Universidade De São Paulo
Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto

**“Mutações no gene *GATA2* em pacientes com
síndromes de falência medular”**

Gustavo Borges

Ribeirão Preto – SP
2016

Universidade De São Paulo
Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto

“Mutações no gene GATA2 em pacientes com síndromes de falência medular”

Gustavo Borges

Dissertação apresentada ao Programa de Oncologia Clínica, Células Tronco e Terapia Celular da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas – Diferenciação Celular Normal e Neoplásica.

Orientador: Prof^o. Dr. Rodrigo do Tocantins Calado De Saloma Rodrigues

Ribeirão Preto – SP
2016

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo ou pesquisa, desde que citada a fonte.

Borges, Gustavo

Mutações no gene *GATA2* em pacientes com síndromes de falência medular. Ribeirão Preto, 2016. 67f.

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP. Área de concentração: Oncologia Clínica, Células Tronco e Terapia Celular

Orientador: Rodrigues, Rodrigo do Tocantins Calado De Saloma

1. *GATA2*. 2. MonoMAC. 3. Falências medulares.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Gustavo Borges

**“Mutações no gene *GATA2* em pacientes com
síndromes de falência medular”**

Dissertação apresentada a **Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da**
Universidade de São Paulo, como parte das exigências para a
obtenção do título de Mestre em Ciências – Oncologia Clínica, Células Tronco e
Terapia Celular.

Área de Concentração: Diferenciação celular normal e neoplásica

Data da defesa:

Aprovado em:

BANCA EXAMINADORA

Prof.Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Apoio e Suporte Financeiro

Este trabalho foi realizado com o apoio financeiro das seguintes entidades e instituições:

- Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP (Processo nº 2014/26379-9 e processo nº 2013/08135-2);
- Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES;
- Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq;
- Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – FMRP/USP;

AGRADECIMENTOS

A meu orientador **Prof. Dr. Rodrigo do Tocantins Calado De Saloma Rodrigues**, que colaborou para meu crescimento profissional, dando total apoio e estrutura necessária para o desenvolvimento do trabalho.

À **Fundação de Apoio do Estado de São Paulo (FAPESP)** e ao **Conselho Nacional de Pesquisa (CNPq)** pela concessão da bolsa de Mestrado e apoio financeiro.

À **Fundação Hemocentro de Ribeirão Preto**, especialmente Dalva Tereza Catto, Adriana Maria Teles Fuzaro, Raquel Aparecida Botelho e Renata Aparecida Kurukava pela atenção e apoio prestados durante o mestrado.

Ao **Departamento de Clínica Médica** da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, pelo apoio prestado ao **Laboratório de Hematologia**, onde realizei meus experimentos.

Aos **Prof. Dr. Roberto Passeto Falcão, Prof. Dr. Eduardo Magalhães Rego e Prof. Dr. Fabíola Traina** pela disponibilização da estrutura física de seus laboratórios para a realização desse projeto.

Ao **Prof. Dr. Wilson Araújo da Silva Júnior** e à sua funcionária **Adriana Aparecida Marques**, pela colaboração com os experimentos de sequenciamento.

Aos meus **Pais**, que sempre estiveram ao meu lado. Obrigado por acreditarem em mim, me apoiarem e me incentivarem em todas as minhas decisões, ainda que seja o caminho mais difícil. Espero poder sempre orgulhar vocês, retribuindo tudo o que vocês fazem por mim.

Lara Elis Alberici Delsin, pelo carinho, dedicação, apoio e amor. Por me ajudar em todos os problemas que enfrentei, sejam eles científicos ou emocionais. Por me apoiar em todas as decisões e, mais que isso, me acompanhar. Obrigado!

Ao grupo do laboratório, **Fernanda Gutierrez, Raquel, Flávia, Florencia, Lilian, Natalia, Barbara, Rita, João Paulo, André, Leonardo, Pedro Padilha, Pedro Prata, Marcos, Diego, Renata, Jaqueline, Ana Paula, Fernanda Borges, Bruna, João Agostinho, Juan, Sílvia, Virgínia, Izabel, Larissa, Luciana, Aglair, Priscila, Ana Sílvia e Adriana** pela companhia, ensinamentos diários e muitas risadas.

“O que importa são os incontáveis pequenos atos de pessoas desconhecidas, que fundam as bases para os eventos significativos que se tornam história”

Howard Zinn

RESUMO

“Mutações no gene *GATA2* em pacientes com síndromes de falência medular”

Citopenia é um importante sinal de falência medular, sendo um achado comum de várias doenças, dentre as quais se destacam as mielodisplasias e a anemia aplástica. As mielodisplasias correspondem a um grupo de alterações hematopoéticas de natureza clonal, cuja principal característica é a hematopoese ineficaz, clinicamente manifesta como uma medula óssea celular, porém associada a citopenias. Já a anemia aplástica apresenta uma medula hipo ou acelular sem evidência de infiltração neoplásica, sendo substituída por tecido gorduroso. O gene *GATA2* é um fator regulador da hematopoese, atuando também na manutenção e proliferação do *pool* de células-tronco e progenitoras hematopoéticas. Recentemente, mutações constitucionais no gene *GATA2* foram descritas na síndrome de monocitopenia e infecção micobacteriana (MonoMac), que eventualmente cursa com outras citopenias, medula hipocelular ou mesmo mielodisplasia. Entretanto, a contribuição de mutações no gene *GATA2* para o desenvolvimento de anemia aplástica adquirida e síndrome mielodisplásica não é conhecida. Neste trabalho, propomos pesquisar mutações no gene *GATA2* em pacientes com anemia aplástica adquirida e síndrome mielodisplásica, por meio de sequenciamento direto do DNA. Adicionalmente, também avaliaremos as subpopulações linfocitárias no sangue periférico e níveis de citocinas plasmáticas no intuito de correlacionar a presença de mutação do *GATA2* a um perfil imunológico.

Palavras-chave: *GATA2*, MonoMAC, Falências medulares

ABSTRACT

“GATA2 gene mutation in patients with bone marrow failure syndromes”

Cytopenia is an important signal of marrow failure, being common to various diseases, among them myelodysplasia and aplastic anemia. Myelodysplasia is a group of hematopoietic clonal disorders, with inefficient hematopoiesis, cellular bone marrow with associated cytopenias. The aplastic anemia presents a hypo or even acellular bone marrow without any evidence of neoplastic infiltration with the stem cells being substituted by fat. The GATA2 gene is a key regulator of hematopoiesis, also acting on the maintenance and proliferation of stem and progenitor cells. Recently, constitutional mutations in the GATA2 gene were described in MonoMAC syndrome, which eventually presents cytopenias, hypocellular marrow or even myelodysplasia. However, the contribution of GATA2 mutations for the development of acquired aplastic anemia or myelodysplasia is not known. In this work we aim to search for GATA2 gene mutations in patients with acquired aplastic anemia and myelodysplasia through Sanger sequencing. Also, we will evaluate the levels of subpopulations of lymphocytes and the plasmatic levels of cytokines to establish a correlation between the presence of mutation in the GATA2 and a specific immune profile.

Keywords: GATA2, MonoMAC, bone marrow failure.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Diagrama de Venn das relações fisiopatológicas entre as síndromes de falência medular e leucemia mieloide aguda.....	23
Figura 2: Representação linear da estrutura do gene GATA2 com a localização das alterações encontradas.....	36
Figura 3: Mutação Y72X.....	38
Figura 4: Biópsia de medula óssea do indivíduo índice portador da mutação Y72X.....	39
Figura 5: Heredograma da família 1.....	40
Figura 6: Mutação N363I.....	41
Figura 7: Biópsia de medula óssea do indivíduo da mutação N363I.....	42
Figura 8: Comparação das contagens hematológicas ao diagnóstico.....	43
Figura 9: Comparação das sub-populações linfocitárias.....	44
Figura 10: Comparação dos níveis plasmáticos de citocinas.....	45

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Critérios de severidade da anemia aplástica (AA).....	20
Tabela 2: Sequência dos primers específicos e condições de ciclagem para amplificação do gene <i>GATA2</i>	29
Tabela 3: Sequência dos primers utilizados para o sequenciamento.....	31
Tabela 4: Painel para identificação das populações de linfócitos.....	32
Tabela 5: Frequência alélica das alterações identificadas no gene <i>GATA2</i>	37

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

AA	Anemia aplástica
ALIP	<i>Atypically Located Immature Precursors</i>
APC	Alofocianina
AREB	Anemia refratária com excesso de blastos
ARSA	Anemia refratária com sideroblastos em anel
CBA	<i>Cytometric bead array</i>
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa
CMV	Citomegalovirus
CRDML	Citopenia refrataria com displasia de múltiplas linhagens
CRDUL	Citopenia refrataria com displasia uni linhagem
CTH	Célula tronco hematopoética
DKC1	<i>Dyskerin pseudouridine synthase</i>
DNA	ácido desoxirribonucleico
EBV	<i>Epstein-Barr vírus</i>
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
FANC	<i>Fanconi anemia complementation group</i>
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
FMRP	Faculdade de Medicina de Riberião Preto
FoxP3	Proteína <i>Forkhead box P3</i>
GATA	<i>GATA binding protein</i>
HC	Hospital das Clínicas
HE	Hematoxilina Eosina
HEM	Ambulatório de Hematologia geral
HFM	Ambulatório de falências medulares
HLA	Ambulatório de leucemias agudas
HPN	Hemoglobinúria paroxística noturna
HPV	<i>Human Papiloma vírus</i>
IFN- γ	Interferon gamma
IgG	Imunoglobulina G
IL-2	Interleucina 2
IL-4	Interleucina 4
IL-6	Interleucina 6
IL-10	Interleucina 10
IL-17A	Interleucina 17A
LMA	Leucemia mieloide aguda
NK	Célula <i>natural killer</i>
PARN	<i>Poly(A)-specific ribonuclease</i>
PBS	Tampão salina fosfato
pb	Pares de base
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PE	Ficoeritrina
PerCP	Proteína piridina de clorofila

PU.1	<i>Spi-1 proto-oncogene</i>
RNA	Ácido ribonucleico
RTEL1	<i>Regulator of telomere elongation helicase 1</i>
RUNX1	<i>Runt-related transcription factor 1</i>
SCL	<i>TAL bHLH transcription factor 1</i>
SMD	Síndrome mielodisplásica
SNP	<i>Single nucleotide polymorphism</i>
TERC	<i>Telomerase RNA component</i>
TERT	<i>Telomerase reverse transcriptase</i>
TINF2	<i>TERF1 interacting nuclear factor 2</i>
TNF	<i>Tumour necrosis fator</i>
UFPR	Universidade Federal do Paraná
USP	Universidade de São Paulo

LISTA DE SÍMBOLOS

°C	Graus Celsius
<i>g</i>	Gravidade
kb	<i>Kilobase</i>
L	Litro
min	Minuto
mL	Mililitro
mM	Milimolar
pg	Picograma
rpm	Rotações por minuto
μL	Microlitro
μM	Micromolar
seg	Segundo
V	Volume
W	Peso

SUMÁRIO

1	Introdução.....	14
1.1.	Hematopoese.....	15
1.1.1.	Fator de transcrição <i>GATA2</i> e hematopoese.....	16
1.1.2.	Síndromes de falência medular.....	17
1.1.3.	Anemia aplástica (AA).....	17
1.1.4.	Síndrome mielodisplásica (SMD).....	19
1.2.	Deficiência do gene <i>GATA2</i>	21
2	Objetivos.....	23
2.1.	Objetivos Gerais.....	24
2.1.	Objetivos Específicos.....	24
3	Materiais e Métodos.....	25
3.1	Amostras de pacientes.....	26
3.2	Critérios de inclusão e exclusão.....	26
3.3	Extração de DNA e plasma do sangue periférico.....	26
3.4	PCR para sequenciamento do gene <i>GATA2</i>	27
3.5	Purificação dos amplicons.....	29
3.6	Sequenciamento direto pelo método de Sanger.....	29
3.7	Quantificação das populações de linfócitos e monócitos.....	31
3.8	Quantificação de citocinas.....	32
3.9	Separação de células CD3 ⁺ e CD3 ⁻ por microbeads.....	33
3.10	Análise estatística.....	33
4	Resultados.....	34
4.1	Sequenciamento do gene <i>GATA2</i> em pacientes com AA e SMD.....	35
4.1.1	Sequenciamento em pacientes com anemia aplástica adquirida.....	36
4.1.2	Sequenciamento em pacientes com síndrome mielodisplásica.....	39
4.2	Contagens hematológicas dos pacientes com mutação no gene <i>GATA2</i> , anemia aplástica e síndrome mielodisplásica.....	41
4.3	Quantificação de citocinas em pacientes com com mutação no gene <i>GATA2</i> , anemia aplástica e síndrome mielodisplásica.....	43
5	Discussão.....	45

6	Conclusão	50
7	Referências Bibliográficas	52
8	Apêndice	60
	8.1 Apêndice A.....	61
	8.2 Apêndice B.....	66
	8.3 Apêndice C.....	70
	8.4 Apêndice D.....	71
	8.5 Apêndice E.....	72
	8.6 Apêndice F.....	73
9	Anexo	74
	9.1 Anexo A.....	75

Introdução

1. Hematopoese

Hematopoese é a formação de vários tipos de células sanguíneas na medula óssea com funções especializadas. A formação do sangue é um processo contínuo ao longo da vida do indivíduo. Diariamente, bilhões de novas células hematopoiéticas são geradas para que ocorra a reposição das células sanguíneas mais antigas. A sustentabilidade da produção de novas células sanguíneas depende, necessariamente, de uma fonte primária conhecida como célula tronco hematopoética (CTH). A principal função das CTHs é a manutenção da homeostase sanguínea por meio da autoproliferação (geração de novas CTHs), gerando CTHs que permanecem em estado quiescente; e diferenciação para células maduras, um processo conhecido como comprometimento de linhagem. De maneira geral, as CTHs podem se diferenciar em duas linhagens distintas, mieloide e linfoide. A linhagem mieloide consiste de eritrócitos, plaquetas, monócitos, macrófagos e granulócitos. Já a linhagem linfoide compreende, principalmente, linfócitos T, B e *natural killers* (NK).

