



Universidade do Estado do Rio de Janeiro

Centro Biomédico

Faculdade de Ciências Médicas

Eliane Ferreira Rodrigues

**Caracterização das alterações cromossômicas e moleculares em síndrome
mielodisplásica primária na infância
no Estado do Rio de Janeiro**

Rio de Janeiro

2014

Eliane Ferreira Rodrigues

**Caracterização das alterações cromossômicas e moleculares em síndrome
mielodisplásica primária na infância no Estado do Rio de Janeiro**



Tese de Doutorado apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor, ao Programa de Pós-graduação em Ciências Médicas, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Orientadora: Prof.^a Dra. Teresa de Souza Fernandez Seixas

Rio de Janeiro

2014

CATALOGAÇÃO NA FONTE
UERJ/REDE SIRIUS/BIBLIOTECA CB-A

R65 Rodrigues, Eliane Ferreira.
Caracterização das alterações cromossômicas e moleculares em
síndrome mielodisplásica primária na infância no Estado do Rio de Janeiro
/ Eliane Ferreira Rodrigues. – 2014.
172 f.

Orientador: Teresa de Souza Fernandez Seixas.
Tese (Doutorado) – Universidade do Estado do Rio de Janeiro,
Faculdade de Ciências Médicas. Pós-graduação em Ciências Médicas.

1. Medula óssea - Doenças - Teses. 2. Síndromes mielodisplásicas -
Fisiopatologia. 3. Leucemia em criança - Teses. 4. Genes Supressores de
Tumor - Fisiologia. 5. Epigênese Genética - Fisiologia. I. Seixas, Teresa de
Souza Fernandez. II. Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Faculdade
de Ciências Médicas. III. Título.

CDU 616.155.1

Autorizo, apenas para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta
tese, desde que citada a fonte.

Assinatura

Data

Eliane Ferreira Rodrigues

**Caracterização das alterações cromossômicas e moleculares em síndrome
mielodisplásica primária na infância no Estado do Rio de Janeiro**

Tese apresentada, como requisito parcial para
obtenção do título de Doutor, ao Programa de
Pós-graduação em Ciências Médicas, da
Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Aprovada em 4 de junho de 2014.

Banca Examinadora _____

Prof.^a Dra. Teresa de Souza Fernandez Seixas (Orientadora)
Faculdade de Ciências Médicas - UERJ

Prof.^a Dra. Dayse Aparecida da Silva
Faculdade de Ciências Médicas - UERJ

Prof.^a Dra. Márcia Mattos Gonçalves Pimentel
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes- UERJ

Prof. Dr. Robson de Queiroz Monteiro
Universidade Federal do Rio de Janeiro

Prof. Dra. Elenice Ferreira Bastos
Fundação Oswaldo Cruz

Rio de Janeiro

2014

DEDICATÓRIA

A minha amada família.

AGRADECIMENTOS

À Deus por ter me protegido e acompanhado em toda a minha caminhada;

Aos meus pais pelo amor incondicional, incentivo, apoio, compreensão e paciência ao longo de toda a minha vida;

Ao meu irmão por se fazer presente na minha vida, pelo apoio e incentivo;

À Dra. Teresa de Souza Fernandez Seixas, minha orientadora, por todos esses anos de convivência, transmissão de conhecimentos, amizade e incentivo. Por ter me ajudado a me tornar a profissional que sou hoje.

Ao Dr. Luis Fernando Bouzas, diretor do CEMO-INCA, e a Dra. Eliana Abdelhay, chefe da divisão de laboratório do CEMO pela oportunidade e todo o apoio que recebemos para realização deste projeto de pesquisa;

Às Professoras Dra. Cíntia Barros Santos-Rebouças e Dra. Márcia Mattos Gonçalves Pimentel do Laboratório de Serviço de Genética Humana da Universidade do Estado do Rio de Janeiro (SERVGEN-UERJ), pela valiosa colaboração;

Ao Dr. André Luis Mencialha pela colaboração na realização deste trabalho;

À minha amiga Daiane por todo o carinho e companherismo durante toda a minha vida acadêmica e pessoal, e pelo enorme laço de amizade que nos une;

Às minhas amigas Adriana e Luize por toda a ajuda prática, pelos conselhos e pelas demonstrações de carinho e amizade ao longo destes anos;

Aos meus grandes amigos Társis, Moisés, Elizete, Haline, Gabriela, Luciano, Ana Paula, Gilena, Camila e Regina por todos os momentos de descontração e por tornar meu dia a dia mais leve;

As minhas amigas Caroline, Alayne, Beatriz, Mayra, Valéria, Priscilla e Camila pelo companherismo, pelas orações e pelos vários momentos de risadas;

À toda equipe de médicos, enfermeiros e técnicos que contribuíram para a realização deste projeto;

Aos pacientes e suas famílias o meu muito obrigada!

RESUMO

RODRIGUES, Eliane Ferreira. *Caracterização das alterações cromossômicas e moleculares em síndrome mielodisplásica primária na infância no Estado do Rio de Janeiro*. 2014. 172 f. Tese (Doutorado em Ciências Médicas) – Faculdade de Ciências Médicas, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2014.

A Síndrome Mielodisplásica (SMD) primária é rara na infância, representando cerca de 4% de todas as malignidades hematológicas da faixa pediátrica. A história natural desta doença é extremamente variável, alguns pacientes podem apresentar formas brandas, com sobrevida alta e baixa taxa de transformação leucêmica. No entanto, cerca de 10 a 40% dos casos evoluem para leucemia mielóide aguda (LMA). Este trabalho apresentou como objetivo principal analisar células de medula óssea de pacientes com SMD primária na infância para suas características citogenéticas, moleculares e clínicas, no sentido de identificar marcadores genéticos e epigenéticos que auxiliem o diagnóstico e o prognóstico, além de contribuir para o conhecimento das alterações que levam ao desenvolvimento da doença e sua evolução para LMA. Nossos resultados mostraram a presença de cariótipos anormais em 56,5% (65/115) nos pacientes pediátricos com SMD primária. De acordo com a classificação para SMD da infância, 78 pacientes apresentaram CR, 22 AREB e 15 AREB-t. Foram incluídos em nosso estudo 3 pacientes com síndrome de Down apresentando SMD. Nos subtipos mais avançados da doença a frequência de casos com alterações cromossômicas foi maior. As anomalias cromossômicas mais frequentes foram: -7/7q e del(11q). A análise citogenética auxiliou no diagnóstico dos casos com suspeita de SMD primária pediátrica e foi uma importante ferramenta para a escolha do tratamento. O estudo da presença de metilação na região promotora dos genes $p15^{INK4b}$ e $p16^{INK4a}$ revelou que 28,6% (22/77) dos pacientes apresentaram metilação para o gene $p15^{INK4b}$ e apenas 7,8% (6/77) para o gene $p16^{INK4a}$, sendo as maiores frequências observadas nos subtipos mais avançados de SMD. A análise de metilação do gene *MDR-1* mostrou ausência de metilação na região estudada, tanto nas amostras de medula óssea dos 7 indivíduos saudáveis (doadores de medula óssea) quanto nos 77 pacientes pediátricos com SMD. Metilação em $p15^{INK4b}$ mostrou uma forte associação com alterações envolvendo o cromossomo 7, sugerindo uma provável via de evolução da doença. A mediana referente aos níveis relativos de expressão dos genes *EZH2* e *MDR-1* nos pacientes foi maior em relação a mediana dos doadores. Os níveis relativos de expressão do gene *EZH2* foram maiores nos subtipos AREB/AREB-t. No entanto, os níveis relativos de expressão do gene *MDR-1* foi semelhante em CR e AREB/AREB-t. Em relação aos cariótipos, observamos que os pacientes com cariótipos anormais, apresentaram maior níveis relativos de expressão dos genes *EZH2* e *MDR-1* quando comparado com pacientes com cariótipo normal. Nossos resultados sugerem que as alterações cromossômicas, -7/7q-, del(11)(q23) e cariótipos complexos e a presença de metilação em $p15^{INK4b}$ estão associadas com mau prognóstico, sendo prováveis biomarcadores de evolução da doença.

