*. *Cancer Res*, 2006. 66(13): p. 6546-52.
96. Tadokoro, Y., et al., *De novo DNA methyltransferase is essential for self-renewal, but not for differentiation, in hematopoietic stem cells*. *J Exp Med*, 2007. 204(4): p. 715-22.



FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

www.fcm.unicamp.br/fcm/pesquisa

CEP, 02/02/12
(Grupo II)

PARECER CEP: Nº 1130/2011 (Este nº deve ser citado nas correspondências referente a este projeto).
CAAE: 1029.0.146.000-11

I - IDENTIFICAÇÃO:

PROJETO: “ESTUDO DE MUTAÇÕES, EXPRESSÃO E FUNÇÃO DE DNMT3A EM SÍNDROMES MIELODISPLÁSICAS E LEUCEMIAS MIELOIDES AGUDAS”.

PESQUISADOR RESPONSÁVEL: Renata Scopim Ribeiro

INSTITUIÇÃO: Hemocentro/UNICAMP

APRESENTAÇÃO AO CEP: 07/11/2011

APRESENTAR RELATÓRIO EM: 02/02/13 (O formulário encontra-se no site acima).

II – OBJETIVOS.

Investigar mutações, expressão gênica e protéica do genes DNMT3A e seu papel funcional em pacientes com síndrome mielodisplásicas (SMD) e leucemias mieloides agudas (LMA).

III – SUMÁRIO.

Trata-se de um estudo experimental, prospectivo, não populacional, não intervencionista. A coleta das amostras, a realização dos experimentos e a coleta dos dados clínicos serão efetuadas no Hemocentro/UNICAMP. Os sujeitos de pesquisa serão indivíduos provenientes do ambulatório do Hemocentro e doadores voluntários de sangue no Banco de Sangue do Hemocentro. Serão estudados pacientes com SMD e LMA em seguimento no Hemocentro sem restrições quanto a dados epidemiológicos ou condições clínicas específicas. Para as amostras-controles, serão estudados doadores de sangue sadios, na ocasião da doação de sangue no banco de sangue do Hemocentro. Os pacientes incluídos não sofrerão danos adicionais por sua inclusão no estudo, exceto pela retirada de alíquotas adicionais de 20ml de sangue periférico ou de sangue de medula óssea, uma vez que os procedimentos em si (punção venosa ou punção de medula óssea) será indicado e realizado por critérios puramente clínicos. Em relação a população controle, alíquota de sangue periférico será obtida utilizando-se a mesma punção venosa realizada para fins de doação de sangue. A pesquisadora informa ainda que poderão ser coletadas amostras-controle de medula óssea (alíquota extra de 20ml) de doadores sadios que serão submetidos a aspiração de medula óssea no Centro Cirúrgico para fins de doação para transplante alogênico.

IV - COMENTÁRIOS DOS RELATORES.

Após respostas às pendências, o projeto encontra-se adequadamente redigido e de acordo com a Resolução CNS/MS 196/96 e suas complementares, bem como o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

Comitê de Ética em Pesquisa - UNICAMP
Rua: Tessália Vieira de Camargo, 126
Caixa Postal 6111
13083-887 Campinas – SP

PHONE (019) 3521-8936
FAX (019) 3521-7187
cep@fcm.unicamp.br



V - PARECER DO CEP.

O Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP, após acatar os pareceres dos membros-relatores previamente designados para o presente caso e atendendo todos os dispositivos das Resoluções 196/96 e complementares, resolve aprovar sem restrições o Protocolo de Pesquisa, bem como ter aprovado o Termo do Consentimento Livre e Esclarecido, assim como todos os anexos incluídos na Pesquisa supracitada.

O conteúdo e as conclusões aqui apresentados são de responsabilidade exclusiva do CEP/FCM/UNICAMP e não representam a opinião da Universidade Estadual de Campinas nem a comprometem.

VI - INFORMAÇÕES COMPLEMENTARES.