O desenvolvimento hematopoiético é um processo complexo que é finamente regulado por fatores intrínsecos (fatores de transcrição) e extrínsecos (citocinas e fatores de crescimento). A desregulação da hematopoese causada por fatores genéticos ou genotóxicos podem ocasionar desde citopenias (diminuição de um tipo celular sanguíneo) até condições mais severas como anemia aplástica, mieloma múltiplo, linfomas, e síndrome mielodisplásica/leucemia mieloide aguda (SMD/LMA).

Uma vez que o fenótipo das células diferenciadas é o reflexo dos genes ali expressos, uma alteração de natureza genética pode levar a uma falha no programa que leva ao desenvolvimento da hematopoese, podendo ocasionar doenças hematológicas. Sob esse ponto de vista, há um vasto campo de pesquisa envolvendo fatores de transcrição e seu impacto na fisiologia das CTHs, que inclui as proteínas SCL, RUNX1 e os membros da família GATA. A compreensão da etiologia e dos mecanismos genéticos que governam a hematopoese pode ajudar no combate a essas doenças e, também, na busca por novos alvos terapêuticos.

1.1.1. Fator de transcrição GATA2 e hematopoese

Em mamíferos, a família GATA é composta por seis membros, divididos em duas subfamílias de acordo com diferenças em seu perfil de expressão ao longo do desenvolvimento bem como sua estrutura. A expressão de *GATA1*, *GATA2* e *GATA3* são restritas, principalmente, às linhagens celulares de origem hematopoiética e neuronal (Orkin, 1995), enquanto *GATA4*, *GATA5* e *GATA6* são expressas, comumente, no coração e órgãos do sistema digestivo (Charron e Nemer, 1999; Molkentin, 2000)

Especificamente, o desenvolvimento da hematopoese é objeto de uma extensa e precisa regulação de *GATA1* e *GATA2* no nível molecular.

O gene *GATA2* se localiza no cromossomo 3, possui 13,75Kb de extensão e possui um papel essencial na regulação da transcrição de genes envolvidos no desenvolvimento e proliferação de células da linhagem hematopoiética (Yuasa *et al.*, 2005). Este gene possui 8 éxons, sendo que os dois primeiros codificam regiões não traduzidas que atuam de forma diferencialmente expressa de acordo com o tipo celular (Minegishi *et al.*, 1998; Pan *et al.*, 2000). O éxon mais proximal de *GATA2* é utilizado na maioria dos tecidos, enquanto o éxon mais distal regula a expressão gênica de *GATA2* especificamente em células hematopoéticas e neuronais (Minegishi *et al.*, 1998; Pan *et al.*, 2000). A proteína codificada por este gene possui dois dedos de zinco em sua estrutura, o que possibilita a ligação direta à sequencias específicas de DNA (localizadas na região promotora de genes-alvo), heterodimerização e, no caso do segundo dedos de zinco, interação com o fator de transcrição PU.1 (Crossley *et al.*, 1995; Zhang *et al.*, 1999).

A contribuição de *GATA2* é indispensável ao desenvolvimento da hematopoese definitiva (Nagai *et al.*, 1994; Labbaye *et al.*, 1995). Tem sido demonstrado, através de uma série de experimentos com cultivo celular, que a especificação da linhagem de células hematopoiéticas pode ser determinada ou modificada através da expressão artificial de fatores de transcrição específicos. A expressão de *GATA2*, por exemplo, em células precursoras eritroides promove a sua proliferação, enquanto bloqueia sua diferenciação (Briegel *et al.*, 1993; Heyworth *et al.*, 1999). Adicionalmente, Tsai e colaboradores demonstraram que o fator de transcrição *GATA2* é necessário para a manutenção do *pool* de células progenitoras, com destaque para as células da hematopoese definitiva (Tsai *et al.*,

1994). Sabe-se, também, da importância de GATA2 para a geração e manutenção do *pool* de células-tronco hematopoéticas (De Pater *et al.*, 2013; May *et al.*, 2013).

1.1.2. Síndromes de falência medular

As síndromes de falência medular correspondem a um conjunto de doenças nas quais há a insuficiência da medula óssea em produzir as células sanguíneas, podendo levar a uma diminuição de quaisquer tipos celulares (citopenias) ou mesmo de todas as três séries simultaneamente (pancitopenia).

A pancitopenia é um indicador de falência medular, sendo um achado comum a várias doenças hematológicas, dentre as quais se destacam as mielodisplasias e a anemia aplástica (Young e Maciejewski, 1997; Barrett *et al.*, 2000). As causas de pancitopenia são variadas, desde carenciais, como a deficiência de vitamina B12 (Simşek *et al.*, 2004; Stabler, 2013) até defeitos intrínsecos da célula-tronco hematopoética (Young, 2000). Após a exclusão de causas não-malignas, como a deficiência vitamínica, o diagnóstico diferencial das doenças relacionadas à falência medular segue com base na morfologia das células do sangue periférico e da medula óssea (Dezern e Sekeres, 2014).

As síndromes de falência medular podem ser constitucionais ou adquiridas (Young *et al.*, 2006). Dentre as causas constitucionais, é frequente a presença de anormalidades físicas, como baixa estatura e hipoplasia do rádio na anemia de Fanconi e distrofia ungueal e leucoplasia na disceratose congênita. Entretanto, nem sempre alterações físicas estão presentes ou mesmo podem surgir após o desenvolvimento da insuficiência da medula óssea. Além disso, algumas síndromes podem não ser reconhecidas até a idade adulta (Balaban *et al.*, 1985; Lipton *et al.*, 2006) e a maioria está associada a um aumento no risco de desenvolvimento de síndromes mielodisplásicas ou leucemia mielóide aguda.

1.1.3. Anemia aplástica (AA)

A anemia aplástica caracteriza-se por pancitopenia associada à medula óssea hipocelular e sem evidência de infiltração neoplásica ou fibrose. A medula óssea dos pacientes

com esta doença é intensamente hipocelular e ocorre a substituição por gordura (Takaku *et al.*, 2010). A anemia aplástica pode ser subdividida em dois tipos: constitucional e adquirida. É considerada constitucional quando existem alterações genéticas que são determinantes do desenvolvimento da doença, como, por exemplo, na anemia de Fanconi (mutações nos genes que codificam os grupos complemento FANC) (Duckworth-Rysiecki *et al.*, 1985) e a disceratose congênita (mutações nos genes da biologia dos telômeros, como *TERT*, *TERC*, *DKC1*, *TINF2*, *PARN* e *RTEL1*) (Dokal, 2011). Ela é considerada adquirida quando não há um fator genético preponderante para o estabelecimento da doença.

A anemia de Fanconi é uma doença autossômica recessiva rara, caracterizada por múltiplas anormalidades congênitas, falência medular e susceptibilidade ao câncer. A doença se instala por volta dos 8 anos de idade a idade média de sobrevivência é de 16 anos (D'andrea e Grompe, 1997). A disceratose congênita também é uma doença rara, caracterizada por uma tríade clássica de sinais clínicos (pigmentação reticulada da pele, distrofia ungueal e leucoplasia oral) que também cursa com falência medular (Dokal, 1996). Esta disfunção da medula ocorre em, aproximadamente, 50% dos casos e há, também, uma predisposição ao câncer (Drachtman e Alter, 1992).

Já a anemia aplástica adquirida é uma doença imunomediada, onde uma resposta imune aberrante provoca a expansão oligoclonal de células T citotóxicas que expressam e secretam *interferon gamma* (Sloand *et al.*, 2002). Essas células ativadas promovem o ataque às CTHs, levando ao seu esgotamento e ocasionando a falência medular. Desta forma, nota-se uma celularidade reduzida na medula óssea, e as células remanescentes apresentam um perfil de expressão apoptótico (Maciejewski *et al.*, 1995; Philpott *et al.*, 1995; Callera e Falcão, 1997). O transplante de medula óssea ou a terapia imunossupressora podem levar à uma reposta completa (cura) ou parcial por meio da erradicação/supressão das células T citotóxicas. A recaída ocorre caso haja a reativação da resposta imune, e o compartimento hematopoiético remanescente do estresse causado pela resposta imune permita a proliferação de clones aberrantes, podendo levar à manifestação de SMD e, ocasionalmente, LMA (Hoffbrand *et al.*, 2016).

A definição da severidade da doença é dada segundo os critérios estabelecidos por Camitta e colaboradores (Camitta *et al.*, 1975), como exposto na tabela 1. Estes critérios

permanecem úteis para a adoção da conduta clínica apropriada, porém não pode ser usado como critério preditivo para a resposta à terapia imunossupressiva.

Tabela 1 - Critérios de severidade da anemia aplástica (AA).

AA grave

Celularidade da medula <25%, ou 25-50% com <30% de CTHs residuais

Presença de pelo menos duas das três características seguintes:

Neutrófilos < $0,5 \times 10^9/L$

Plaquetas < $20 \times 10^9/L$

Reticulócitos < $20 \times 10^9/L$

AA muito grave

Mesmo critério para AA grave, porém com neutrófilos < $0,2 \times 10^9/L$

AA moderada

Pacientes que não se encaixam em nenhum dos critérios para AA grave ou muito grave

A contagem hematológica define, portanto, a severidade e os sintomas apresentados pelos pacientes. A anemia leva à fadiga, dispneia, e possivelmente sintomas cardíacos; plaquetopenia pode ocasionar sangramentos; e a neutropenia aumenta a susceptibilidade a infecções.

1.1.4. Síndrome mielodisplásica (SMD)

As síndromes mielodisplásicas correspondem a um grupo de doenças hematopoéticas de natureza clonal, caracterizada pela hematopoese ineficaz, aumento de apoptose e risco de evolução para uma leucemia mielóide aguda (Corey *et al.*, 2007). Também apresentam graus variados de insuficiência medular (com citopenias no sangue periférico), além de anormalidades cromossômicas (Greenberg *et al.*, 2012). Além disso, outra característica das mielodisplasias é a presença de atipias celulares nas três séries hematopoéticas, podendo ter aumento de células precursoras imaturas (Vardiman *et al.*, 2009). Em um terço dos casos, a medula óssea pode ser hipocelular (Tefferi e Vardiman, 2009;

Calado, 2011). Devido às alterações nos processos de proliferação, maturação e apoptose celulares, a hematopoese se torna ineficiente na produção das células do sangue.

A maior incidência de síndromes mielodisplásicas é encontrada em pessoas idosas ou previamente tratadas com quimioterapia. A incidência anual é por volta de quatro casos por cada 100 mil habitantes, podendo atingir 40-50 casos por cada 100 mil pessoas acima dos 70 anos de idade (Neukirchen *et al.*, 2011). Complementarmente, uma série de agentes genotóxicos podem ser etiológicos, sendo que os agentes alquilantes (McLaughlin *et al.*, 2005), a radioterapia (Cardis *et al.*, 2005; Iwanaga *et al.*, 2011) e os inibidores de topoisomerase II (Pedersen-Bjergaard *et al.*, 1991) são os maiores destaques.

A classificação das mielodisplasias, segundo Organização Mundial da Saúde, compreende sete grupos: citopenias refratárias com displasia de uma linhagem (CRDUL), anemia refrataria com sideroblastos em anel (ARSA), citopenia refratária com displasia multilinhagem (CRDML), anemia refrataria com excesso de blastos (AREB), síndrome mielodisplásica não classificada (MDS-U) e síndrome mielodisplásica associada com deleção 5q (del(5q)) isolada (Arber *et al.*, 2016). Essa classificação é baseada no número de linhagens com displasias, blastos, citopenias e cariótipo.

Histologicamente, a análise da medula permite uma melhor avaliação da celularidade, número, distribuição e morfologia dos megacariócitos, presença de fibrose e de nódulos linfóides ou focos de blastos. Pode-se encontrar, ainda, grupos de blastos mielóides com localização intertrabecular, sem associação com vasos ou trabéculas ósseas. Estes grupos são denominados de precursores imaturos com localização atípica (do inglês, *ALIP = Atypically Located Immature Precursors*). Pode, ainda, ocorrer o aumento difuso de blastos por toda a medula e, nestes casos, os limites de diferenciação entre uma síndrome mielodisplásica e uma leucemia mielóide aguda se tornam difíceis (Bennett e Orazi, 2009).

As síndromes mielodisplásicas estão associadas a uma grande variedade de alterações citogenéticas, sendo que a síndrome 5q, um subtipo de mielodisplasia, é uma das mais conhecidas e estudadas. Esta doença se origina da deleção de uma parte do braço longo do cromossomo 5 (del(5)(q31q33)) nas células-tronco hematopoéticas (Nilsson *et al.*, 2000; Tehranchi *et al.*, 2010) e pode levar à haploinsuficiência de um número variado de genes, dependendo da extensão da região deletada. Um cariótipo anormal é encontrado em cerca de 40-50% dos casos diagnosticados (Haase *et al.*, 2007; Schanz *et al.*, 2011). Os outros

achados citogenéticos mais comuns são perdas ou ganhos de cromossomos como, por exemplo, monossomia do cromossomo 7 e trissomia do cromossomo 8 (Haase *et al.*, 2007).

1.2. Deficiência do gene *GATA2*

Recentemente, mutações constitucionais no gene *GATA2* foram identificadas na síndrome MonoMac, uma doença que pode cursar com falência medular. Tais alterações resultaram na perda da função do fator de transcrição *GATA2*, que, como citado anteriormente, regula vários aspectos do desenvolvimento, desde a hematopoese definitiva até a formação linfática (Camargo *et al.*, 2013). A síndrome MonoMac é uma imunodeficiência cujo início ocorre na idade adulta, e é caracterizada por infecções disseminadas de micobactérias não-tuberculosas (tipicamente do complexo *Mycobacterium avium*), infecções fúngicas, infecções pelo papilomavirus humano (HPV) e proteinose alvéolo pulmonar (Vinh *et al.*, 2010). Além disso, esses pacientes apresentam anormalidades cromossômicas (como monossomia do 7 e trissomia do 8), possuem um número baixo de linfócitos NK e linfócitos B - motivo pelo qual leva à susceptibilidade a infecções – bem como um número baixo (e em alguns casos a completa ausência) de monócitos, e podem levar ao desenvolvimento de formas familiares de SMD e LMA (Vinh *et al.*, 2010; Bigley *et al.*, 2011). Até o momento, o único tratamento efetivo para esses pacientes é o transplante de medula óssea, que leva a uma recuperação completa das contagens hematológicas, resolvendo os problemas relacionados às citopenias apresentadas por esses pacientes (Cuellar-Rodriguez *et al.*, 2011; Grossman *et al.*, 2014).