Palavras-chave: Síndrome mielodisplásica primária. Infância. Alterações citogenéticas. Alterações epigenéticas. Padrão de expressão. Genes $p15^{INK4b}$, $p16^{INK4a}$, *MDR-1* e *EZH2*.

ABSTRACT

RODRIGUES, Eliane Ferreira. *Characterization of chromosomal and molecular alterations in childhood primary myelodysplastic syndrome in Rio de Janeiro State*. 2014. 172 f Tese (Doutorado em Ciências Médicas) – Faculdade de Ciências Médicas, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2014.

The primary myelodysplastic syndrome (MDS) is rare in childhood, representing about 4% of all pediatric hematologic malignancies. The natural history of this disease is extremely variable, some patients may have milder forms, with high survival and low rate of leukemic transformation. However, about 10 to 40% of cases progress to acute myeloid leukemia (AML). This work had as principal aim analyse bone marrow cells of pediatric patients with primary MDS for their cytogenetic, molecular and clinical features, in order to identify genetic and epigenetic markers to aid diagnosis and prognosis, as well as to contribute for the knowledge of alterations that lead to disease development and its evolution to AML. Our results showed the presence of abnormal karyotypes in 56.5% (65/115) in pediatric patients with primary MDS. According to the classification of childhood MDS, 78 patients had CR, 22 RAEB and 15 RAEB-t. It was included in our study three patients with Down Syndrome who had MDS. In more advanced disease subtypes the frequency of cases with chromosomal abnormalities was higher. The most frequent chromosomal abnormalities were -7/7q and del(11q). Cytogenetic analyses aided in the diagnosis of cases with suspected of primary pediatric MDS and it was an important tool for the treatment choice. The study of the presence of methylation in the promoter region of $p15^{INK4b}$ and $p16^{INK4a}$ genes revealed that 28.6% (22/77) showed methylation for the $p15^{INK4b}$ gene and only 7.8% (6/77) for the $p16^{INK4a}$ gene, being the higher frequencies observed in more aggressive subtypes of MDS. The methylation analysis of the *MDR-1* gene showed that both, the bone marrow samples from 7 health individuals (bone marrow donors) as the 77 pediatric patients, showed unmethylation at the investigated region. Methylation at $p15^{INK4b}$ gene showed a strong association with abnormalities involving chromosome 7, suggesting a possible pathway of disease progression. The analysis of relative expression of *MDR-1* and *EZH2* genes showed that both genes had high expression levels in patients with MDS compared to the health individuals. The median of relative expression levels of *EZH2* and *MDR-1* genes in MDS patients was higher than the median obtained in donors. The relative expression levels of *EZH2* gene were higher in the RAEB / RAEB-t subtypes. However, the relative expression levels of *MDR-1* gene were similar in CR and RAEB / RAEB-t. Regarding karyotypes, we observed that abnormal karyotypes showed higher relative expression levels of *EZH2* and *MDR-1* when compared with normal karyotypes. Our results suggest that the chromosomal alterations, -7/7q-, del (11)(q23) and complex karyotype; and the presence of methylation in $p15^{INK4b}$ are associated with poor prognosis and they are probably biomarkers of disease evolution.

Keywords: Primary myelodysplastic syndrome. Childhood. Cytogenetic alterations. Epigenetic alterations. Expression pattern. $p15^{INK4b}$, $p16^{INK4a}$, *MDR-1* and *EZH2* genes.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Classificação da síndrome mielodisplásica na infância.....	29
Figura 2 -	Região de metilação na sequência do DNA e adição do grupamento metila pelas enzimas DNMTs.....	37
Figura 3 -	Atividade transcricional do gene de acordo com o padrão de metilação....	38
Figura 4 -	Modelo para o silenciamento transcricional dependente de metilação.....	39
Figura 5 -	Genes <i>p15</i> e <i>p16</i> , membros da família INK4 de inibidores do ciclo celular.....	41
Figura 6 -	Interação e efeitos do gene <i>EZH2</i> na regulação da repressão transcricional.....	43
Figura 7 -	Efeito do tratamento com bisulfito em uma amostra de DNA com sequências ricas em dinucleotídeo CpG.....	54
Figura 8 -	Gráfico de setores mostrando a frequência de cariótipos normais versus cariótipos anormais em pacientes pediátricos com SMD primária.....	64
Figura 9 -	Gráfico de barras mostrando a frequência das alterações cromossômicas clonais em SMD primária na infância.....	68
Figura 10 -	Análise por citogenética clássica, bandeamento GTG, mostrando alteração cromossômica biclonal.....	70
Figura 11 -	Análise por citogenética molecular (FISH) utilizando as sondas dos genes <i>TP53</i> e <i>MLL</i>	71
Figura 12 -	Análise por citogenética clássica e citogenética molecular (FISH). Cariótipo feminino, bandeamento GTG, mostrando a alteração cromossômica del(5)(q15q35). FISH utilizando a sonda de dupla marcação do cromossomo 5.....	72
Figura 13 -	Análise por citogenética clássica e citogenética molecular (FISH). Cariótipo feminino, bandeamento GTG, mostrando a alteração cromossômica: der(17)t(1?;17)(q32?;p13). FISH utilizando a sonda do gene <i>TP53</i>	73
Figura 14 -	Análise por citogenética clássica e citogenética molecular (FISH). Cariótipo masculino mostrando alteração cromossômica complexa. FISH utilizando a sonda de pintura cromossômica WCP3, WCP15 e WCP7.....	75