O sujeito da pesquisa tem a liberdade de recusar-se a participar ou de retirar seu consentimento em qualquer fase da pesquisa, sem penalização alguma e sem prejuízo ao seu cuidado (Res. CNS 196/96 – Item IV.1.f) e deve receber uma cópia do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, na íntegra, por ele assinado (Item IV.2.d).

Pesquisador deve desenvolver a pesquisa conforme delineada no protocolo aprovado e descontinuar o estudo somente após análise das razões da descontinuidade pelo CEP que o aprovou (Res. CNS Item III.1.z), exceto quando perceber risco ou dano não previsto ao sujeito participante ou quando constatar a superioridade do regime oferecido a um dos grupos de pesquisa (Item V.3.).

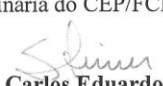
O CEP deve ser informado de todos os efeitos adversos ou fatos relevantes que alterem o curso normal do estudo (Res. CNS Item V.4.). É papel do pesquisador assegurar medidas imediatas adequadas frente a evento adverso grave ocorrido (mesmo que tenha sido em outro centro) e enviar notificação ao CEP e à Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA – junto com seu posicionamento.

Eventuais modificações ou emendas ao protocolo devem ser apresentadas ao CEP de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificada e suas justificativas. Em caso de projeto do Grupo I ou II apresentados anteriormente à ANVISA, o pesquisador ou patrocinador deve enviá-las também à mesma junto com o parecer aprovatório do CEP, para serem juntadas ao protocolo inicial (Res. 251/97, Item III.2.e)

Relatórios parciais e final devem ser apresentados ao CEP, de acordo com os prazos estabelecidos na Resolução CNS-MS 196/96.

VII- DATA DA REUNIÃO.

Homologado na XI Reunião Ordinária do CEP/FCM, em 22 de novembro de 2011.


Prof. Dr. Carlos Eduardo Steiner
PRESIDENTE do COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA
FCM / UNICAMP



FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

<http://www.fcm.unicamp.br/fcm/pesquisa/comite-de-etica-em-pesquisa>

CEP, 27/08/13.
(PARECER CEP: N° 1130/2011)

PARECER

I - IDENTIFICAÇÃO:

PROJETO: "ESTUDO DE MUTAÇÕES, EXPRESSÃO E FUNÇÃO DE DNMT3A EM SÍNDROMES MIELODISPLÁSICAS E LEUCEMIAS MIELOIDES AGUDAS".

PESQUISADOR RESPONSÁVEL: Renata Scopim Ribeiro

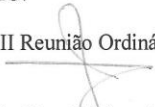
II – PARECER DO CEP.

O Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP tomou ciência e aprova o Regulamento do Biorrepositório de acordo com as diretrizes da Resolução CNS/MS 441/11 de 12/05/11, que regulamenta o armazenamento e utilização de material biológico humano no âmbito de projetos de pesquisa, referente ao protocolo de pesquisa supracitado.

O conteúdo e as conclusões aqui apresentados são de responsabilidade exclusiva do CEP/FCM/UNICAMP e não representam a opinião da Universidade Estadual de Campinas nem a comprometem.

III – DATA DA REUNIÃO.

Homologado na VIII Reunião Ordinária do CEP/FCM, em 28 de agosto de 2013.


Profa. Dra. Fátima Aparecida Böttcher Luiz
COORDENADORA do COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA
FCM / UNICAMP

Comitê de Ética em Pesquisa - UNICAMP
Rua: Tessália Vieira de Camargo, 126
Caixa Postal 6111
13083-887 Campinas – SP

FONE (019) 3521-8936
FAX (019) 3521-7187
cep@fcm.unicamp.br



HEMOCENTRO – UNICAMP



**TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE)
(Pacientes)**

Título da pesquisa: “Estudo de mutações, expressão e função de DNMT3A em síndromes mielodisplásicas e leucemias mieloides agudas.”