Considerando as características clínicas apresentadas pelos pacientes com a deficiência do gene *GATA2*, nota-se que essa doença cursa com sintomas relacionados às síndromes de falências medulares. Nesse sentido, a sobreposição dos sintomas clínicos apresentados como citopenias progressivas, susceptibilidade a infecções, desenvolvimento de mielodisplasias e anormalidades citogenéticas, faz com que seja difícil a distinção dessas três doenças (figura 1). Nesse contexto, a distinção entre os pacientes com deficiência do *GATA2* daqueles com AA ou SMD se faz necessário para a escolha do tratamento apropriado a cada doença.

Figura 1. Diagrama de Venn das relações fisiopatológicas entre as síndromes de falência medular e leucemia mieloide aguda. As sobreposições mostram a dificuldade do reconhecimento do diagnóstico. Modificado de Young *et.al.*, 2006. LMA = leucemia mieloide aguda; SMD = síndrome mielodispásica; AA = anemia aplástica; HPN = hemoglobinúria paroxística noturna.

Objetivos

2. Objetivos gerais:

O objetivo principal do projeto foi investigar a presença de mutações constitucionais no gene que codifica o fator de transcrição GATA2 em pacientes com anemia aplástica e síndrome mielodisplásica, e correlacionar a presença dessas mutações a um perfil imunológico dos pacientes.

2.1. Objetivos específicos:

- ✓ Sequenciar o gene GATA2 em pacientes com AA (n=36) e SMD (n=33).
- ✓ Comparar as contagens hematológicas dos pacientes com mutação no gene GATA2 e nos pacientes com AA ou SMD.
- ✓ Quantificar os níveis plasmáticos das citocinas IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-17A, TNF, IFN- γ em pacientes com mutação no gene GATA2 e nos pacientes com AA ou SMD.

Materiais e

Métodos

3.1 Amostras de pacientes

As amostras de sangue periférico de pacientes com AA ou SMD foram coletadas nos ambulatórios de Leucemia Aguda (HLA), ambulatório de falência medular (HFM) e também no ambulatório de Hematologia Geral (AHGM) do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto. Todas as amostras foram obtidas após a assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido pelos pacientes ou seus responsáveis, aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (processo HC nº100/2015). Como controle foram utilizadas 92 amostras advindas de doadores de sangue voluntários do Hemocentro de Ribeirão Preto, aprovado pelo CEP do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (processo HC nº007262/2013).

3.2 Critérios de inclusão e exclusão Foram incluídos pacientes previamente diagnosticados com anemia aplástica adquirida ou síndrome mielodisplásica, provenientes dos ambulatórios de falência medular (HFM), de leucemias agudas (HLA), e do ambulatório de hematologia geral (HEM).

Foram excluídos do estudo aqueles pacientes com comprimento telomérico abaixo do décimo percentil já corrigido para a idade (para exclusão de uma possível telomeropatia) e/ou com clone HPN.

3.3 Extração de DNA e plasma do sangue periférico

Os tubos de sangue periférico foram centrifugados a 1.500 rpm por 10 minutos (centrífuga Beckman Coulter Allegra X-12R). Após a centrifugação obteve-se três fases distintas: uma superior (plasma), intermediária (*buffy coat*, que contém as células nucleadas), e uma fase inferior que contém os glóbulos vermelhos. Foram extraídas 4 alíquotas de 100 µL cada de plasma por paciente, e estas foram diretamente armazenadas a -80°C. O DNA genômico das células nucleadas sanguíneas das amostras coletadas foi extraído a partir do *buffy coat* de sangue periférico utilizando o kit Gentra Puregene Blood

(Qiagen). Foram utilizados 200 µL de buffy coat de cada amostra, acrescentou-se 900 µL de solução de lise de glóbulos vermelhos, sendo então encubadas por 10 minutos à temperatura ambiente. Após este período as amostras eram centrifugadas por 1 minuto a 12.000 rpm (centrífuga Eppendorf 5415D). O sobrenadante foi descartado, e posteriormente foram adicionados 600 µL de solução de lise de glóbulos brancos. O próximo passo foi a adição de 200 µL de solução de precipitação de proteínas em cada tubo, vortexou-se vigorosamente por 20 segundos e as amostras foram centrifugadas por 5 minutos a 2.000 rpm. Subsequentemente, o sobrenadante foi transferido para um tubo limpo no qual foram acrescentados 500 µL de isopropanol gelado para precipitação do DNA. Este passo foi seguido de uma centrifugação por 3 minutos a 12.000 rpm, descarte do sobrenadante, adição de 500 µL de etanol 70% gelado, e centrifugou-se por 1 minuto a 12.000 rpm. O sobrenadante foi descartado e o tubo foi deixado aberto para secagem do pellet por 10 minutos a temperatura ambiente. O passo seguinte foi a adição de 50 µL de solução de hidratação de DNA (Qiagen), e os tubos foram mantidos overnight na geladeira para hidratação do DNA. A quantificação ocorreu sempre na manhã seguinte à extração no aparelho NanoVue (GE Healthcare Life Sciences). Por fim, o material foi armazenado a -20°C até o momento do uso.

3.4 PCR para sequenciamento do gene GATA2

O *screening* genético para análise mutacional no gene GATA2 a partir das amostras de sangue periférico se iniciou com a realização da Reação em Cadeira da Polimerase (PCR) para as regiões a serem amplificadas do gene GATA2. O gene GATA2 (NG_029334.1 RefSeqGene) é composto por 8 éxons, os quais foram divididos em 7 reações diferentes. Adicionalmente, foi realizada também a amplificação de um fragmento da região intrônica entre os éxons 6 e 7, por esta conter uma região regulatória importante para a correta expressão do referido gene (Hsu *et al.*, 2013).

As reações foram realizadas utilizando dois kits diferentes, de acordo com o tamanho e composição do *amplicon* (produto originado da reação de PCR), sob diferentes condições de ciclagem. Para os fragmentos resultantes das amplificações dos éxons 1, 2, 3, 4, 5, 6 e a região intrônica do éxon 6 foi utilizado o kit da enzima Hot StarTaq (Qiagen).

Para a amplificação utilizando este kit foi necessária a adição, por reação, de 1 µL de *primers* específicos (0,5 µL de cada) [10mM], 2 µL de dNTPs [1,25 mM cada], 0,2 µL da enzima Hot StarTaq DNA polimerase [5U/ µL], 5 µL de Q solution [5X], 2,5 µL de PCR Buffer [10X], 12,3 µL de água nuclease-free, e 2 µL de DNA genômico [50 ng/µL], tendo como volume final uma reação de 25 µL/ amostra. Para gerar o amplicon único que corresponde à amplificação dos éxons 7 e 8 foi utilizado o kit da enzima Taq Platinum (Invitrogen). Foram necessários 1 µL de *primers* específicos (0,5 µL de cada) [10mM], 2 µL de dNTPs [1,25 cada], 0,2 µL da enzima Taq Platinum DNA polimerase [5U/µL], 1 µL de MgSO₄ [50mM], 5 µL de PCR Enhancer [10X], 2,5 µL de PCR Buffer [10X] e 11,3 µL de água *nuclease-free*. A sequência dos *primers* utilizados bem como as condições de ciclagem se encontram na tabela 2.

Tabela 2. Sequência dos *primers* específicos e condições de ciclagem para amplificação do gene *GATA2*. pb= pares de base. T.P.* = Enzima Taq Platinum + *Enhancer system* (Invitrogen). H.S.** = Enzima HotStarTaq (Qiagen).

Região	Primer	Sequência dos <i>primers</i> 5' → 3'	Tamanho do fragmento (pb)	Kit para PCR	Condições da reação de PCR
Éxon 1	GATA2-F1	GTGAGCGCCAGGAAGGTA	378	H.S.**	95°C 15min + 35x (95°C 30seg; 55°C 40seg; 72°C 25seg) + 72°C 5min + 4°C ∞
	GATA2-R1	AAACGGACCAAGCGATTC			
Éxon 2	GATA2-F2	GCGTCTCCCTCCAGCTG	458	H.S.**	95°C 15min + 35x (95°C 30seg; 55°C 40seg; 72°C 30seg) + 72°C 5min + 4°C ∞
	GATA2-R2	CTAGCAGTAACTAACCACCAACT			
Éxon 3	GATA2-F3	ACGCAGCCAATGGGAGG	443	H.S.**	95°C 15min + 35x (95°C 30seg; 58°C 40seg; 72°C 30seg) + 72°C 5min + 4°C ∞
	GATA2-R3	CAATCAGGACCTCTCAACAAAG			
Éxon 4	GATA2-F4	CACCTCGTGGTGGGACTT	425	H.S.**	95°C 15min + 35x (95°C 30seg; 55°C 40seg; 72°C 30seg) + 72°C 5min + 4°C ∞
	GATA2-R4	GAAGCAAGCAGACGGGC			
Éxon 5	GATA2-F5	TCGTGATCTCAATGTCTGTCAG	820	H.S.**	95°C 15min + 35x (95°C 30seg; 55°C 40seg; 72°C 50seg) 72°C 5min + 4°C ∞
	GATA2-R5	AACACTGCCACCTCTCCC			
Éxon 6	GATA2-F6	GGCTGGCTGCTTTCCTG	321	H.S.**	95°C 15min + 35x (95°C 30seg; 55°C 40seg; 72°C 20seg) + 72°C 5min + 4°C ∞
	GATA2-R6	GCGTCTGCATTGAAGGA			
Éxon 7 e 8	GATA2-F7	GATTTAGCCCTCCTTGACTG	1.138	T.P.*	95°C 3min + 35x (95°C 30seg; 54°C 40seg; 72°C 1min25seg) + 72°C 5min + 4°C ∞
	GATA2-R8	GGCTGGCAGGAGTGGTGT			
Íntron 6	GATA2-F-i6	AACACAACTCACACCGGCC	327	H.S.**	95°C 15min + 35x (95°C 30seg; 55°C 40seg; 72°C 20seg) + 72°C 5min + 4°C ∞
	GATA2-R-i6	CTCATAAATCACTTCGCCCTG			

Ao final das reações, os *amplicons* foram submetidos a eletroforese em gel de agarose 1,5% w/v para verificação da qualidade e especificidade das bandas de DNA. Os produtos gerados de boa qualidade foram armazenados a -20°C até o momento da realização de sua purificação.

3.5 Purificação dos amplicons

A purificação dos produtos de PCR foi feita através da utilização do sistema de purificação QIAquick 96 PCR Purification (Qiagen). Foram adicionados 75 µL do buffer PM a cada amostra, quando então elas foram aplicadas nas placas QIAquick (Qiagen). Uma bomba de vácuo foi ligada ao sistema de modo que as amostras passaram por entre as membranas contidas em seu respectivo poço, e o DNA fosse aderido a elas. Após todo o líquido ter passado pelas membranas foram adicionados 900 µL do buffer PE em cada poço para a retirada de possíveis contaminantes e, novamente, a bomba de vácuo foi ligada. Após toda a passagem do buffer PE a bomba de vácuo foi ligada novamente e mantida por um período de 10 minutos, para secar toda a membrana. Este passo é necessário para a completa remoção do buffer PE. Após este passo, a placa foi retirada e colocada sob papel absorvente, para a remoção de gotas remanescentes. Para a eluição das amostras, foram adicionadas 60 µL do buffer EB (10mM Tris Cl, pH 8,5) no centro de cada poço, e manteve-se incubado por 1 minuto a temperatura ambiente. Após esse período, a bomba de vácuo foi ligada por 5 minutos. As amostras então foram armazenadas a -20°C até o momento da realização do sequenciamento.

3.6 Sequenciamento direto pelo método de Sanger

Para a realização do sequenciamento do gene *GATA2* utilizou-se o kit *ABI PRISM BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Ready Reaction* (Applied Biosystems). A reação continha 2 µL do produto de PCR purificado, 1 µL de *BigDye Terminator v3.1*, 2 µL de *Sequencing Buffer* [5X], 1 µL de *primer* específico [2,5mM] e 4 µL de água *nuclease-free*, o que corresponde ao total de 10 µL/amostra. As condições da reação do sequenciamento foram: desnaturação inicial a 95 °C por 1 minuto, seguida de 25 ciclos a 95 °C por 10

segundos, 51 °C por 5 segundos e 60 °C por 4 minutos. As sequências dos *primers* utilizados para o sequenciamento estão na tabela 3. As reações foram, então, lidas no aparelho ABI 3500XL (Applied Biosystems), pertencente ao Laboratório de Genética e Biologia Molecular do Hemocentro de Ribeirão Preto, coordenado pelo Prof. Dr. Wilson Araújo Silva Júnior. As análises dos resultados obtidos foram feitas utilizando o software Sequencher 5.1 (Genes Codes).

Tabela 3. Sequência dos *primers* utilizados para o sequenciamento.