Figura 15 -	Análise por citogenética clássica e citogenética molecular (FISH). Cariótipo masculino, bandeamento GTG, mostrando a alteração cromossômica -7. FISH utilizando a sonda de dupla marcação do cromossomo 7.....	76
Figura 16 -	Gráficos de setores mostrando a frequência de pacientes pediátricos com SMD primária que apresentaram o padrão metilado versus não metilado para os genes $p15^{INK4b}$ e $p16^{INK4a}$	82
Figura 17 -	Figura representativa das técnicas de MSP e sequenciamento	83
Figura 18 -	Figura representativa da técnica COBRA para os genes $p15^{INK4b}$ e $p16^{INK4a}$	85
Figura 19 -	Figura representativa das técnicas COBRA e sequenciamento para o gene <i>MDR-1</i>	85
Figura 20 -	Figura representativa da análise do gene <i>MDR-1</i> pela técnica de HRM	87
Figura 21 -	Gráfico de barras mostrando a associação entre a presença de metilação na região promotora dos genes $p15^{INK4b}$ e $p16^{INK4a}$ com o cariótipo em pacientes com SMD primária na infância.....	88
Figura 22 -	Análise dos níveis relativos de expressão do gene <i>EZH2</i> nos pacientes pediátricos com SMD primária.....	92
Figura 23 -	Análise dos níveis relativos de expressão do gene <i>MDR-1</i> nos pacientes pediátricos com SMD primária.....	93

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Classificação da SMD segundo os critérios propostos pelo Grupo FAB em 1982.....	22
Tabela 2 -	Classificação da SMD segundo a proposta da OMS em 2008.....	24
Tabela 3 -	Pontuação segundo os parâmetros críticos do IPSS (1997) em SMD primária.....	25
Tabela 4 -	Distribuição de grupos de risco citogenéticos para SMD primária.....	26
Tabela 5 -	Diferenças entre SMD primária em pacientes pediátricos e adultos.....	28
Tabela 6 -	Mutações em genes relacionados ao prognóstico desfavorável em SMD primária.....	34
Tabela 7 -	Genes frequentemente metilados em SMD primária.....	40
Tabela 8 -	Oligonucleotídeos utilizados na técnica MSP para análise dos genes <i>p15^{INK4b}</i> e <i>p16^{INK4a}</i>	56
Tabela 9 -	Oligonucleotídeos utilizados na técnica de COBRA para a análise dos genes <i>p15^{INK4b}</i> , <i>p16^{INK4a}</i> e <i>MDR-1</i>	57
Tabela 10 -	Oligonucleotídeos utilizados para a análise de expressão dos genes <i>MDR-1</i> e <i>EZH2</i> em síndrome mielodisplásica primária na infância	62
Tabela 11 -	Frequência de casos com cariótipos anormais em SMD primária e SD/SMD em pacientes pediátricos.....	65
Tabela 12 -	Distribuição do padrão cromossômico segundo a classificação da SMD primária na Infância.....	67
Tabela 13 -	Alterações cromossômicas associadas com a evolução da doença.....	77
Tabela 14 -	Evolução cariotípica em pacientes pediátricos com SMD primária e SD/SMD.....	79
Tabela 15 -	Frequência de pacientes pediátricos com SMD nos diferentes grupos de risco de acordo com o IPSS (1997) e evolução da doença.....	80
Tabela 16 -	Frequência de pacientes pediátricos com SMD nos diferentes grupos de risco citogenéticos de acordo com o IPSS e evolução da doença.....	80
Tabela 17 -	Frequência de pacientes pediátricos com SMD nos diferentes grupos de risco citogenéticos de acordo com o IPSS-R (2012) e evolução da doença.....	81

Tabela 18 - Análise de metilação dos genes $p15^{INK4b}$ e $p16^{INK4a}$ em SMD primária na infância pela técnica de MSP.....	84
Tabela 19 - Correlação entre o padrão de metilação na região promotora dos genes $p15^{INK4b}$ e $p16^{INK4a}$ com as características clínicas dos pacientes pediátricos com SMD primária.....	90

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

A	adenina
ALIP	localização anormal de precursores imaturos ("abnormal localization of immature precursors")
AR	anemia refratária
ARDM	anemia refratária com displasias multilinhagem
ARDM-SA	anemia refratária com displasias multilinhagem com sideroblastos em anel
AREB	anemia refratária com excesso de blastos
AREB-t	anemia refratária com excesso de blastos em transformação
ARSA	anemia refratária com sideroblastos em anel
ARA-C	arabinosídeo citosina
<i>ASXL1</i>	gene "additional sex combs like 1"
ATG	globulina anti-timócito
<i>BCL2</i>	gene "B cell lymphoma 2"
<i>Bmi1</i>	gene "B cell specific Moloney murine leukemia virus integration site 1"
C	citosina
CDK	quinase dependente de ciclina
CDKI	inibidor de quinase dependente de ciclina
CEMO	Centro de Transplante de Medula Óssea
COBRA	análise combinada de bisulfito com enzima de restrição ("combined bisulfite restriction analysis")
CpG	região de alta densidade de dinucleotídeos citosina-guanina
CR	citopenia refratária
<i>CSF-1</i>	gene fator estimulador de colônia 1 ("colony stimulator factor-1")
<i>CSF1R</i>	gene receptor do fator estimulador de colônia 1 ("colony stimulator factor- 1 receptor")
CTH	células tronco hematopoéticas
Chtb	quebras cromatídicas
<i>CUX1</i>	gene "cut like homeobox 1"

DAPI	4,6-diamidino-2-fenilindol
<i>DAPK</i>	gene "death-associated protein kinase 1"
dATP	2' desoxiadenosina 5' trifosfato
dCTP	2' desoxicitidina 5' trifosfato
del	deleção
dGTP	2' desoxiguanosina 5' trifosfato
DNA	ácido desoxirribonucleico
DNMT	DNA metiltransferase
dNTPs	desoxirribonucleotídeos trifosfatos
dTTP	2' desoxitimidina 5' trifosfato
<i>EDD</i>	gene "E3 isolated by diferencial display"
EDTA	ácido etilenodiaminotetrácético
<i>EGR1</i>	gene "early growth response 1"
EPO	eritropoetina
<i>ER</i>	gene receptor de estrogênio ("estrogen receptor")
<i>ETV6</i>	gene "E26 transformation -specific variant 6"
<i>EZH2</i>	gene "enhancer of zeste homolog 2"
FAB	Grupo Franco-Americano-Britânico
FISH	hibridização "in situ" por fluorescência
FITC	isotiocianato de fluoresceína
<i>FLT3</i>	gene tirosino-quinase 3 relacionada a FMS ("FMS-like tyrosine kinase 3")
<i>FMS</i>	gene fator estimulador de monócitos e macrófagos ("stimulating factor 1 the macrophage and monocyte")
G	guanina
GCB-MDS-PED	Grupo Cooperativo Brasileiro em síndrome mielodisplásica pediátrica
GDP	guanosina 5' difosfato
GM-CSF	fator de estimulação de colônias granulócito-macrófago
GTG	Giensa-Tripsina-Giensa
GTP	guanosina 5' trifosfato
GTPase	guanosina trifosfatase
G6PD	glicose 6 fosfato desidrogenase