Pesquisadora responsável: Renata Scopim Ribeiro

Orientadora: Dra. Fabíola Traína

Objetivo da pesquisa: Investigar mutações, expressão gênica e protéica do DNMT3A e seu papel funcional em doenças mieloides como Síndrome Mielodisplásica e Leucemia Mieloide Aguda. Sabemos que algumas mutações genéticas ocorrem com maior frequência em pacientes com doença mielóide. Iremos estudar se DNMT3A pode estar envolvida no aparecimento dessas doenças, isso é importante na busca de novos tratamentos para os pacientes.

Sendo um paciente portador de Síndrome Mielodisplásica ou Leucemia Mieloide Aguda, estamos pedindo a sua colaboração para a realização desta pesquisa. A sua participação não é obrigatória e caso você não queira participar isso não mudará em nada o seu atendimento no Hemocentro ou no Hospital de Clínicas da Unicamp.

Se você concordar em participar, leia com atenção o texto abaixo e assine as duas vias deste termo de consentimento. Uma cópia ficará com você.

Para participar da pesquisa será necessária a sua autorização para coletar 20 mL de sangue periférico ou sangue de medula óssea (4 colheres de chá). No caso da doação de sangue periférico, a coleta será feita pela enfermagem do Hemocentro, juntamente com a coleta dos exames necessários para a doação de sangue e não será necessária outra punção. Os riscos desta coleta são os mesmos de qualquer coleta de sangue para exames: a dor da picada da agulha e, às vezes, um hematoma (mancha roxa) no local da picada. No caso da coleta de medula óssea, a coleta será feita pelos médicos do Hemocentro, juntamente com a coleta da medula óssea para sua doação e não será necessária outra punção. Os riscos desta coleta são os mesmos de qualquer coleta de medula óssea, e a coleta dos 20 mL para o estudo não adiciona riscos para você.

As suas informações serão mantidas em sigilo pela pesquisadora e o sangue coletado será descartado (jogado fora) após os exames. Os seus dados serão usados apenas para esta pesquisa e quando o trabalho for publicado o seu nome e outras informações que possam te identificar não serão revelados.

Você não terá nenhuma vantagem em participar desta pesquisa e não receberá nenhum resultado de exame. Você estará nos ajudando a entender melhor a Síndrome Mielodisplásica e a Leucemia Mieloide Aguda.

Você pode desistir de participar da pesquisa a qualquer momento. Mesmo após ter coletado o sangue. Basta avisar os pesquisadores e os seus dados serão retirados do projeto.

Se você tiver alguma dúvida sobre a sua participação neste estudo você poderá ligar para a Renata Scopin Ribeiro (3521-8757), pesquisadora responsável pelo estudo, ou para a Dra Fabíola Traina (3521-8734), orientadora do estudo, ambas do Hemocentro. Qualquer reclamação sobre a pesquisa pode ser feita ao Comitê de Ética em Pesquisa da UNICAMP (Rua Tessália Vieira de Camargo, 126, Caixa Postal 6111 13083-887, Campinas – SP, fone 019 -3521 – 8936, fax 019- 3521- 7187, e-mail: cep@fcm.unicamp.br).

Consentimento de Participação:

Eu li/ouvi o conteúdo deste termo de consentimento e recebi as orientações necessárias e esclarecimentos das minhas dúvidas. Entendi o objetivo da pesquisa, os riscos que eu corro ao participar dela e o que terei que fazer para participar e minhas informações serem utilizadas. Com todas estas informações, aceito participar desta pesquisa.

Nome: _____

Idade: _____

HC: _____

() Concordo que o material coletado para essa pesquisa e armazenado no laboratório de Biologia Molecular do Hemocentro possa ser utilizado para outros estudos no futuro, desde que eles sejam antes aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Instituição.

() Desejo que o material coletado seja utilizado apenas para essa pesquisa, e que não seja utilizado para outras pesquisas futuras.

Data

Assinatura do paciente (ou responsável)

Data

Assinatura do pesquisador



HEMOCENTRO – UNICAMP



**TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE)
(Controles Sadios)**

Título da pesquisa: “Estudo de mutações, expressão e função de DNMT3A em síndromes mielodisplásicas e leucemias mieloides agudas.”