Região	Primer	Sequência dos <i>primers</i> 5' → 3'
Éxon 1	GATA2-F1	GTGAGCGCCAGGAAGGTA
	GATA2-R1	AAACGGACCAAGCGATTC
Éxon 2	GATA2-F2	GCGTCTCCCTCCAGCTG
	GATA2-R2	CTAGCAGTAACTAACCACCAACT
Éxon 3	GATA2-F3	ACGCAGCCAATGGGAGG
	GATA2-R3	CAATCAGGACCTCTCAACAAAG
Éxon 4	GATA2-F4	CACCTCGTGGTGGGACTT
	GATA2-R4	GAAGCAAGCAGACGGGC
Éxon 5	GATA2-F5	TCGTGATCTCAATGTCTGTCTAG
	GATA2-R5	AACACTGCCACCTCTCCC
	GATA2-F5-2seq	CCACTCTGGCTCCCACCT
	GATA2-R5-2seq	GCTCTCCGTCAGTGACACC
Éxon 6	GATA2-F6	GGCTGGCTGCTTTCCTG
	GATA2-R6	GCGTCTGCATTTGAAGGA
Éxon 7	GATA2-F7	GATTTAGCCCTCCTTGACTG
	GATA2-R7	TGGATATTGTGGCTGGGG
Éxon 8	GATA2-F8	AGCTTGACCTGCCTCTGG
	GATA2-R8	GGCTGGCAGGAGTGGTGT
Íntron 6	GATA2-F-i6	AACACAAACTCACACCGGCC
	GATA2-R-i6	CTCATAAATCACTTCGCCCTG

3.7 Quantificação das populações de linfócitos e monócitos

Para a quantificação das subpopulações linfocíticas foram utilizados anticorpos monoclonais (BD Bioscience) conjugados a fluorocromos (APC, FITC, PE ou PercP). O painel utilizado para a identificação das populações celulares se encontra na tabela 4.

Tabela 4. Painel para identificação das populações de linfócitos.

População de linfócitos	Marcadores
T CD4	CD3 ⁺ CD4 ⁺
T CD8	CD3 ⁺ CD8 ⁺
Treg	CD4 ⁺ CD25 ⁺ FoxP3 ⁺
NK	CD3 ⁻ CD16 ⁺ CD56 ⁺
B	CD3 ⁻ CD19 ⁺

Para a realização da marcação foi necessária uma quantidade inicial de aproximadamente 500 mil leucócitos (em variados volumes de sangue total fresco, dependendo da quantidade revelada pelo hemograma realizado no dia). O primeiro passo consistia na utilização de 5 µL de cada anticorpo para os respectivos marcadores de membrana, e então os tubos foram mantidos por 10 minutos a temperatura ambiente e no escuro. Foi adicionado 1 mL de solução de lise de hemácias (BD Biosciences) em cada tubo, vortexados, e mantidos em geladeira por 10 minutos. As amostras foram centrifugadas por 5 minutos a 2.000 rpm (centrífuga Beckman Coulter Allegra X-12R). O sobrenadante era descartado, e o pellet ressuspensionado no líquido residual. Os tubos então eram lavados duas vezes com solução de PBS [1X] e novamente centrifugados. Os tubos marcados para os linfócitos T CD4 e T CD8, B, NK e monócitos eram então fixados com 300 µL de PBS/Formol 1% e armazenados na geladeira até o momento da leitura no citômetro de fluxo FACSCalibur (BD Bioscience). Os tubos que necessitavam da marcação com o anticorpo FoxP3 eram então separados e realizava-se a permeabilização celular, uma vez que o FoxP3 é um marcador intracelular. Para a permeabilização utilizava-se 2mL do buffer A FoxP3 [1X] aos tubos, que eram encubados por 10 minutos no escuro e a temperatura ambiente. Os tubos então eram centrifugados, e o sobrenadante era retirado com o auxílio de uma pipeta, uma vez que o pellet fica “boiando” na solução. Os tubos eram lavados com PBS [1X] e novamente centrifugados. O sobrenadante era descartado, o pellet era

ressuspenso no buffer residual e adicionavam-se 500 μ L do buffer C FoxP3 [1X]. Os tubos eram levemente vortexados e encubados por 30 minutos a temperatura ambiente e no escuro. Realizavam-se duas lavagens com PBS [1X] e centrifugavam-se os tubos. Após esse passo, eram adicionados 5 μ L do anticorpo FoxP3 aos tubos para a identificação das células T regulatórias (Treg). Os tubos eram encubados por 30 minutos a temperatura ambiente e no escuro. Novamente eram realizadas duas lavagens com PBS [1X], centrifugava-se, e então eram adicionados 300 μ L de solução de PBS/Formol 1% para a fixação das células. Os tubos eram armazenados na geladeira até o momento da leitura no citômetro de fluxo supracitado. Para chegar ao número final de cada tipo celular, foi encontrada a porcentagem das células desejadas (resultante da análise da citometria de fluxo) e multiplicou-se pelo número de linfócitos apresentados pelo paciente no hemograma realizado na data da coleta correspondente. Por exemplo, um paciente que apresenta 1000 linfócitos/ μ L no hemograma da data da coleta, e porcentagem de 20% de linfócitos CD4 na análise de citometria de fluxo, apresenta uma quantidade de 200 linfócitos CD4/ μ L de sangue total.

3.8 Quantificação de citocinas

Para realizar a quantificação das citocinas supracitadas utilizou-se o método *cytometric bead array* (CBA) *Human Th1, Th2, Th17 Cytokine kit* (BD Biosciences, #560484). Foi realizada uma mistura com 70 μ L de beads de captura por amostra de plasma analisada (sendo 10 μ L de cada uma das *beads*, A1 – A7, específicas para cada citocina). Após a mistura, realizou-se uma centrifugação a 200 *g*, por 5 minutos (centrífuga Beckman Coulter Allegra X-12R). O sobrenadante foi descartado e as *beads* foram ressuspensas em igual volume de *Serum Enhancement Buffer* (BD Biosciences). Essa mistura foi encubada por 30 minutos à temperatura ambiente e no escuro. Após esse período, a mistura foi vortexada e dispensou-se 50 μ L da mistura das *beads* em cada um dos tubos a serem analisados. Em seguida, 50 μ L de plasma foram adicionados e os tubos foram encubados por 3 horas à temperatura ambiente e no escuro. Após a encubação cada tubo foi lavado com 1 mL de solução PBS [1X] e centrifugado a 200 *g* por 5 minutos. O sobrenadante foi

descartado e o pellet foi ressuspenso em 300 μ L de PBS [1X] e armazenado até o momento da leitura.

3.9 Separação de células CD3⁺ e CD3⁻ por microbeads

A amostra de sangue foi lisada com solução de NH_4Cl + KHCO_3 por 10 minutos em gelo. Após esse período, a amostra foi centrifugada a 2000 rpm por 5 minutos. Foi descartado o sobrenadante e o pellet de células foi ressuspenso no *buffer* (PBS + BSA 0,5% + 2mM EDTA) do *kit microbeads CD3* em um tubo de citometria. Após, acrescentou-se 20 μ L de *microbeads CD3* para cada 10^7 células totais, vortexou-se brevemente, e então a amostra foi encubada na geladeira por 15 minutos. Depois do período de encubação, as células foram lavadas com 2 mL de *buffer* e centrifugadas como anteriormente. O sobrenadante foi descartado e as células foram ressuspensas em 500 μ L de *buffer*. O próximo passo consistiu na aplicação dessa suspensão em uma coluna magnética. Ao fim deste passo, as células não marcadas (portanto, CD3⁻) passam pela coluna e caem em um tubo devidamente marcado. Lavou-se essa coluna três vezes com 500 μ L do *buffer* para a completa remoção das células CD3⁻ da coluna magnética. A coluna foi então retirada do suporte magnético e um tubo para a coleta das células CD3⁺ foi acoplado. Foram adicionados 500 μ L de *buffer* e, com o auxílio de um embolo, foram retiradas as células CD3⁺ que antes estavam presas à coluna devido ao campo magnético.

3.10 Análise estatística

As diferenças na frequência cumulativa de mutações entre pacientes e indivíduos saudáveis foram avaliadas utilizando-se do teste *qui-quadrado*. As diferenças nas contagens hematológicas foram analisadas utilizando-se de testes não paramétricos para comparar diferentes grupos (teste de Mann-Whitney). Um valor $p < 0,05$ foi considerado como estatisticamente significativo. A análise estatística foi feita utilizando o software GraphPad Prism (GraphPad Software).

Resultados

4.1 Sequenciamento do gene GATA2 em pacientes com AA, SMD e SMD pediátricos

A mediana de idade dos pacientes com AA é de 31 anos de idade (17 – 84). No total, foram incluídos 15 pacientes diagnosticados com anemia aplástica moderada, 20 com anemia aplástica grave, e 1 caso de um paciente com leucemia mieloide aguda secundária à anemia aplástica. A mediana de idade dos pacientes com SMD é de 68 anos de idade (30 – 86). Deste total, 19 apresentavam CRDML, 6 apresentavam AREB, 3 apresentavam CRDUL, 2 apresentavam ARSA, 1 apresentava anemia refratária e 1 paciente com LMA secundária à SMD.

Ao todo foram encontradas 11 diferentes alterações no gene GATA2, sendo 4 delas na região 5' UTR. As outras 7 alterações encontradas foram em regiões codificadoras (éxons), das quais são 3 mutações silenciosas, 3 *missense*, e 1 *nonsense*. A figura 2 mostra a distribuição das alterações ao longo do gene. A frequência alélica das alterações identificadas se encontra na tabela 5.

Figura 2. Representação linear da estrutura do gene GATA2 com a localização das alterações encontradas. Os polígonos pretos representam os éxons do referido gene, enquanto em vermelho têm-se a representação da região efetivamente traduzida em proteína.

Tabela 5. Frequência alélica das alterações identificadas no gene GATA2. As alterações iniciadas com “rs” correspondem aos SNPs localizados na região 5’ UTR. AA corresponde ao grupo de pacientes com anemia aplástica adquirida. SMD corresponde ao grupo de pacientes com síndrome mielodisplásica.

Alterações	Controle n=92	AA n=36	SMD n=33
rs73862208	-	0,03	-
rs2335237	0,69	0,60	0,70
rs1806462	0,41	0,36	0,30
rs7611275	0,01	0,04	0,03
P5P	0,71	0,66	0,74
Y72X	-	0,01	-
A164T	0,20	0,13	0,20
T188T	0,01	0,04	-
P250A	-	0,01	-
N363I	-	-	0,01
A411A	0,04	-	0,04

4.1.1 Sequenciamento em pacientes com anemia aplástica adquirida

Foram encontradas 9 diferentes alterações dentro do grupo de pacientes com AA, são elas: rs73862208, rs2335237, rs1806462, rs7611275, P5P, Y72X, A164T, T188T, e P250A. As quatro primeiras se encontram dentro da região 5’ UTR, enquanto as outras cinco se encontram dentro de regiões exônicas. Dentre as alterações encontradas, sete delas não possuem diferença significativa em comparação com o grupo controle, são elas: rs2335237, rs1806462, rs7611275, P5P, A164T, T188T, e P250A.

A alteração rs73862208, por outro lado, foi encontrada em 2 pacientes, ambas em heterozigose. Tal SNP não foi encontrado em nenhum dos 92 controles, sendo esta, portanto uma alteração exclusiva aos pacientes com AA. Segundo a base de dados 1000 Genomes (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/variation/tools/1000genomes>), a frequência dessa alteração é de 0,009, valor menor que o encontrado em nossa coorte.

A alteração Y72X (figura 3) foi encontrada em heterozigose e em apenas um dos pacientes. Nenhum dos 92 indivíduos controle apresentavam tal mutação. Todavia,

essa alteração promove a substituição do aminoácido Tirosina por um *stop codon*, levando a uma interrupção prematura na tradução da proteína e com potencial perda da estrutura/função proteica. Com a finalidade de identificarmos uma possível origem germinativa para esta mutação, foi realizado o sequenciamento dos pais e do irmão do indivíduo índice, confirmando, desta forma, que a presença de tal mutação segrega juntamente com a doença. Apenas o irmão, possui a mesma alteração. As informações relativas a essa família serão detalhadas mais abaixo.

Figura 3. Mutação Y72X. Na imagem superior tem-se o eletroferograma da sequência referência de um dos indivíduos controle. Na imagem inferior tem-se o eletroferograma do paciente índice, portador da mutação Y72X, onde o códon que codifica uma Tirosina (TAC) é substituído por um *stop codon* (TAA).

O paciente portador da mutação Y72X, doravante identificado pela sigla “GATA2-1”, era um indivíduo do sexo masculino, falecido em 2012 aos 26 anos de idade, com diagnóstico de anemia aplástica/SMD, histórico de infecções recorrentes por bactérias gram-negativas, bem como uma acentuada monocitopenia desde a primeira consulta, baixos níveis de IgG2 e IgG4, positivo para infecção por CMV, EBV e Herpes Simplex do tipo I, além de episódios de psoríase. Uma biópsia de medula prévia exibia um perfil celular heterogêneo e com focos de células indiferenciadas próximas à trabécula óssea (figura 4).

Figura 4. Biópsia de medula óssea do indivíduo índice portador da mutação Y72X. (A) Arquitetura do fragmento medular, demonstrando hipocelularidade (coloração HE, 200X). (B) Focos de células imaturas de localização atípica (coloração HE, 400X).

Na mutação Y72X o aminoácido Tirosina deixa de ser codificado e dá lugar a um *stop codon*. Tal mutação teve sua patogenicidade confirmada funcionalmente, uma vez que tal mutação segrega juntamente com o fenótipo de falência medular, já que o irmão (identificado como GATA2-2) do indivíduo índice apresenta a mesma mutação e com determinadas citopenias. O sequenciamento dos pais mostrou que nenhum dos dois apresentam a mesma mutação que os filhos. Contudo, o pai possui um nucleotídeo alterado na sequência de DNA na mesma posição que os filhos. Essa alteração, porém, não resulta na troca de aminoácidos e tampouco em um *stop codon*. O heredograma dessa família se encontra na figura 5, abaixo.

Figura 5. Heredograma da família 1. A seta azul indica o indivíduo índice. Em preto, têm-se os portadores da mutação Y72X.

4.1.2 Sequenciamento em pacientes com síndrome mielodisplásica

Foram encontradas 7 diferentes alterações dentro do grupo de pacientes com SMD, são elas: rs2335237, rs1806462, rs7611275, P5P, A164T, N363I, e A411A. As três primeiras se encontram dentro da região 5' UTR, enquanto as outras quatro se encontram dentro de regiões exônicas. Dentre as alterações encontradas, cinco delas não possuem diferença significativa em comparação com o grupo controle, são elas: rs2335237, rs7611275, P5P, A164T, e A411A.