HDACs	histonas desacetilases
HLA	antígeno de histocompatibilidade
HPRT	hipoxantina fosforibosil transferase
<i>HPC</i>	gene "hereditary prostate cancer 1"
<i>HPH</i>	gene "hygromyom phosphotransferase "
HRM	dissociação de alta resolução ("high resolution melting")
IMT	inibidor da metiltransferase
INCA	Instituto Nacional do Câncer
inv	inversão
IPSS	Sistema Internacional de Escala Prognóstica ("International Prognostic Scoring System")
IPSS-R	Sistema Internacional de Escala Prognóstica- Revisado ("Revised International Prognostic Scoring System")
ISCN	Sistema Internacional de Nomenclatura de Citogenética Humana ("International System for Human Cytogenetic Nomenclature")
Kb	quilobases
K-Ras	proto-oncogene da familia Ras ("Rat- sarcoma")
LA	leucemia aguda
LLA	leucemia linfoblástica aguda
LMA	leucemia mielóide aguda
LMC	leucemia mielóide crônica
LMMC	leucemia mielomonocítica crônica
LMMJ	leucemia mielomonocítica juvenil
M	metilado
<i>MDR1</i>	gene de resistência a múltiplas drogas 1 ("multiple drugs resistance")
<i>MEL18/PcGF2</i>	gene "polycomb group ring finger 2"
mL	mililitro
<i>MLL</i>	gene "mixed leukemia lineage"
MO	medula óssea
MPBs	proteínas ligadoras de CpGs metilados ("methyl protein binding")
MSP	reação em cadeia da polimerase específica para a metilação ("methylation specific-PCR")

<i>NF1</i>	gene neurofibromatose do tipo 1 ("neurofibromin 1")
<i>NPM1</i>	gene "nucleophosmin (nucleolar phosphoprotein B23)"
<i>N-Ras</i>	gene da família Ras ("Rat- sarcoma")
OMS	Organização Mundial de Saúde
p	braço curto do cromossomo
PCR	reação em cadeia da polimerase
PRC1/2	complexo de proteínas repressivo 1/2
PcG	grupo de proteínas Polycomb
Ph	cromossomo Philadelphia
pRB	proteína de retinoblastoma
<i>PTEN</i>	gene "phosphatase and tensin homolog"
q	braço longo do cromossomo
QMS-PCR	quantificação da metilação através da reação em cadeia da polimerase ("quantitative methylation specific - Polymerase chain reaction")
<i>RBAP48</i>	gene "retinoblastoma associated protein 48"
<i>RIZ</i>	gene "retinoblastoma protein interacting zing finger"
RNA	ácido ribonucleico
<i>RPL23</i>	gene "ribosomal protein L23"
rpm	rotações por minuto
RPMI	"Roswell Park Memorial Institute" - meio de cultivo de células
<i>RPS25</i>	gene "ribosomal protein subunits 25"
<i>RPS4X</i>	gene "ribosomal protein subunits 4, X-linked"
RT-qPCR	reação em cadeia da polimerase da transcrição reversa em tempo real
<i>RUNX1</i>	gene "runt-related transcription factor 1"
SAM	S-adenosil-L-metionina
SD	Síndrome de Down
<i>SETBP1</i>	gene "set binding protein 1"
<i>SF3B</i>	gene "splicing factor 3b"
SMD	Síndrome Mielodisplásica
SMP	Síndrome Mieloproliferativa
<i>SOCS</i>	gene "suppressor of cytokine signaling"
SP	sangue periférico

<i>SRSF</i>	gene "serine/arginine rich splicing factor"
<i>SUZ12</i>	gene do complexo repressivo Polycomb PRC2
T	timina
t	translocação
TCTCU	transplante de células tronco de cordão umbilical
TCTH	transplante de células tronco hematopoéticas
<i>TET</i>	gene "ten-eleven translocation"
<i>TGFβ</i>	gene fator de crescimento transformante beta ("transforming growth factor beta")
<i>TNF-α</i>	gene fator de necrose tumoral- alfa ("tumor necrosis factor")
<i>TNFR-α</i>	gene receptor de fator de necrose tumoral- alfa ("tumor necrosis factor receptor")
<i>TP53</i>	gene supressor de tumor p53
U	não metilado
<i>U2AF1</i>	gene "U2 small nuclear RNA auxiliary factor 1"
WPSS	sistema de escala prognóstica baseado na classificação OMS (" WHO classification-based Prognostic Scoring System")

LISTA DE SÍMBOLOS

+	ganho de cromossomo
-	perda de cromossomo
°C	graus Celsius

SUMÁRIO

	INTRODUÇÃO	20
1	OBJETIVOS	48
1.1	Geral	48
1.2	Específicos	48
2	MATERIAIS E MÉTODOS	49
2.1	Pacientes	49
2.2	Análise citogenética	49
2.2.1	<u>Cultura de células da medula óssea</u>	49
2.2.2	<u>Término das culturas e preparação das lâminas</u>	50
2.2.3	<u>Bandeamento GTG</u>	50
2.2.4	<u>Análise cromossômica</u>	51
2.2.5	<u>Citogenética molecular: análise por Hibridização “in situ” por Fluorescência (FISH)</u>	51
2.3	Análise molecular	52
2.3.1	<u>Extração de DNA</u>	52
2.3.2	<u>Avaliação da integridade e quantificação do DNA</u>	53
2.3.3	<u>Análise do padrão de metilação da região promotora dos genes $p15^{INK4b}$, $p16^{INK4a}$ e $MDR-1$ em pacientes pediátricos com SMD primária</u>	53
2.3.4	<u>Reação em cadeia da polimerase específica para a metilação: técnica MSP</u> ...	55
2.3.5	<u>“Combined bisulfite restriction analysis”:</u> técnica COBRA	57
2.3.6	<u>Sequenciamento</u>	58
2.3.7	<u>Métodos quantitativos para a análise dos níveis de metilação na região promotora dos genes $p15^{INK4b}$, $p16^{INK4a}$ e $MDR-1$</u>	59
2.3.8	<u>Análise de expressão dos genes $MDR-1$ e $EZH2$ em pacientes pediátricos com SMD primária</u>	61
2.3.8.1	<u>Extração de RNA e obtenção de cDNA</u>	61
2.3.8.2	<u>Reação em cadeia da polimerase da transcriptase reversa em tempo real</u>	62
2.4	Análise estatística	63
2.5	Fluxograma dos métodos utilizados para pesquisa de alterações citogenéticas e moleculares em crianças com SMD primária	63