Pesquisadora responsável: Renata Scopim Ribeiro

Orientadora: Dra. Fabíola Traína

Objetivo da pesquisa: Investigar mutações, expressão gênica e protéica do DNMT3A e seu papel funcional em doenças mieloides como Síndrome Mielodisplásica e Leucemia Mieloide Aguda. Sabemos que algumas mutações genéticas ocorrem com maior frequência em pacientes com doença mielóide. Iremos estudar se DNMT3A pode estar envolvida no aparecimento dessas doenças, isso é importante na busca de novos tratamentos para os pacientes.

Mesmo você não tendo a doença, estamos pedindo a sua colaboração para a realização desta pesquisa. Usaremos os seus resultados como grupo controle sadio, para comparação com o grupo de pacientes. A sua participação não é obrigatória e caso você não queira participar isso não mudará em nada o seu atendimento no Hemocentro ou no Hospital de Clínicas da Unicamp.

Se você concordar em participar, leia com atenção o texto abaixo e assine as duas vias deste termo de consentimento. Uma cópia ficará com você.

Para participar da pesquisa será necessária a sua autorização para coletar 20 mL de sangue periférico ou sangue de medula óssea (4 colheres de chá). No caso da doação de sangue periférico, a coleta será feita pela enfermagem do Hemocentro, juntamente com a coleta dos exames necessários para a doação de sangue e não será necessária outra punção. Os riscos desta coleta são os mesmos de qualquer coleta de sangue para exames: a dor da picada da agulha e, às vezes, um hematoma (mancha roxa) no local da picada. No caso da coleta de medula óssea, a coleta será feita pelos médicos do Hemocentro, juntamente com a coleta da medula óssea para sua doação e não será necessária outra punção. Os riscos desta coleta são os mesmos de qualquer coleta de medula óssea, e a coleta dos 20 mL para o estudo não adiciona riscos para você.

As suas informações serão mantidas em sigilo pela pesquisadora e o sangue coletado será descartado (jogado fora) após os exames. Os seus dados serão usados apenas para esta pesquisa e quando o trabalho for publicado o seu nome e outras informações que possam te identificar não serão revelados.

Você não terá nenhuma vantagem em participar desta pesquisa e não receberá nenhum resultado de exame. Você estará nos ajudando a entender melhor a Síndrome Mielodisplásica e a Leucemia Mieloide Aguda.

Você pode desistir de participar da pesquisa a qualquer momento. Mesmo após ter coletado o sangue. Basta avisar os pesquisadores e os seus dados serão retirados do projeto.

Se você tiver alguma dúvida sobre a sua participação neste estudo você poderá ligar para a Renata Scopim Ribeiro (3521-8757), pesquisadora responsável pelo estudo, ou para a Dra Fabíola Traina (3521-8734), orientadora do estudo, ambas do Hemocentro. Qualquer reclamação sobre a pesquisa pode ser feita ao Comitê de Ética em Pesquisa da UNICAMP (Rua Tessália Vieira de Camargo, 126, Caixa Postal 6111 13083-887, Campinas – SP, fone 019 -3521 – 8936, fax 019- 3521- 7187, e-mail: cep@fcm.unicamp.br).

Consentimento de Participação:

Eu li/ouvi o conteúdo deste termo de consentimento e recebi as orientações necessárias e esclarecimentos das minhas dúvidas. Entendi o objetivo da pesquisa, os riscos que eu corro ao participar dela e o que terei que fazer para participar e minhas informações serem utilizadas. Com todas estas informações, aceito participar desta pesquisa.

Nome: _____

Idade: _____

() Concordo que o material coletado para essa pesquisa e armazenado no laboratório de Biologia Molecular do Hemocentro possa ser utilizado para outros estudos no futuro, desde que eles sejam antes aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Instituição.

() Desejo que o material coletado seja utilizado apenas para essa pesquisa, e que não seja utilizado para outras pesquisas futuras.

Data

Assinatura do paciente (ou responsável)

Data

Assinatura do pesquisador