Apesar de também ter sido encontrada a alteração rs1806462 no grupo de pacientes com AA, esta alteração possui uma frequência significativamente menor no grupo dos pacientes com SMD do que no grupo saudável ($p < 0,005$).

A alteração N363I (figura 6) foi encontrada apenas em um paciente do grupo SMD e em nenhum dos indivíduos controle. Tal mutação não é descrita, e promove a substituição do aminoácido Asparagina por uma Isoleucina, na posição 363. A análise pelo software CADD (<http://cadd.gs.washington.edu/>) considera tal alteração como patogênica resulta na perda da estrutura/função da proteína em questão. Este aminoácido se localiza em uma região conservada na estrutura proteica, sendo um dos aminoácidos que compõem o segundo dedo de zinco, estrutura responsável por permitir a interação

proteína:DNA. Desta forma, uma mutação nessa posição pode acarretar em uma eventual perda de função proteica. Com o intuito de verificar a natureza constitutiva dessa mutação, foi realizado o sequenciamento de duas populações distintas de células. Por meio da utilização de colunas eletromagnéticas realizou-se a separação de células mieloides ($CD3^-$) e linfoides ($CD3^+$), as quais foram sequenciadas. Foi observada a presença da mutação N363I em ambas as populações, fazendo com que tal mutação seja considerada constitutiva na paciente em questão.

Figura 6. Mutação N363I. Na imagem superior tem-se o eletroferograma da sequência referência de um dos indivíduos controle. Na imagem inferior tem-se o eletroferograma do paciente portador da mutação N363I, onde o códon que codifica uma Asparagina (AAC) é substituído por uma Isoleucina (ATC).

A paciente portadora desta mutação, identificada como “GATA2-3”, é uma mulher, atualmente aos 74 anos de idade, diagnosticada previamente com SMD hipoplásica. Apresentava uma biópsia hipocelular para a idade, e com celularidade heterogênea (figura 7), com histórico de infecções bacterianas recorrentes, e apresentando cariótipo complexo (XX, +1, der (1;7)(q10;p10)[16]/49, idem, +X, +8 [4]).

Figura 7. Biópsia de medula óssea do indivíduo da mutação N363I. (A) Arquitetura do fragmento medular (HE, 200X). (B) Focos de células imaturas de localização atípica (HE, 400X)

4.2 Contagens hematológicas dos pacientes com mutação no gene *GATA2*, anemia aplástica e síndrome mielodisplásica

Para fins de comparação das contagens hematológicas entre os grupos, foram utilizados os valores referentes a quatro indivíduos *GATA2*-mutados: o indivíduo índice e seu irmão, portadores da mutação Y72X; a portadora da mutação N363I; e uma quarta paciente, atendida sob os cuidados do Dr. Lisandro Ribeiro (HC-UFPR), portadora da mutação R362X (o aminoácido Arginina dá lugar a um *stop codon*), cuja identificação ocorreu em nosso serviço. As contagens hematológicas foram comparadas levando em consideração os valores utilizados ao diagnóstico de cada paciente. As contagens mostram que não há diferenças entre os três grupos (*GATA2*-mutados, AA e SMD) para os seguintes critérios: idade ao diagnóstico, glóbulos vermelhos, hemoglobina, glóbulos brancos, neutrófilos, e linfócitos totais. Quando comparados os níveis de monócitos, porém, evidencia-se uma abrupta diminuição desta população celular nos indivíduos *GATA2*-mutados em relação aos grupos AA e SMD ($p=0,0023$ para ambos os grupos). Também, pacientes com deficiência do *GATA2* apresentam níveis significativamente maiores de plaquetas quando comparados com o grupo de indivíduos com AA ($p<0,0060$). Os gráficos das comparações hematológicas se encontram na figura 8, abaixo.

Figura 8. Comparação das contagens hematológicas ao diagnóstico. A comparação foi realizada utilizando o teste não paramétrico de Mann-Whitney. A significância estatística está identificada pelo * na figura, e foi considerada quando $p < 0,05$.

Apesar de não ser notada diferença no número de linfócitos totais entre os grupos, realizamos a imunofenotipagem para a avaliação das subpopulações linfocitárias. Porém, o número amostral de cada grupo foi reduzido, uma vez que o indivíduo índice portador da mutação Y72X faleceu em 2012 e não havia amostras celulares disponíveis. A análise imunofenotípica também foi realizada em um número menor de pacientes com AA e SMD, já que muitos dos pacientes encontravam-se em tratamento imunossupressor ou quimioterapia, o que poderia mascarar os resultados. A imunofenotipagem realizada incluiu 3 pacientes com mutação no gene *GATA2*, 22 com AA, e 7 com SMD.

Como mostra a figura 9, não há diferença entre os níveis de linfócitos T CD4, T CD8, Treg e células NK. Ao se comparar os níveis de linfócitos B, entretanto, nota-se uma

significativa redução nos indivíduos mutados em relação aos pacientes com AA ou SMD ($p=0,0172$ e $p=0,0333$, respectivamente).

Figura 9. Comparação das sub-populações linfocitárias. Para a identificação de cada população linfocitária utilizou-se os anticorpos mencionados na tabela 2. A significância estatística está identificada pelo * na figura, e foi considerada quando $p < 0,05$.

4.3 Quantificação de citocinas em pacientes com com mutação no gene *GATA2*, anemia aplástica e síndrome mielodisplásica

A quantificação das citocinas IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-17A, IFN- γ e TNF foi realizada como descrito na seção de materiais e métodos. Os valores encontrados foram, para quase todos os pacientes, nulos para todas as citocinas quantificadas. Por conseguinte, não há diferença nos níveis plasmáticos das citocinas analisadas (figura 10).

Figura 10. 1. A quantificação das citocinas analisadas foi realizada pelo método CBA. Apesar de alguns indivíduos exibirem níveis altos de algumas citocinas, não há diferença estatística entre os grupos.

Discussão

Dentro da nossa coorte foram encontrados dois pacientes portadores de mutações patogênicas no gene *GATA2*, ambas constitutivas e em heterozigose. A taxa de mutações patogênicas encontradas em indivíduos com AA ou SMD foi de aproximadamente 3% para ambas as doenças (1/36 para AA, e 1/33 para SMD). As frequências encontradas em nossa coorte se aproximam com os dados já publicados para AA, onde numa coorte de 99 pacientes com AA foram encontrados 5 pacientes mutados (Townesley *et al.*, 2012). Por outro lado, os dados referentes à prevalência de mutações no gene *GATA2* em pacientes adultos com SMD são incipientes, não sendo ainda consenso na área.

Foi demonstrado que a mutação Y72X segrega juntamente com o fenótipo de falência medular, como evidenciado pelo baixo número de monócitos, linfócitos B e NK exibidos pelo irmão do indivíduo índice. Devido à característica da mutação encontrada, acreditamos que o fenótipo dos pacientes é ocasionado pelo mecanismo de haploinsuficiência. Vários casos de haploinsuficiência já foram descritos para o gene *GATA2* (Hsu *et al.*, 2011; Camargo *et al.*, 2013; Hsu *et al.*, 2013; Spinner *et al.*, 2014; Cortés-Lavaud *et al.*, 2015), o que corrobora nossa hipótese para este caso.

A mutação Y72X, ainda, nos permite refazer o diagnóstico do paciente índice, já que a união do *status* mutacional com os sintomas clínicos apresentados por ele (infecções recorrentes, monocitopenia, baixos níveis de imunoglobulinas, e infecção por Herpes simplex tipo I) é compatível com a síndrome MonoMAC (Hsu *et al.*, 2011), ainda que não tenhamos informações referentes à quantidade de linfócitos B e células NK. O irmão do indivíduo índice, ao contrário, não possui a síndrome MonoMAC, já que não possui registro de infecções virais (como EBV, HPV e/ou Herpes simplex) ou por micobactérias atípicas. Desta forma, sua doença acaba sendo então classificada apenas como uma “deficiência do *GATA2*”, quadro que é compatível com seu *status* mutacional e os sintomas clínicos apresentados até o momento (Spinner *et al.*, 2014).

A deficiência do gene *GATA2* se mostra uma doença heterogênea e complexa. Apesar de possuírem a mesma mutação (Y72X) a severidade da doença afetou muito mais o indivíduo índice, do que seu irmão, hoje aos 30 anos de idade apesar do baixo número de monócitos, linfócitos B e NK, porém sem indícios de infecções virais como EBV ou HPV.

Essa variabilidade fenotípica é uma das características mais marcantes da doença (Spinner *et al.*, 2014), o que reforça a necessidade de um rápido reconhecimento desses pacientes em pacientes com síndromes de falência medular para o encaminhamento mais rápido a uma terapia apropriada.

A mutação encontrada na coorte de SMD, N363I, é nova e de caráter germinativa. Apesar da não realização do sequenciamento de indivíduos aparentados para observarmos se a mutação segrega com o fenótipo de falência medular, podemos afirmar que essa mutação é patogênica dado que tal mutação se encontra em uma região altamente conservada na estrutura proteica, o segundo dedo de zinco, região responsável por permitir a ligação do fator de transcrição às sequências de DNA das regiões promotoras dos genes regulados pelo *GATA2*, tal como PU.1 (Visvader *et al.*, 1995; Walsh *et al.*, 2002). Mutações na região que codifica o segundo dedo de zinco têm sido descritas como patogênicas por vários grupos (Hahn *et al.*, 2011; Hsu *et al.*, 2011; Ostergaard *et al.*, 2011; Gao *et al.*, 2014; Spinner *et al.*, 2014), o que dá suporte a nossa teoria de patogenicidade da mutação encontrada e realça o papel desse gene no controle da hematopoese.

Com relação ao perfili imune celular apresentado pelos pacientes com deficiência do *GATA2*, encontramos um baixo número de monócitos e linfócitos B, como descrito originalmente por Hsu e colaboradores (Hsu *et al.*, 2011). Porém, diferentemente do previsto, não houve diferença significativa entre os grupos para o número de células NK, indo de encontro ao já estabelecido na literatura pertinente (Mace *et al.*, 2013). Um dos motivos pode estar relacionado ao número de células apresentado pela paciente portadora da mutação N363I, de 125 células NK/ μ L, o que elevou a média do grupo mutado. Nesse caso, se faz necessário colher uma nova amostra para a confirmação do número real, dado que a doença do *GATA2* se caracteriza, entre outros fatores, pelo número diminuído de células *natural killer* (Bigley *et al.*, 2011; Calvo *et al.*, 2011; Dickinson *et al.*, 2011; Mace *et al.*, 2013; Dickinson *et al.*, 2014; Spinner *et al.*, 2014). Um outro motivo pode ser o pequeno número amostral no grupo dos indivíduos mutados, que foi de apenas três. Entretanto, acreditamos que, embora reduzido, esse grupo é representativo já que foi possível confirmar as observações prévias para os números reduzidos de monócitos e linfócitos B, bem como para uma quantidade maior de plaquetas se comparado ao grupo com AA, como recentemente descrito (Ganapathi *et al.*, 2015).

A quantificação das citocinas analisadas em amostras de plasma dos pacientes também mostrou que não há diferenças entre os grupos analisados. Os resultados obtidos pela maioria dos pacientes, e para todas as citocinas analisadas, foram de zero. Acreditamos que esse valor representa a realidade, já que o kit utilizado possui um limite de detecção de valores de concentração tão baixos quanto 2,5 pg/mL em uma determinada amostra. Ainda, durante a realização do experimento é necessário realizar uma curva padrão de quantificação, a qual se inicia com um valor de 20 pg/mL, e que não mostrou problema algum em nossa preparação. Dessa forma, reiteramos que os valores encontrados não foram consequência de algum problema com o método/kit de detecção.

Além do estabelecimento de um perfil imune apresentado pelos pacientes com mutação no gene *GATA2*, o presente trabalho também trouxe novos dados para um melhor entendimento fisiopatologia da AA e SMD. O SNP rs73862208, foi encontrado apenas em amostras de pacientes com AA, e em nenhum dos indivíduos controle ou SMD. Entretanto a análise estatística não pode ser realizada pela indisponibilidade do número de indivíduos heterozigotos e/ou homozigotos encontrados pela base *1000 genomes*. É necessária uma melhor compreensão do papel desse SNP no desenvolvimento da AA, já que este se localiza na região 5' UTR do gene, o que pode levar a uma modulação da expressão do gene (Van Der Velden e Thomas, 1999). Sabendo da importância que o gene *GATA2* ocupa na hematopoese, é provável que uma expressão aberrante deste gene possa levar à diminuição do número de CTHs, característica fundamental da AA. E de fato, já é conhecido que o gene *GATA2* está hipoexpresso em células CD34⁺ de indivíduos com AA (Fujimaki *et al.*, 2001; Zeng *et al.*, 2004), o que reforça o seu papel no desenvolvimento da anemia aplástica. No entanto, não há muitos estudos relacionando SNPs em regiões promotoras dos fatores de transcrição que governam a hematopoese. Dessa forma, é necessário verificar se o SNP rs73862208 realmente leva a uma diminuição da expressão do referido gene.

De forma distinta, o SNP rs1806462 foi encontrado nos três grupos analisados. Entretanto, a frequência do SNP no grupo das síndromes mielodisplásicas foi estatisticamente menor. Os portadores desse SNP, porém, não apresentam quaisquer diferenças entre as contagens hematológicas, cariótipo, celularidade da medula ou o número de blastos. Deste modo, torna difícil o estabelecimento do papel desse SNP nas

mielodisplasias. Considerando que ele também se encontra na região 5' UTR do gene *GATA2*, tal SNP também pode modular a expressão gênica, necessitando também da realização de um teste que cheque o nível de expressão. Até o momento não há o relacionamento do SNP rs1806462 a nenhuma outra doença, nem quando analisado o desequilíbrio de ligação de haplótipos (Michielse *et al.*, 2006).

Conclusão

Mutações constitutivas no gene *GATA2* foram encontradas em aproximadamente 3% dos pacientes com anemia aplástica adquirida (1/36) e com síndrome mielodisplásica (1/33). Além disso, houve a identificação de SNPs possivelmente relacionados à patofisiologia tanto da AA quanto da SMD.