3	RESULTADOS	64
3.1	Análise citogenética em síndrome mielodisplásica primária na infância ...	64
3.1.1	<u>Distribuição do padrão promossômico em estágio inicial (CR) e avançados (AREB e AREB-t) da SMD primária na infância</u>	65
3.1.2	<u>Citogenética molecular: aplicação do FISH em SMD primária na infância</u>	69
3.1.3	<u>Alterações cromossômicas observadas durante a evolução da doença (SMD → LMA)</u>	77
3.2	Distribuição dos pacientes com SMD primária na infância segundo os grupos de risco classificados pelo IPSS	79
3.3	Análise molecular	81
3.3.1	Análise da frequência de metilação na região promotora dos genes <i>p15^{INK4b}</i> , <i>p16^{INK4a}</i> pela técnica de MSP em pacientes com SMD primária na infância.....	81
3.3.2	Análise de metilação dos genes <i>p15^{INK4b}</i> , <i>p16^{INK4a}</i> e <i>MDR-1</i> pela técnica COBRA	84
3.3.3	Análise quantitativa de metilação dos genes <i>p15^{INK4b}</i> , <i>p16^{INK4a}</i> e <i>MDR-1</i>	86
3.3.4	Correlação entre a presença de metilação na região promotora dos genes <i>p15^{INK4b}</i> e <i>p16^{INK4a}</i> com os cariótipos e com as características clínicas	87
3.3.5	Análise do padrão de expressão dos genes <i>MDR-1</i> e <i>EZH2</i> em pacientes com SMD primária na infância	91
4	DISCUSSÃO	94
	CONCLUSÕES	112
	REFERÊNCIAS	113
	APÊNDICE A - Tabela 1: Análise citogenética em síndrome mielodisplásica primária na infância	131
	APÊNDICE B - Cytogenetic biclonality in a child with hypocellular primary myelodysplastic syndrome (Artigo publicado)	144
	APÊNDICE C - Transient myelodysplasia in an infant with Down syndrome preceding acute megakaryoblastic leukemia: cytogenetic and immunophenotypic findings (Artigo publicado)	147
	APÊNDICE D - Tabela 2: Correlação entre a presença de metilação nos genes <i>p15^{INK4b}</i> e <i>p16^{INK4a}</i> com o padrão cromossômico em SMD primária na infância	150
	APÊNDICE E - Epigenetic alterations of <i>p15^{INK4B}</i> and <i>p16^{INK4A}</i> genes in pediatric primary myelodysplastic syndrome (Artigo publicado).....	153

APÊNDICE F - Accurate monitoring of promoter gene methylation with high-resolution melting polymerase chain reaction using the <i>ABCB1</i> gene as a model (Artigo publicado)	161
ANEXO A - Termo de Consentimento do Comitê de Ética em Pesquisa	170
ANEXO B - Prêmio Newton Freire-Maia de melhor trabalho na área de Genética e Evolução Humana e Genética.....	172

INTRODUÇÃO

A síndrome mielodisplásica (SMD) compreende um grupo heterogêneo de doenças hematopoéticas de natureza clonal de célula tronco pluripotente. É caracterizada por uma hematopoese ineficaz, apoptose intramedular aumentada, presença de displasias na medula óssea e citopenias em uma ou mais linhagens no sangue periférico. A SMD ocorre com maior incidência em indivíduos acima dos 55 anos de idade, sendo considerada rara na infância. Cerca de 10 a 40% dos casos evoluem para leucemia mielóide aguda (LMA) e em raros casos para leucemia linfóide aguda (LLA) ou leucemia bifenotípica (DELFORGE *et al.*, 2003; NISHINO & CHANG, 2005; JÄDERSTEN & HELLSTROM-LINDBERG, 2009; GARCIA-MANERO, 2012).

A SMD primária, ou “de novo”, ocorre quando o paciente não foi submetido a nenhum tratamento prévio com medicamentos citotóxicos nem esteve em contato com agentes mutagênicos, não havendo, portanto causa conhecida para o aparecimento da doença. Entretanto, há um consenso de que fatores hereditários, ambientais e a senescência da hematopoese podem influenciar no surgimento da SMD (LORAND-METZE, 2005). Uma grande variedade de agentes genotóxicos têm sido implicada na sua etiologia, sendo os mais conhecidos e estudados as drogas citotóxicas utilizadas no tratamento de um câncer primário, especialmente os agentes alquilantes e os inibidores da topoisomerase II, nestes casos a SMD é denominada secundária (NISSE *et al.*, 2001).

O diagnóstico da SMD é feito inicialmente através de um hemograma (que indica a presença de uma ou mais citopenias no sangue periférico e ausência de resposta para vitamina B12 e ácido fólico), seguido da análise de biópsia e de mielograma de medula óssea para identificar as displasias presentes, a possível presença de blastos caracterizando estágios mais avançados da doença e a presença de precursores imaturos com localização anormal (ALIP). O diagnóstico da SMD primária é considerado difícil, pois existem várias manifestações clínicas que podem apresentar um quadro histopatológico e clínico bastante semelhante ao da SMD, como por exemplo, deficiências nutricionais, infecções e condições congênitas. Nestes casos existe a necessidade do diagnóstico diferencial onde a presença de clonalidade caracteriza a SMD. Desta forma, a análise citogenética pode auxiliar o diagnóstico caracterizando alterações cromossômicas clonais e também contribuir para o prognóstico (VALLESPI *et al.*, 1998; NISHINO & CHANG, 2005; SOLÉ *et al.*, 2005; LOPES *et al.*, 2006; HAASE *et al.*, 2007; OLNEY & LE BEAU, 2007; TIU *et al.*, 2011; GIAGOUNIDIS &

HAASE, 2013). Outra metodologia que tem sido usada para auxiliar o diagnóstico e o prognóstico em SMD primária é a imunofenotipagem (HUANG *et al.*, 2012; WESTERS *et al.*, 2012; REIS-ALVES *et al.*, 2013).

Uma das características da SMD é a presença de citopenias periféricas, isoladas ou em associação. As citopenias mais comuns em SMD são anemia, neutropenia e a trombocitopenia. Outra característica é a presença de alterações morfológicas decorrentes de defeitos de diferenciação celular chamadas de displasias. Estas alterações ocorrem principalmente nas linhagens eritróide, granulocítica e megacariocítica (OGATA *et al.*, 2006; GIAGOUNIDIS & HAASE, 2013).

A celularidade da medula óssea é aumentada na maioria dos pacientes com mielodisplasia, sendo geralmente, hiper celular ou normocelular. Em alguns casos, os pacientes podem apresentar medula óssea hipocelular (WONG & SO, 2002; NIEMEYER & BAUMANN, 2011). A SMD é considerada hipocelular quando apresenta menos de 30% de celularidade em indivíduos jovens, e menos de 20% em indivíduos idosos (TOMONAGA & NAGAI, 2002; GIAGOUNIDIS & HAASE, 2013).

Como a SMD primária é uma doença extremamente heterogênea, o seu diagnóstico e a definição de fatores prognósticos muitas vezes é uma prática clínica difícil. Desta forma, nos últimos anos têm sido discutidas as classificações e as escalas prognósticas para os pacientes adultos e pediátricos com SMD primária.

Até 1980 as mielodisplasias incluíam uma variedade de anormalidades hematológicas classificadas como síndromes ou estados pré-leucêmicos. Entretanto, essas denominações eram insatisfatórias, não agrupando os pacientes que apresentavam uma hematopoese ineficaz e nem sempre evoluíam para leucemia aguda, ocorrendo complicações decorrentes das citopenias levando ao óbito. A terminologia "pré-leucemia" desapareceu e o termo síndrome mielodisplásica tornou-se amplamente aceito, surgindo em 1982 a classificação FAB.