Na tentativa de estabelecermos uma relação entre a presença de mutação a perfil imune, observamos uma drástica redução no número de monócitos e linfócitos B, quando comparado aos grupos de pacientes com AA e SMD. Foi notado também um aumento no número de plaquetas quando comparados aos portadores de AA. A quantificação dos níveis plasmáticos de IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-17A, IFN- γ e TNF não mostraram quaisquer diferenças entre os grupos analisados.

Considerando o status mutacional e as características clínicas apresentadas, podemos afirmar que foi realizado o primeiro diagnóstico de MonoMAC no Brasil. Além disso, foi possível a identificação de outros dois pacientes com deficiência do fator de transcrição *GATA2* dentro da nossa coorte, evidenciado pelas características clínicas apresentadas.

Desta forma, o presente trabalho foi relevante para a distinção entre pacientes com AA ou SMD daqueles com mutações em *GATA2*, oferecendo mais informações para a realização do diagnóstico, bem como um aconselhamento genético familiar apropriado.

Referências

Bibliográficas

ARBER, D. A. et al. The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. **Blood**, v. 127, n. 20, p. 2391-405, May 2016. ISSN 1528-0020. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27069254> >.

BALABAN, E. P. et al. Diamond-Blackfan syndrome in adult patients. **Am J Med**, v. 78, n. 3, p. 533-8, Mar 1985. ISSN 0002-9343. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3919581> >.

BARRETT, J.; SAUNTHARARAJAH, Y.; MOLLIDRE, J. Myelodysplastic syndrome and aplastic anemia: distinct entities or diseases linked by a common pathophysiology? **Semin Hematol**, v. 37, n. 1, p. 15-29, Jan 2000. ISSN 0037-1963. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10676908> >.

BENNETT, J. M.; ORAZI, A. Diagnostic criteria to distinguish hypocellular acute myeloid leukemia from hypocellular myelodysplastic syndromes and aplastic anemia: recommendations for a standardized approach. **Haematologica**, v. 94, n. 2, p. 264-8, Feb 2009. ISSN 1592-8721. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19144661> >.

BIGLEY, V. et al. The human syndrome of dendritic cell, monocyte, B and NK lymphoid deficiency. **J Exp Med**, v. 208, n. 2, p. 227-34, Feb 2011. ISSN 1540-9538. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21242295> >.

BRIEGEL, K. et al. Ectopic expression of a conditional GATA-2/estrogen receptor chimera arrests erythroid differentiation in a hormone-dependent manner. **Genes Dev**, v. 7, n. 6, p. 1097-109, Jun 1993. ISSN 0890-9369. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8504932> >.

CALADO, R. T. Immunologic aspects of hypoplastic myelodysplastic syndrome. **Semin Oncol**, v. 38, n. 5, p. 667-72, Oct 2011. ISSN 1532-8708. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21943673> >.

CALLERA, F.; FALCÃO, R. P. Increased apoptotic cells in bone marrow biopsies from patients with aplastic anaemia. **Br J Haematol**, v. 98, n. 1, p. 18-20, Jul 1997. ISSN 0007-1048. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9233557> >.

CALVO, K. R. et al. Myelodysplasia in autosomal dominant and sporadic monocytopenia immunodeficiency syndrome: diagnostic features and clinical implications. **Haematologica**, v. 96, n. 8, p. 1221-5, Aug 2011. ISSN 1592-8721. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21508125> >.

CAMARGO, J. F. et al. MonoMAC syndrome in a patient with a GATA2 mutation: case report and review of the literature. **Clin Infect Dis**, v. 57, n. 5, p. 697-9, Sep 2013. ISSN 1537-6591. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23728141> >.

CAMITTA, B. M. et al. Selection of patients for bone marrow transplantation in severe aplastic anemia. **Blood**, v. 45, n. 3, p. 355-63, Mar 1975. ISSN 0006-4971. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1090310> >.

CARDIS, E. et al. Risk of cancer after low doses of ionising radiation: retrospective cohort study in 15 countries. **BMJ**, v. 331, n. 7508, p. 77, Jul 2005. ISSN 1756-1833. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15987704> >.

CHARRON, F.; NEMER, M. GATA transcription factors and cardiac development. **Semin Cell Dev Biol**, v. 10, n. 1, p. 85-91, Feb 1999. ISSN 1084-9521. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10355032> >.

COREY, S. J. et al. Myelodysplastic syndromes: the complexity of stem-cell diseases. **Nat Rev Cancer**, v. 7, n. 2, p. 118-29, Feb 2007. ISSN 1474-175X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17251918> >.

CORTÉS-LAVAUD, X. et al. GATA2 germline mutations impair GATA2 transcription, causing haploinsufficiency: functional analysis of the p.Arg396Gln mutation. **J Immunol**, v. 194, n. 5, p. 2190-8, Mar 2015. ISSN 1550-6606. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25624456> >.

CROSSLEY, M.; MERIKA, M.; ORKIN, S. H. Self-association of the erythroid transcription factor GATA-1 mediated by its zinc finger domains. **Mol Cell Biol**, v. 15, n. 5, p. 2448-56, May 1995. ISSN 0270-7306. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7739529> >.

CUELLAR-RODRIGUEZ, J. et al. Successful allogeneic hematopoietic stem cell transplantation for GATA2 deficiency. **Blood**, v. 118, n. 13, p. 3715-20, Sep 2011. ISSN 1528-0020. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21816832> >.

D'ANDREA, A. D.; GROMPE, M. Molecular biology of Fanconi anemia: implications for diagnosis and therapy. **Blood**, v. 90, n. 5, p. 1725-36, Sep 1997. ISSN 0006-4971. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9292505> >.

DE PATER, E. et al. Gata2 is required for HSC generation and survival. **J Exp Med**, v. 210, n. 13, p. 2843-50, Dec 2013. ISSN 1540-9538. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24297996> >.

DEZERN, A. E.; SEKERES, M. A. The Challenging World of Cytopenias: Distinguishing Myelodysplastic Syndromes From Other Disorders of Marrow Failure. **Oncologist**, v. 19, n. 7, p. 735-745, Jul 2014. ISSN 1549-490X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24899643> >.

DICKINSON, R. E. et al. Exome sequencing identifies GATA-2 mutation as the cause of dendritic cell, monocyte, B and NK lymphoid deficiency. **Blood**, v. 118, n. 10, p. 2656-8, Sep 2011. ISSN 1528-0020. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21765025> >.

_____. The evolution of cellular deficiency in GATA2 mutation. **Blood**, v. 123, n. 6, p. 863-74, Feb 2014. ISSN 1528-0020. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24345756> >.

DOKAL, I. Dyskeratosis congenita: an inherited bone marrow failure syndrome. **Br J Haematol**, v. 92, n. 4, p. 775-9, Mar 1996. ISSN 0007-1048. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8616066> >.

_____. Dyskeratosis congenita. **Hematology Am Soc Hematol Educ Program**, v. 2011, p. 480-6, 2011. ISSN 1520-4383. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22160078> >.

DRACHTMAN, R. A.; ALTER, B. P. Dyskeratosis congenita: clinical and genetic heterogeneity. Report of a new case and review of the literature. **Am J Pediatr Hematol Oncol**, v. 14, n. 4, p. 297-304, Nov 1992. ISSN 0192-8562. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1456394> >.

DUCKWORTH-RYSIECKI, G. et al. Identification of two complementation groups in Fanconi anemia. **Somat Cell Mol Genet**, v. 11, n. 1, p. 35-41, Jan 1985. ISSN 0740-7750. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3919452> >.

FUJIMAKI, S. et al. Decreased expression of transcription factor GATA-2 in haematopoietic stem cells in patients with aplastic anaemia. **Br J Haematol**, v. 113, n. 1, p. 52-7, Apr 2001. ISSN 0007-1048. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11328281> >.

GANAPATHI, K. A. et al. GATA2 deficiency-associated bone marrow disorder differs from idiopathic aplastic anemia. **Blood**, v. 125, n. 1, p. 56-70, Jan 2015. ISSN 1528-0020. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25359990> >.

GAO, J. et al. Heritable GATA2 mutations associated with familial AML-MDS: a case report and review of literature. **J Hematol Oncol**, v. 7, p. 36, 2014. ISSN 1756-8722. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24754962> >.

GREENBERG, P. L. et al. Revised international prognostic scoring system for myelodysplastic syndromes. **Blood**, v. 120, n. 12, p. 2454-65, Sep 2012. ISSN 1528-0020. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22740453> >.

GROSSMAN, J. et al. Nonmyeloablative allogeneic hematopoietic stem cell transplantation for GATA2 deficiency. **Biol Blood Marrow Transplant**, v. 20, n. 12, p. 1940-8, Dec 2014. ISSN 1523-6536. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25111582> >.

HAASE, D. et al. New insights into the prognostic impact of the karyotype in MDS and correlation with subtypes: evidence from a core dataset of 2124 patients. **Blood**, v. 110, n. 13, p. 4385-95, Dec 2007. ISSN 0006-4971. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17726160> >.

HAHN, C. N. et al. Heritable GATA2 mutations associated with familial myelodysplastic syndrome and acute myeloid leukemia. **Nat Genet**, v. 43, n. 10, p. 1012-7, Oct 2011. ISSN 1546-1718. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21892162> >.

HEYWORTH, C. et al. A GATA-2/estrogen receptor chimera functions as a ligand-dependent negative regulator of self-renewal. **Genes Dev**, v. 13, n. 14, p. 1847-60, Jul 1999. ISSN 0890-9369. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10421636> >.

HOFFBRAND, A. V. et al. **Postgraduated Haematology**. 7th. Wiley-Blackwell, 2016. 952 ISBN 978-1-118-85432-7.

HSU, A. P. et al. GATA2 haploinsufficiency caused by mutations in a conserved intronic element leads to MonoMAC syndrome. **Blood**, v. 121, n. 19, p. 3830-7, S1-7, May 2013. ISSN 1528-0020. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23502222> >.

_____. Mutations in GATA2 are associated with the autosomal dominant and sporadic monocytopenia and mycobacterial infection (MonoMAC) syndrome. **Blood**, v. 118, n. 10, p. 2653-5, Sep 2011. ISSN 1528-0020. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21670465> >.

IWANAGA, M. et al. Risk of myelodysplastic syndromes in people exposed to ionizing radiation: a retrospective cohort study of Nagasaki atomic bomb survivors. **J Clin Oncol**, v. 29, n. 4, p. 428-34, Feb 2011. ISSN 1527-7755. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21149671> >.

LABBAYE, C. et al. Differential expression and functional role of GATA-2, NF-E2, and GATA-1 in normal adult hematopoiesis. **J Clin Invest**, v. 95, n. 5, p. 2346-58, May 1995. ISSN 0021-9738. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7738198> >.

LIPTON, J. M. et al. Improving clinical care and elucidating the pathophysiology of Diamond Blackfan anemia: an update from the Diamond Blackfan Anemia Registry. **Pediatr Blood Cancer**, v. 46, n. 5, p. 558-64, May 2006. ISSN 1545-5009. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16317735> >.

MACE, E. M. et al. Mutations in GATA2 cause human NK cell deficiency with specific loss of the CD56(bright) subset. **Blood**, v. 121, n. 14, p. 2669-77, Apr 2013. ISSN 1528-0020. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23365458> >.

MACIEJEWSKI, J. P. et al. Increased expression of Fas antigen on bone marrow CD34+ cells of patients with aplastic anaemia. **Br J Haematol**, v. 91, n. 1, p. 245-52, Sep 1995. ISSN 0007-1048. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7577642> >.

MAY, G. et al. Dynamic analysis of gene expression and genome-wide transcription factor binding during lineage specification of multipotent progenitors. **Cell Stem Cell**, v. 13, n. 6, p. 754-68, Dec 2013. ISSN 1875-9777. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24120743> >.

MCLAUGHLIN, P. et al. Myelodysplasia and acute myeloid leukemia following therapy for indolent lymphoma with fludarabine, mitoxantrone, and dexamethasone (FND) plus rituximab and interferon alpha. **Blood**, v. 105, n. 12, p. 4573-5, Jun 2005. ISSN 0006-4971. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15741224> >.

MICHIELSE, C. B. et al. Refinement of the locus for hereditary congenital facial palsy on chromosome 3q21 in two unrelated families and screening of positional candidate genes. **Eur J Hum Genet**, v. 14, n. 12, p. 1306-12, Dec 2006. ISSN 1018-4813. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16912702> >.

MINEGISHI, N. et al. Alternative promoters regulate transcription of the mouse GATA-2 gene. **J Biol Chem**, v. 273, n. 6, p. 3625-34, Feb 1998. ISSN 0021-9258. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9452491> >.

MOLKENTIN, J. D. The zinc finger-containing transcription factors GATA-4, -5, and -6. Ubiquitously expressed regulators of tissue-specific gene expression. **J Biol Chem**, v. 275, n. 50, p. 38949-52, Dec 2000. ISSN 0021-9258. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11042222> >.

NAGAI, T. et al. Transcription factor GATA-2 is expressed in erythroid, early myeloid, and CD34+ human leukemia-derived cell lines. **Blood**, v. 84, n. 4, p. 1074-84, Aug 1994. ISSN 0006-4971. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7519472> >.

NEUKIRCHEN, J. et al. Incidence and prevalence of myelodysplastic syndromes: data from the Düsseldorf MDS-registry. **Leuk Res**, v. 35, n. 12, p. 1591-6, Dec 2011. ISSN 1873-5835. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21708407> >.

NILSSON, L. et al. Isolation and characterization of hematopoietic progenitor/stem cells in 5q-deleted myelodysplastic syndromes: evidence for involvement at the hematopoietic stem cell level. **Blood**, v. 96, n. 6, p. 2012-21, Sep 2000. ISSN 0006-4971. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10979941> >.

ORKIN, S. H. Transcription factors and hematopoietic development. **J Biol Chem**, v. 270, n. 10, p. 4955-8, Mar 1995. ISSN 0021-9258. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7890597> >.

OSTERGAARD, P. et al. Mutations in GATA2 cause primary lymphedema associated with a predisposition to acute myeloid leukemia (Emberger syndrome). **Nat Genet**, v. 43, n. 10, p. 929-31, Oct 2011. ISSN 1546-1718. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21892158> >.