Em 1982, o grupo internacional de hematologistas franceses, americanos e britânicos (o grupo FAB) propôs uma classificação para a SMD primária em 5 subgrupos: anemia refratária (AR), anemia refratária com sideroblastos em anel (ARSA), anemia refratária com excesso de blastos (AREB), anemia refratária com excesso de blastos em transformação (AREB-t) e leucemia mielomonocítica crônica (LMMC). Essa classificação foi baseada nas características morfológicas e na porcentagem de blastos na medula óssea e no sangue periférico (Tabela 1) (BENNETT *et al.*, 1982).

Tabela 1 - Classificação da SMD segundo os critérios propostos pelo Grupo FAB em 1982

<i>Subtipo</i>	<i>Monócitos</i>	<i>Sideroblastos</i>	<i>Células Blásticas (%)</i>		<i>Bastões de Auer Medula óssea</i>
	<i>(μ) Sangue Periférico</i>	<i>em anel (%) Medula óssea</i>	<i>Sangue Periférico</i>	<i>Medula óssea</i>	
AR	Não	< 15	< 1	< 5	Não
ARSA	Não	> 15	< 1	< 5	Não
AREB	Não	Não	< 5	5 - 20	Não
AREB-t	Não	Não	> 5	20 - 30	Sim ou Não
LMMC	> 1000	Não	< 5	< 20	Não

Legenda: AR- anemia refratária; ARSA- anemia refratária com sideroblastos em anel; AREB- anemia refratária com excesso de blastos; AREB-t- anemia refratária com excesso de blastos em transformação; LMMC- leucemia mielomonocítica crônica.

Fonte: Bennett et al., 1982.

Desde que foi introduzida, vários estudos comprovaram a utilidade da classificação FAB, tanto para o monitoramento de um grande número de pacientes com SMD, permitindo comparações entre os diversos estudos, quanto para o tratamento dos pacientes. No entanto, para a determinação de um prognóstico preciso, esta classificação apresentava alguns problemas: distinguia somente duas categorias de risco, baixo (AR e ARSA) e alto risco (AREB, AREB-t e LMMC). Além disso, dentro de um mesmo subgrupo FAB os pacientes mostravam grandes variações na evolução da doença e na sobrevivência, especialmente dentro dos subgrupos AR e ARSA. A denominação “anemia refratária” nem sempre é adequada, sendo a anemia apenas uma de três possíveis citopenias em SMD. Dessa forma, a expressão citopenia refratária foi sugerida por alguns autores (GARANDEAU *et al.*, 2000; HASLE *et al.*, 2007). A LMMC apresenta em alguns casos características de síndrome mielodisplásica e em outros de síndrome mieloproliferativa. Desta forma, sua inclusão na SMD vem sendo discutida em outras classificações, como a classificação da organização mundial da saúde (OMS) (HARRIS *et al.*, 2000; MALCOVATI & NIMER, 2008).

A classificação da Organização Mundial de Saúde (OMS) foi criada em 2000. Essa classificação utilizou muitos conceitos e definições da classificação FAB e os conhecimentos das características citogenéticas e moleculares para melhorar a definição dos subgrupos, assim como a relevância clínica, no sentido de aperfeiçoar os critérios de diagnóstico e melhorar a definição do prognóstico (HARRIS *et al.*, 2000). A maior diferença entre as duas

classificações é o desaparecimento do subgrupo AREB-t, sendo considerada a evolução para LMA a partir de 20% de blastos na medula óssea.

No sistema de classificação proposta pela OMS foram considerados os seguintes subgrupos: as anemias refratárias, com ou sem sideroblastos, divididas em AR e ARSA, quando a medula óssea apresenta somente uma displasia, e em anemia refratária com displasia multi-linhagem (ARDM) e ARDM com sideroblastos em anel (ARDM-SA), quando a medula óssea apresenta várias displasias. Foram criados dois subtipos para AREB: AREB-1 (5 a 9% de blastos na medula óssea) e AREB-2 (10 a 19% de blastos na medula óssea). A classificação OMS também reconhece a “síndrome 5q-” (SMD primária associada à deleção do braço longo do cromossomo 5) como uma entidade clínica separada. Foi criado um grupo de SMD inclassificável, o qual inclui os pacientes com displasia significativa de uma única linhagem, mas sem outros critérios de classificação (OLNEY & LE BEAU, 2001; MUFTI *et al.*, 2008; JÄDERSTEN & HELLSTROM-LINDBERG, 2009). Também foi criada uma categoria separada para a LMMC, a categoria “doenças mielodisplásicas/mieloproliferativas”, por ainda existir polêmica sobre a natureza mielodisplásica ou mieloproliferativa desta doença (HARRIS *et al.*, 2000; VARDIMAN *et al.*, 2002).

Apesar de ter como objetivos melhorar o valor prognóstico e clínico da classificação FAB, esta classificação também recebeu críticas (HELLSTRÖM-LINDBERG, 2000; HEAD *et al.*, 2002). As principais falhas apontadas foram a criação de categorias imprecisas e sem bases biológicas, clínicas ou genéticas (citopenias refratárias com displasias de várias linhagens e SMD inclassificável) e a falta de precisão prognóstica. Nösslinger e colaboradores (2001) aplicaram as duas classificações em 431 pacientes com SMD primária e correlacionaram com os dados clínicos, morfológicos e citogenéticos; concluíram que a classificação OMS não apresentava vantagens em relação à classificação FAB, que continuou sendo a mais utilizada até 2008 (VARMA & VARMA, 2009).

Em 2008, a OMS fez uma revisão de sua classificação com o objetivo de reduzir os pacientes classificados como SMD inclassificáveis e tornar as categorias mais precisas (Tabela 2). No novo sistema de classificação da OMS foram definidas três categorias de citopenia refratária com displasia unilinhagem (CRDU): anemia refratária (AR), neutropenia refratária (NR) e trombocitopenia refratária (TR); e as citopenias refratárias com displasia multilinhagem com ou sem sideroblastos em anel não são categorizadas como grupos separados, uma vez que apresentam essencialmente o mesmo prognóstico. Nesta nova classificação o grupo LMMC é considerado como uma doença mieloproliferativa

(JÄDERSTEN & HELLSTROM-LINDBERG, 2009). A classificação OMS-2008 vem sendo utilizada na prática clínica, no entanto, diversos estudos continuam sendo publicados utilizando a classificação FAB, por esta ser mais simples e também por apresentar o subgrupo AREB-t que possibilita caracterizar as alterações citogenéticas e moleculares envolvidas no estágio de transformação de SMD para LMA (STEENSMA *et al.*, 2009; ECONOMOPOULOU *et al.*, 2010; SEYMOUR *et al.*, 2010).

Tabela 2 - Classificação da SMD segundo a proposta da OMS em 2008

Subtipo	Sangue Periférico	Medula Óssea
- CRDU - AR - NR - TR	Unicitopenia ou bicitopenia Blastos raros (<1%) ou ausentes	Displasia unilinhagem; $\geq 10\%$ das células da linhagem afetada são displásicas; <5% blastos; <15% precursores eritróides são sideroblastos em anel
ARSA	Anemia, eritrócitos anormais Blastos ausentes	Apenas displasia eritróide; <5% blastos; $\geq 15\%$ sideroblastos em anel
CRDM	Citopenia(s); Blastos raros (<1%) ou ausente; Monócitos $< 1 \times 10^9/L$ Ausência de corpos de Auer	Displasia em $\geq 10\%$ das células em duas ou mais linhagens mielóides; <5% de blastos; +/-15% de sideroblastos em anel; Ausência de corpos de Auer
AREB-1	Citopenias; <5% de blastos Ausência de corpos de Auer Monócitos $< 1 \times 10^9/L$	Displasia uni ou multilinhagem 5-9% blastos Ausência de corpos de Auer
AREB-2	Citopenias; 5-19% de blastos Corpos de Auer +/-; Monócitos $< 1 \times 10^9/L$	Displasia uni ou multilinhagem; 10-19% de blastos Corpos de Auer +/-
Síndrome 5q-	Anemia Contagem de plaquetas normal ou aumentada Blastos raros (<1%) ou ausentes Ausência de corpos de Auer	Megacariócitos normais a aumentados com núcleo hipolobulado del(5q) isolada <5% de blastos Ausência de corpos de Auer
SMD não classificada	Citopenias Blastos raros ou ausentes (<1%) Ausência de corpos de Auer	Displasia em <10% das células em duas ou mais linhagens celulares mielóides <5% de blastos Ausência de corpos de Auer

Legenda: CRDU: Citopenia Refratária com Displasia Unilinhagem; AR: Anemia Refratária; NR: Neutropenia Refratária; TR: Trombocitopenia Refratária; ARSA: Anemia Refratária com Sideroblastos em Anel; CRDM: Citopenia Refratária com Displasia Multi-linhagem; AREB: Anemia Refratária com Excesso de Blastos.

Fonte: Adaptado de JÄDERSTEN & HELLSTRÖM-LINDBERG, 2009.

Vários estudos têm sido realizados com o objetivo de determinar quais os fatores que mais influenciam a sobrevivência e evolução da SMD para LMA, de modo a permitir a elaboração de escalas prognósticas auxiliando na escolha do tratamento.

A classificação de grupos de risco em SMD primária mais utilizada corresponde ao Sistema Internacional de Escala Prognóstica (IPSS) desenvolvido em 1997 (GREENBERG *et al.*, 1997). Greenberg e colaboradores (1997) após estudarem retrospectivamente 816 pacientes adultos com SMD, concluíram que a porcentagem de blastos na medula óssea, o número de citopenias no sangue periférico e a citogenética são os fatores prognósticos de maior importância, tanto para o tempo de sobrevida, quanto para a taxa de transformação leucêmica. A maneira como a pontuação foi atribuída a cada parâmetro está descrita na tabela 3. O IPSS dividiu, então, a SMD primária em quatro grupos: baixo, intermediário 1, intermediário 2 e alto risco. Esse sistema apresenta uma importante aplicação clínica, auxiliando na escolha do tratamento dos pacientes com SMD primária.

Tabela 3 - Pontuação segundo os parâmetros críticos do IPSS (1997) em SMD primária

<i>Variáveis Prognósticas</i>	<i>Pontuação</i>				
	0	0,5	1	1,5	2,0
Blastos M.O.	< 5%	5 -10%	-	11 - 20%	21 - 30%
Prognóstico Cariotípico *	Bom	Intermediário	Mau		
Citopenias	0 – 1	2 – 3			

Legenda: “Pontuação” para os grupos de risco: Baixo risco (0 pontos); Intermediário 1 (0,5-1,0 pontos); Intermediário 2 (1,5-2,0); Alto risco (> ou = 2,5). Cariótipos*: bom prognóstico: cariótipos normais, -Y, del(5q), del(20q), mau prognóstico: cariótipos complexos, anomalias envolvendo o cromossomo 7; prognóstico intermediário: outras anomalias cromossômicas.

Fonte: GREENBERG *et al.*, 1997.

Em 2007, Malcovati e colaboradores verificaram que a dependência de transfusão apresentava um efeito significativo na sobrevida dos pacientes com SMD primária. Portanto, pode ser visto como um indicador independente da severidade da doença. Dessa forma, este grupo, desenvolveu o sistema de escala prognóstica baseado na classificação da organização mundial da saúde (WPSS), o qual utiliza como variáveis a classificação OMS, a citogenética e a dependência transfusional para indicar a sobrevida e a evolução leucêmica de pacientes com SMD primária (MALCOVATI *et al.*, 2007).

O WPSS identificou 5 grupos de risco em pacientes com SMD: muito baixo, baixo, intermediário, alto e muito alto. A vantagem mais relevante na capacidade prognóstica desta escala foi observada entre os grupos de SMD sem excesso de blastos (MALCOVATI *et al.*, 2007). Poucos estudos de comparação entre essas duas escalas prognósticas foram realizados. Park e colaboradores (2008), em um estudo com 190 pacientes, observaram que o WPSS ofereceu uma estratificação de risco bastante acurada para os pacientes com SMD. As três variáveis do WPSS tiveram boa correlação com a sobrevida global e o tempo de evolução para leucemia.

Apesar de alguns estudos procurarem introduzir novos parâmetros prognósticos, o IPSS continua sendo amplamente utilizado (VARMA & VARMA, 2009; GARCIA-MANERO, 2012). No entanto, este sistema tem apresentado algumas críticas em relação a variação do prognóstico para os pacientes classificados no grupo de baixo risco e principalmente em relação ao valor prognóstico de algumas alterações cromossômicas (GARCIA-MANERO, 2012). Recentemente foi feita uma revisão do IPSS (IPSS-R), sendo agora reconhecidos 5 grupos de risco: muito baixo, baixo, intermediário, alto e muito alto (GREENBERG *et al.*, 2012). Nessa nova escala prognóstica, houve a inclusão de novas classificações de risco para a citogenética, a qual dividiu os pacientes em cinco grupos de risco: muito bom, bom, intermediário, mau e muito mau (tabela 4).

Tabela 4 - Distribuição de grupos de risco citogenéticos para SMD primária

Subgrupos citogenéticos	muito bom	Bom	intermediário	mau	muito mau
Cariótipos	-Y del(11q)	normal del(5q) del(12p) del(20q) e del(5q) acompanhada de outra alteração	del(7q) +8 +19 i(17q) outras e mais de uma alteração	-7 inv(3) t(3q) del(3q); -7/ del(7q) acompanhadas de outras alterações e complexo (até 3 alterações)	complexo: > 3 anormalidades

Fonte: GARCIA-MANERO, 2012.

Os sistemas de classificação tradicionais (FAB e OMS) e o sistema de escala prognóstica (IPSS) foram desenvolvidos com base nas características morfológicas, citogenéticas e clínicas de pacientes adultos. Isso porque existem vários estudos com um número significativo de pacientes adultos que permitiu a utilização de métodos estatísticos validando os fatores que hoje são utilizados para o diagnóstico e para o prognóstico em SMD primária.