PAN, X. et al. Identification of human GATA-2 gene distal 5' exon and its expression in hematopoietic stem cell fractions. **J Biochem**, v. 127, n. 1, p. 105-12, Jan 2000. ISSN 0021-924X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10731672> >.

PEDERSEN-BJERGAARD, J. et al. Increased risk of myelodysplasia and leukaemia after etoposide, cisplatin, and bleomycin for germ-cell tumours. **Lancet**, v. 338, n. 8763, p. 359-63, Aug 1991. ISSN 0140-6736. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1713639> >.

PHILPOTT, N. J. et al. Increased apoptosis in aplastic anemia bone marrow progenitor cells: possible pathophysiologic significance. **Exp Hematol**, v. 23, n. 14, p. 1642-8, Dec 1995. ISSN 0301-472X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8542959> >.

SCHANZ, J. et al. Coalesced multicentric analysis of 2,351 patients with myelodysplastic syndromes indicates an underestimation of poor-risk cytogenetics of myelodysplastic syndromes in the international prognostic scoring system. **J Clin Oncol**, v. 29, n. 15, p. 1963-70, May 2011. ISSN 1527-7755. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21519021> >.

SIMŞEK, O. P. et al. A child with vitamin B12 deficiency presenting with pancytopenia and hyperpigmentation. **J Pediatr Hematol Oncol**, v. 26, n. 12, p. 834-6, Dec 2004. ISSN 1077-4114. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15591907> >.

SLOAND, E. et al. Intracellular interferon-gamma in circulating and marrow T cells detected by flow cytometry and the response to immunosuppressive therapy in patients with aplastic anemia. **Blood**, v. 100, n. 4, p. 1185-91, Aug 2002. ISSN 0006-4971. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12149196> >.

SPINNER, M. A. et al. GATA2 deficiency: a protean disorder of hematopoiesis, lymphatics, and immunity. **Blood**, v. 123, n. 6, p. 809-21, Feb 2014. ISSN 1528-0020. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24227816> >.

STABLER, S. P. Clinical practice. Vitamin B12 deficiency. **N Engl J Med**, v. 368, n. 2, p. 149-60, Jan 2013. ISSN 1533-4406. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23301732> >.

TAKAKU, T. et al. Hematopoiesis in 3 dimensions: human and murine bone marrow architecture visualized by confocal microscopy. **Blood**, v. 116, n. 15, p. e41-55, Oct 2010. ISSN 1528-0020. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20647571> >.

TEFFERI, A.; VARDIMAN, J. W. Myelodysplastic syndromes. **N Engl J Med**, v. 361, n. 19, p. 1872-85, Nov 2009. ISSN 1533-4406. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19890130> >.

TEHRANCHI, R. et al. Persistent malignant stem cells in del(5q) myelodysplasia in remission. **N Engl J Med**, v. 363, n. 11, p. 1025-37, Sep 2010. ISSN 1533-4406. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20825315> >.

TOWNSLEY, D. M. et al. **Regulatory mutations in GATA2 associated with Aplastic Anemia**. Blood: American Society of Hematology. 120 2012.

TSAL, F. Y. et al. An early haematopoietic defect in mice lacking the transcription factor GATA-2. **Nature**, v. 371, n. 6494, p. 221-6, Sep 1994. ISSN 0028-0836. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8078582> >.

VAN DER VELDEN, A. W.; THOMAS, A. A. The role of the 5' untranslated region of an mRNA in translation regulation during development. **Int J Biochem Cell Biol**, v. 31, n. 1, p. 87-106, Jan 1999. ISSN 1357-2725. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10216946> >.

VARDIMAN, J. W. et al. The 2008 revision of the World Health Organization (WHO) classification of myeloid neoplasms and acute leukemia: rationale and important changes. **Blood**, v. 114, n. 5, p. 937-51, Jul 2009. ISSN 1528-0020. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19357394> >.

VINH, D. C. et al. Autosomal dominant and sporadic monocytopenia with susceptibility to mycobacteria, fungi, papillomaviruses, and myelodysplasia. **Blood**, v. 115, n. 8, p. 1519-29, Feb 2010. ISSN 1528-0020. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20040766> >.

VISVADER, J. E. et al. The C-terminal zinc finger of GATA-1 or GATA-2 is sufficient to induce megakaryocytic differentiation of an early myeloid cell line. **Mol Cell Biol**, v. 15, n. 2, p. 634-41, Feb 1995. ISSN 0270-7306. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7823932> >.

WALSH, J. C. et al. Cooperative and antagonistic interplay between PU.1 and GATA-2 in the specification of myeloid cell fates. **Immunity**, v. 17, n. 5, p. 665-76, Nov 2002. ISSN 1074-7613. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12433372> >.

YOUNG, N. S. Hematopoietic cell destruction by immune mechanisms in acquired aplastic anemia. **Semin Hematol**, v. 37, n. 1, p. 3-14, Jan 2000. ISSN 0037-1963. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10676907> >.

YOUNG, N. S.; CALADO, R. T.; SCHEINBERG, P. Current concepts in the pathophysiology and treatment of aplastic anemia. **Blood**, v. 108, n. 8, p. 2509-19, Oct 2006. ISSN 0006-4971. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16778145> >.

YOUNG, N. S.; MACIEJEWSKI, J. The pathophysiology of acquired aplastic anemia. **N Engl J Med**, v. 336, n. 19, p. 1365-72, May 1997. ISSN 0028-4793. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9134878> >.

YUASA, H. et al. Oncogenic transcription factor Evi1 regulates hematopoietic stem cell proliferation through GATA-2 expression. **EMBO J**, v. 24, n. 11, p. 1976-87, Jun 2005. ISSN 0261-4189. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15889140> >.

ZENG, W. et al. Gene expression profiling in CD34 cells to identify differences between aplastic anemia patients and healthy volunteers. **Blood**, v. 103, n. 1, p. 325-32, Jan 2004. ISSN 0006-4971. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14504100> >.

ZHANG, P. et al. Negative cross-talk between hematopoietic regulators: GATA proteins repress PU.1. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 96, n. 15, p. 8705-10, Jul 1999. ISSN 0027-8424. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10411939> >.

Apêndices

Apêndice A - Tabela com resumo dos dados dos pacientes com anemia aplásica adquirida para análise no presente trabalho. F, feminino; M, masculino; Hb, Hemoglobinas;; GV, Glóbulos vermelhos; GB, Glóbulos brancos; N.D., não disponível.

Paciente	Sexo	Clínica	Idade	Hb (g/dL)	GV (10 ⁶ /μL)	GB (cél/μL)	Neutrófilos (cél/μL)	Linfócitos (cél/μL)	Monócitos (cél/μL)	Plaquetas (10 ³ /μL)	Celularidade da medula	Nº blastos	Cariótipo	Mutações
AA1	M	AA GRAVE	22	14,1	3,6	2600	1200	1100	300	27	30%	2%	MONOSSOMIA DO 7	rs2335237; P5P; A164T; rs2713603; rs2713604
AA2	M	AA GRAVE	27	10,6	2,98	2300	1000	900	400	27	10%	N.D	NORMAL	rs2335237; rs1806462; P5P; T188T; rs11708606; rs2713604
AA3	M	AA GRAVE	25	7,3	2,22	1600	1100	300	100	30	50%	1%	NORMAL	rs2335237; rs1806462; rs2713603; rs2713604
AA4	M	AA GRAVE	83	7,7	2,32	3900	2400	1200	200	18	10%	N.D	NORMAL	SEM ALTERAÇÕES
AA5	M	AA GRAVE	84	7,4	2,54	2700	400	2100	200	18	0%	N.D	NORMAL	P5P; rs2713603; rs2713604
AA6	F	AA MODERADA	55	8,3	1,32	1600	800	700	100	10	5%	1%	NORMAL	rs2335237; P5P; rs2713603
AA7	M	AA GRAVE	26	6,6	2,33	200	100	0	0	25	5%	1%	NORMAL	rs2335237; rs1806462; P5P
AA8	F	AA GRAVE	50	6,8	2	2600	800	1400	300	9	0%	2%	NORMAL	P5P
AA9	M	AA GRAVE	77	6,9	2,34	1000	400	500	200	14	5%	2%	NORMAL	rs2335237; rs1806462; P5P; A164T; rs2713603

Paciente	Sexo	Clínica	Idade	Hb (g/dL)	GV (10 ⁶ /μL)	GB (cél/μL)	Neutrófilos (cél/μL)	Linfócitos (cél/μL)	Monócitos (cél/μL)	Plaquetas (10 ³ /μL)	Celularidade da medula	Nº blastos	Cariótipo	Mutações
AA10	F	AA GRAVE	25	6,8	2,39	2700	1000	1500	100	18	20%	N.D.	NORMAL	rs2335237; P5P; A164T; rs2713603
AA11	F	AA MODERADA	38	13,2	4,23	2700	1400	1100	200	135	40%	N.D.	NORMAL	rs2335237; rs1806462; P5P
AA12	F	AA MODERADA	31	13	4,31	4900	3200	1400	300	126	20%	N.D.	NORMAL	rs2335237; rs1806462; P5P
AA13	M	AA MODERADA	17	8,5	2,41	1400	400	800	100	19	25%	1%	NORMAL	rs2335237; rs1806462; P5P; A164T; rs2713603; rs2713604
AA14	M	AA MODERADA	70	8,9	2,78	4600	1000	2400	300	35	20%	1%	NORMAL	rs2335237; rs1806462; P5P; A164T; rs2713603; rs2713604
AA15	F	AA MODERADA	30	10,7	2,91	2100	500	1500	100	18	40%	1%	NORMAL	rs2335237; rs1806462; P5P; rs11708606; rs2713604
AA16	F	AA GRAVE	57	11,5	3,04	2700	2200	300	100	16	10%	2%	NORMAL	rs2335237; rs1806462; P5P; rs2713603; rs2713604
AA17	M	AA GRAVE	19	9,3	2,6	2000	700	1200	100	13	10%	2%	NORMAL	rs2335237; P5P; A164T
AA18	F	AA MODERADA	31	4,1	1,64	4500	3100	800	300	312	50%	N.D.	NORMAL	rs2335237; rs1806462; P5P

Paciente	Sexo	Clínica	Idade	Hb (g/dL)	GV (10 ⁶ /μL)	GB (cél/μL)	Neutrófilos (cél/μL)	Linfócitos (cél/μL)	Monócitos (cél/μL)	Plaquetas (10 ³ /μL)	Celularidade da medula	Nº blastos	Cariótipo	Mutações
AA19	M	AA GRAVE	30	14,9	4,6	2800	900	1400	300	147	n.d.	2%	NORMAL	rs73862208
AA20	F	AA GRAVE	31	6,6	1,66	1900	600	1100	100	20	10%	1%	NORMAL	rs73862208; rs2335237; rs1806462; P5P
AA21	M	AA MODERADA	22	14,5	5,57	2900	700	1600	400	7	40%	2%	NORMAL	rs2335237; rs1806462; P5P
AA22	F	AA GRAVE	46	6,1	1,63	2100	900	1000	200	48	25%	1%	NORMAL	SEM ALTERAÇÕES
AA23	F	LMA SECUNDÁRIA AA	19	8,2	2,56	2500	500	1900	100	3	20%	N.D.	NORMAL	rs7611275; rs2335237; rs1806462; P5P
AA24	F	AA GRAVE	38	7,5	2,35	5400	2300	2900	200	45	n.d.	N.D.	NORMAL	rs2335237; P5P; A164T
AA25	F	AA MODERADA	75	9,9	2,46	5300	2200	2400	300	33	20%	1%	NORMAL	rs2335237; P5P; P250A
AA26	M	AA MODERADA	41	13,5	4,25	5000	2900	1700	300	92	40%	2%	NORMAL	SEM ALTERAÇÕES
AA27	F	AA MODERADA	50	9	2,35	3100	1400	1300	300	66	10%	N.D.	NORMAL	SEM ALTERAÇÕES
AA28	M	AA GRAVE	40	9,2	2,66	2900	1400	1200	200	15	35%	3%	NORMAL	rs2335237; rs1806462; P5P
AA29	M	AA GRAVE	20	8	2,34	2100	100	1800	200	43	10%	1%	NORMAL	rs2335237; rs1806462; P5P
AA30	M	AA MODERADA	20	9,2	2,99	2200	300	1700	200	9	10%	3%	NORMAL	rs2335237; rs1806462; P5P

Paciente	Sexo	Clínica	Idade	Hb (g/dL)	GV (10 ⁶ /μL)	GB (cél/μL)	Neutrófilos (cél/μL)	Linfócitos (cél/μL)	Monócitos (cél/μL)	Plaquetas (10 ³ /μL)	Celularidade da medula	Nº blastos	Cariótipo	Mutações
AA31	M	AA MODERADA	51	4,7	1,14	2400	1300	800	200	4	30%	1%	NORMAL	rs7611275; rs1806462; P5P
AA32	F	AA MODERADA	68	8,8	2,29	3700	2200	1300	200	7	10%	3%	NORMAL	rs2335237; rs1806462; P5P; A164T
AA33	M	AA GRAVE	25	9,3	3,03	1400	300	900	100	29	5%	N.D.	NORMAL	rs7611275; rs2335237; rs1806462; P5P
AA34	M	AA GRAVE	60	8,7	2,62	1600	700	700	100	15	10%	2%	NORMAL	rs2335237; rs1806462; P5P; A164T
AA35	F	AA GRAVE	21	9,7	3,18	4600	1700	2800	100	20	10%	N.D.	NORMAL	T188T
AA36	F	AA MODERADA	25	11,2	3,12	5400	2900	2000	400	89	10%	N.D.	NORMAL	rs2335237; P5P; A164T; T188T

Apêndice B - Tabela com resumo dos dados dos pacientes com síndrome mielodisplásica para análise no presente trabalho. F, feminino; M, masculino; Hb, Hemoglobinas;; GV, Glóbulos vermelhos; GB, Glóbulos brancos; N.D., não disponível; CRDUL, citopenia refratária com displasia de única linhagem; CRDML, citopenia refratária com displasia de múltiplas linhagens; ARSA, anemia refratária com sideroblastos em anel; AREB, anemia refratária com excesso de blastos.

Paciente	Sexo	Clínica	Idade	Hb (g/dL)	GV (10 ⁶ /μL)	GB (cél/μL)	Neutrófilos (cél/μL)	Linfócitos (cél/μL)	Monócitos (cél/μL)	Plaquetas (10 ³ /μL)	Celularidade da medula	nº blastos	Cariótipo	Mutações
SMD1	F	SMD HIPOPLASICA, CRDML, IPSS-R intermediário	77	9,5		4700	2900	1400	300	16	20%	1%	NORMAL	rs2335237; P5P; A164T; rs2713603
SMD2	F	SMD CRDML, IPSS-R INTERMEDIÁRIO	53	13,4	4,15	5300	2400	2200	300	72	75%	1%	NORMAL	rs2335237; P5P; rs2713603
SMD3	F	SMD CRDML IPSS-R RISCO INTERMEDIÁRIO	48	13,2	3,39	4400	2100	1700	400	19	45%	N.D	47 XX +8[2], INV 3 (q21q23)[2]/46 XX [9]	rs2335237; P5P; rs11708606
SMD4	M	SMD AREB, IPSS 2,5, IPSS-R ALTO RISCO	68	9,9	3,33	2900	1600	900	200	59	70%	3%	MONOSSOMIA 7, DELEÇÃO 20 (q11) x2 [19]/ 46 XY [1]	P5P; A164T; rs2713603
SMD5	M	SMD CRDML, IPSS-R INTERMEDIÁRIO	60	9	2,93	2000	900	900	200	172	60%	1%	N.D.	rs7611275; rs2335237; P5P; A411A
SMD6	M	SMD FAMILIAR, CRDML	34	7,8	2,38	2600	500	1800	200	299	10%	2%	NORMAL	SEM ALTERAÇÕES
SMD7	M	SMD FAMILIAR, CRDML	30	7,4	2,22	3900	2500	1200	200	209	40%	1%	NORMAL	SEM ALTERAÇÕES
SMD8	M	SMD AREB	73	9,2	3,38	1900	200	1600	0	152	70%	4%	N.D.	rs2335237; P5P; A164T; rs2713603
SMD9	M	SMD CRDML, IPSS-R INTERMEDIÁRIO	78	8,3	2,42	1600	400	1000	100	25	50%	4%	N.D.	rs2335237; P5P; rs2713603; rs11708606

Paciente	Sexo	Clínica	Idade	Hb (g/dL)	GV (10 ⁶ /μL)	GB (cél/μL)	Neutrófilos (cél/μL)	Linfócitos (cél/μL)	Monócitos (cél/μL)	Plaquetas (10 ³ /μL)	Celularidade da medula	nº blastos	Cariótipo	Mutações
SMD10	F	SMD COM ANEMIA REFRATARIA	80	11,2	3,2	2400	1100	900	200	74	25%	2%	TRISSOMIA DO 8	rs2335237; P5P; rs11708606; rs2713604
SMD11	F	SMD HIPOPLASTICA, CRDML, IPSS-R INTERMEDIÁRIO	56	7,6	2,58	1900	800	900	100	9	10%	1%	NORMAL	rs2335237; P5P; A164T; rs2713603; rs2713604
SMD12	M	SMD CRDML, IPSS-R INTERMEDIÁRIO	71	8,6	2,29	8800	3500	3100	600	387	75%	1%	DELEÇÃO DO Y	rs2335237; P5P; rs2713603; rs2713604
SMD13	M	SMD CRDML, IPSS-R BAIXO	65	13,1	4,04	2600	1000	1400	100	136	30%	4%	NORMAL	rs2335237; P5P; rs2713603; rs11708606
SMD14	F	SMD AREB	70	8,8	2,73	1700	500	1000	200	83	85%	5%	NORMAL	rs2335237; rs1806462; P5P; rs11708606
SMD15	F	SMD CRDUL, IPSS-R BAIXO RISCO	68	11,5	3,81	2600	1100	1200	100	46	25%	1%	DELEÇÃO 20q	rs2335237; rs1806462; P5P; A164T; rs2713603; rs11708606
SMD16	M	SMD HIPOPLÁSTICA, CRDML	65	9,1	2,83	4700	1100	2900	500	14	20%	1%	NORMAL	rs2335237; P5P; A164T
SMD17	M	SMD CRDUL COM EVOLUÇÃO PARA LMA	62	10,3	3,31	7100	3500	1300	2100	5	100%	N.D.	NORMAL	rs2335237; P5P; A164T
SMD18	F	SMD AREB, IPSS-R BAIXO RISCO	80	8,8	2,52	2200	400	700	1100	47	70%	14%	NORMAL	SEM ALTERAÇÕES
SMD19	M	SMD CRDML, IPSS-R RISCO INTERMEDIÁRIO	86	9	2,2	4400	1300	1800	900	129	40%	5%	N.D.	rs2335237; rs1806462; P5P

Paciente	Sexo	Clínica	Idade	Hb (g/dL)	GV (10 ⁶ /μL)	GB (cél/μL)	Neutrófilos (cél/μL)	Linfócitos (cél/μL)	Monócitos (cél/μL)	Plaquetas (10 ³ /μL)	Celularidade da medula	nº blastos	Cariótipo	Mutações
SMD20	M	SMD CRDML, IPSS-R BAIXO RISCO	66	8,9	3,11	7700	4200	2200	500	261	20%	3%	NORMAL	rs2335237; rs1806462; P5P
SMD21	F	SMD CRDML, IPSS-R BAIXO RISCO	78	12,7	4,41	7000	4000	2100	800	56	n.d.	n.d.	DELEÇÃO 20q	rs2335237; P5P; A164T; rs2713603; rs2713604
SMD22	F	SMD, ARSA, IPSS-R BAIXO RISCO	83	10,1	3,36	4100	2400	1200	300	182	35%	n.d.	N.D.	rs2335237; rs1806462; P5P; rs2713603; rs2713604; A411A
SMD23	M	SMD AREB	43	7,8	2,16	1900	700	900	300	55	55%	3%	NORMAL	rs2335237; rs1806462; P5P; rs2713603; rs11708606
SMD24	F	SMD CRDML, IPSS-R RISCO INTERMEDIÁRIO	77	8,7	2,52	1300	500	700	100	106	30%	3%	NORMAL	rs2335237; rs1806462; P5P; A164T
SMD25	M	SMD CRDUL, IPSS-R BAIXO RISCO	72	15,5	4,86	3600	1800	1400	200	129	40%	1%	TRISSOMIA DO 8	rs2335237; rs1806462; P5P; rs11708606; rs2713604
SMD26	F	SMD CRDML	58	9,4	2,84	2400	900	1400	100	18	95%	6%	N.D.	rs2335237; P5P; A164T
SMD27	F	SMD COM EVOLUÇÃO PARA LMA	74	8,2	2,32	1100	500	500	100	189	n.d.	36%	NORMAL	rs7611275; rs2335237; rs1806462; P5P; A411A

Paciente	Sexo	Clínica	Idade	Hb (g/dL)	GV (10 ⁶ /μL)	GB (cél/μL)	Neutrófilos (cél/μL)	Linfócitos (cél/μL)	Monócitos (cél/μL)	Plaquetas (10 ³ /μL)	Celularidade da medula	nº blastos	Cariótipo	Mutações
SMD28	F	SMD CRDML	52	7,7	2,75	3900	1500	1900	400	214	20%	1%	NORMAL	rs2335237; rs1806462; P5P; A164T
SMD29	M	SMD CRDML	48	12,8	4,13	9800	4200	4500	1100	262	25%	2%	NORMAL	rs2335237; rs1806462; P5P
SMD30	F	SMD ARSA, IPSS- R BAIXO	82	8,1	2,66	6200	2800	1800	500	413	90%	2%	NORMAL	SEM ALTERAÇÕES
SMD31	F	SMD CRDML, IPSS-R BAIXO	30	12,9	3,54	2900	1200	1500	200	22	70%	2%	NORMAL	rs2335237; rs1806462; P5P; rs11708606
SMD32	F	SMD AREB	59	7,2	2,6	2700	800	1300	500	20	85%	1%	NORMAL	rs2335237; rs1806462; P5P; rs2713603; rs2713604

Apêndice C - Tabela com resumo dos dados dos pacientes com mutações no gene *GATA2* para análise no presente trabalho. F, feminino; M, masculino; Hb, Hemoglobinas;; GV, Glóbulos vermelhos; GB, Glóbulos brancos; N.D., não disponível.

Paciente	Sexo	Clínica	Idade	Hb (g/dL)	GV (10 ⁶ /μL)	GB (cél/μL)	Neutrófilos (cél/μL)	Linfócitos (cél/μL)	Monócitos (cél/μL)	Plaquetas (10 ³ /μL)	Celularidade da medula	nº blastos	Cariótipo	mutações
GATA2-1	F	Deficiência do GATA2	77	11,4	3,09	1400	200	1100	0	104	20%	1%	XX, +1, der (1;7) (q10;p10)[16]/49, idem, +X, +8 [4]	rs2335237; P5P; A164T; N363I
GATA2-2	M	MonoMAC	26	8,3	2,63	1200	600	500	0	80	40%	4%	NORMAL	P5P; Y72X
GATA2-3	M	Deficiência do GATA2	30	16,9	5,71	7100	4100	1700	0	335	N.D.	N.D.	N.D.	Y72X
GATA2-4	F	Deficiência do GATA2	21	10,2	3,51	2600	1200	1200	0	215	N.D.	N.D.	N.D.	rs2335237; rs1806462; P5P; R362X

Apêndice D – Tabela com os resultados fornecidos pelo software CADD.

Alteração	Cromossomo	Posição	Referência	Variante	PolyPhenCat	PolyPhenVal	SIFTcat	SIFTval	RawScore	PHRED (CADD Score)
rs73862208	3	128207344	G	C	NA	NA	NA	NA	2.109.124	16.91
rs2335237	3	128206710	T	G	NA	NA	NA	NA	2.797.646	21.4
rs1806462	3	128206618	C	A	NA	NA	NA	NA	1.584.276	13.77
rs7611275	3	128206759	G	C	NA	NA	NA	NA	1.274.058	12.13
P5P	3	128205860	G	C	NA	NA	NA	NA	1.452.118	13.06
Y72X	3	128205659	G	T	NA	NA	NA	NA	12.499.777	39
A164T	3	128204951	C	T	benign	0.015	tolerated	0.68	1.481.519	13.22
T188T	3	128204877	G	C	NA	NA	NA	NA	0.700356	8.829
P250A	3	128204693	G	C	probably_damaging	0.98	tolerated	0.17	3.339.186	22.9
R362X	3	128200721	G	A	NA	NA	NA	NA	12.791.036	40
N363I	3	128200717	T	A	probably_damaging	0.998	deleterious	0	6.592.437	31
A411A	3	128200072	C	T	NA	NA	NA	NA	1.803.393	15.01

Apêndice E – Contagem dos diferentes tipos linfocitários. Comparação de um indivíduo saudável “Controle” com os indivíduos “GATA2-2” (mutação Y72X), “GATA2-3” (mutação N363I), e “GATA2-4” (mutação R362X, proveniente do serviço do Hospital das Clínicas de Curitiba). Em (A) têm-se a população de células CD4 ($CD3^+CD4^+$). Em (B) as populações de CD8 ($CD3^+CD8^+$). Em (C) as populações de linfócitos B ($CD3^-CD19^+$). Em (D) e (E) têm-se as populações de linfócitos NK ($CD3^-CD16^+CD56^+$). Em (F) e (G) têm-se as populações de células T regulatórias ($CD4^+CD25^+FoxP3^+$).

Apêndice F – Tabela com os valores das subpopulações linfocitárias dos pacientes GATA2-mutados.

Os valores estão em células/ μ L de sangue total.

Pacientes	CD4	CD8	Treg	B	NK
GATA2-2	560,34	418,77	0,54	6,38	125,73
GATA2-3	122,57	132,09	2,98	28,73	0,31
GATA2-4	519,6	254,4	7,32	15,6	3,13

Anexo

Anexo A: Aprovação do projeto de pesquisa pelo CEP do HCFMRP

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA
DE RIBEIRÃO PRETO DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Ribeirão Preto, 19 de agosto de 2015.

Ofício nº 2937/2015
CEP/MGV

PROCESSO HCRP nº 100/2015

Prezados Pesquisadores,

O trabalho intitulado **"ANÁLISE MUTACIONAL DO GENE GATA2 E DE ALTERAÇÕES IMUNOLÓGICAS EM PACIENTES COM SÍNDROMES DE FALÊNCIA MEDULAR" - Projeto 14-H-RTC-0015 Versão 3 de 23 de junho de 2015**, foi analisado pelo Comitê de Ética em Pesquisa, em sua 413ª Reunião Ordinária realizada em 17/08/2015, e enquadrado na categoria: **APROVADO, bem como o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido 14-H-RTC-0015 Versão 1 de 23 de junho de 2015 (menor de idade); Termo de Consentimento Livre e Esclarecido 14-H-RTC-0015 Versão 3 de 23 de junho de 2015; Criação de Biorrepositório e Termo de Consentimento Livre e Esclarecido para Guarda de Material Biológico Versão 2 datada de 23/06/2015.**

Atenciosamente,

DRª MARCIA GUIMARÃES VILLANOVA
Coordenadora do Comitê de Ética em
Pesquisa do HCRP e da FMRP-USP

Ilustríssimos Senhores

GUSTAVO BORGES

PROF. DR. RODRIGO DO TOCANTINS CALADO DE SALOMA RODRIGUES (Orientador)

Depto. de Clínica Médica

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Campus Universitário - Monte Alegre
14048-900 - Ribeirão Preto - SP

Comitê de Ética em Pesquisa do HCRP e FMRP-USP
PWA-00002733; IRB-00002186 e
Registro Plataforma Brasil / CONEP nº 5440
(016) 3602-2226
cep@hcrp.usp.br

www.hcrp.usp.br