Embora a SMD primária na infância seja considerada uma doença com características displásicas e hematopoese ineficaz, como a SMD do adulto, as características clínicas, a presença de anormalidades genéticas associadas e a caracterização das alterações cromossômicas têm refletido uma diferente questão biológica da SMD durante a infância (POLYCHRONOPOULOU *et al.*, 2004; HASLE & NIEMEYER, 2011; GLAUBACH *et al.*, 2014).

A SMD primária é uma doença rara na infância representando cerca de 4% de todas as malignidades hematológicas da infância (NIEMEYER & KRATZ, 2008; HASLE & NIEMEYER, 2011; RAU *et al.*, 2012; CHATTERJEE & CHOUDHRY, 2013; GLAUBACH *et al.*, 2014). O termo síndrome pré-leucêmica pediátrica apareceu na literatura inicialmente em 1970 (HUMBERT *et al.*, 1971). Em 1980, somente 11 pacientes pediátricos foram descritos e todos eles evoluíram para LMA (KLEIHAUER, 1980). O primeiro grande estudo em SMD na infância foi publicado em 1987, sendo incluídos 21 pacientes, os quais apresentaram um curso agressivo da doença (CREUTZIG *et al.*, 1987).

Em geral, o prognóstico da SMD primária na infância é considerado desfavorável, a maioria dos pacientes evolui a óbito. De acordo com dados do Grupo Cooperativo Brasileiro de Síndrome Mielodisplásica em Pediatria (GCB-SMD-PED), a sobrevida para as crianças que não possuem um doador de medula óssea compatível para o transplante de células tronco hematopoéticas alogênico é de apenas 20-25% em 5 anos nos subgrupos mais agressivos (LOPES & LATORRE., 2003). Essa baixa taxa de sobrevida se deve, principalmente, em decorrência da transformação leucêmica ou por complicações, como infecções e hemorragias. Em crianças a transformação leucêmica é mais rápida e pode ser observada em 15 a 70% dos pacientes, dependendo do tipo de SMD (JAKAB *et al.*, 1999; LOPES *et al.*, 2002; WOODS *et al.*, 2002).

Estudos têm mostrado algumas diferenças entre a SMD primária na infância e no adulto como: a incidência extremamente rara do subtipo ARSA em pacientes pediátricos, ao passo que em pacientes adultos consiste em cerca de 25% dos casos; a monossomia do 7 é a

alteração cromossômica mais frequente na infância e nos adultos é a deleção do braço longo do cromossomo 5; as possibilidades terapêuticas em pacientes adultos com SMD são limitadas devido a idade avançada, sendo indicado geralmente uma terapia paliativa, enquanto que nas crianças com SMD a principal terapia é a curativa, através do transplante de células tronco hematopoéticas alogênico (HASLE & NIEMEYER, 2003; HASLE & NIEMEYER, 2011). Na tabela 5 podemos observar as principais diferenças entre a SMD primária em pacientes pediátricos e adultos.

Tabela 5 - Diferenças entre SMD primária em pacientes pediátricos e adultos

Parâmetros	Crianças	Adultos
• Incidência/milhão	3.6	>35
• ARSA	<2%	25%
• Alterações Citogenéticas	60%	40%
• -7/7q-	30%	10%
• -5/5q-	1-2%	20%
• Anormalidades clínicas associadas	30%	<5%
• Objetivo principal do tratamento	Curativo	Paliativo

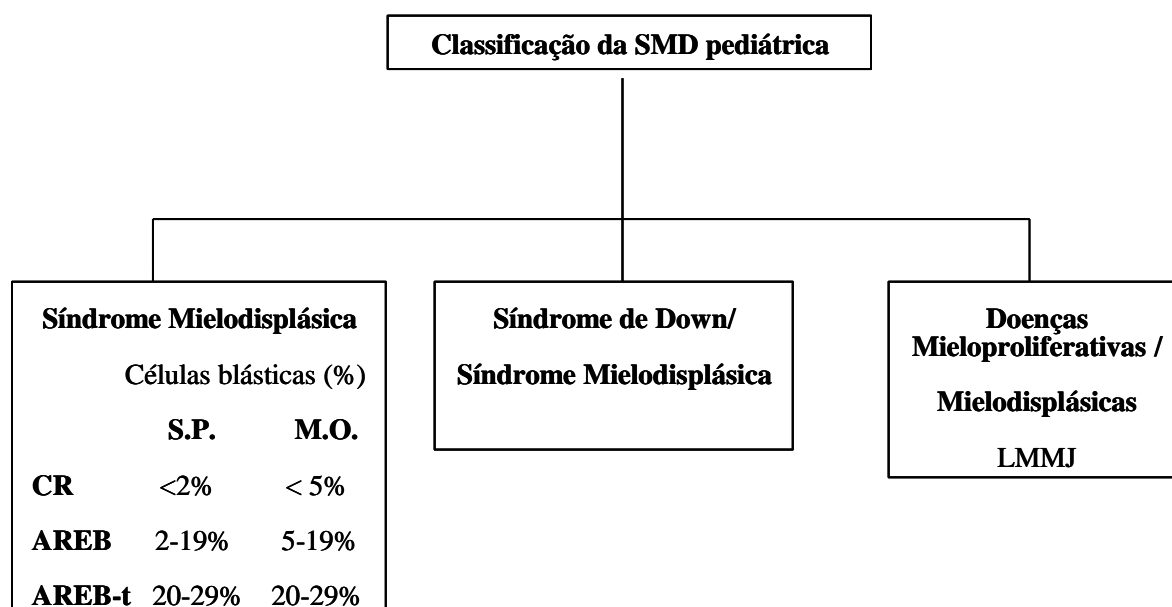
Fonte: HASLE & NIEMEYER, 2003.

A SMD primária na infância pode ocorrer em pacientes com alterações genéticas congênitas como: anemia de Fanconi, disqueratose congênita, neutropenia congênita severa, síndrome de Shwachman-Diamond, anemia aplástica adquirida ou SMD familiar. No entanto, até o momento, não existem estudos que realmente comprovem que a SMD pediátrica que ocorre em pacientes com anormalidades constitucionais difere daquela sem estas anormalidades (HASLE & NIEMEYER, 2011).

A utilização dos sistemas de classificação tradicionais como: FAB (BENNETT *et al.*, 1982) e OMS (HARRIS *et al.*, 2000), baseados em SMD do adulto, foi tema de muita discussão em SMD na infância. Isso porque a SMD na infância apresenta características específicas que dificultam a sua inclusão nestes sistemas de classificação. Hasle e colaboradores em 2003 sugeriram novos critérios para classificação da SMD da infância, sendo os critérios mínimos: citopenias sem uma causa esclarecida (anemia, neutropenia e trombocitopenia), pelo menos duas linhagens apresentando displasias, alteração citogenética clonal adquirida e número de blastos igual ou maior que 5% na medula óssea. A classificação da SMD na infância reconhece os seguintes subgrupos: o subgrupo da SMD primária

propriamente dita, o qual foi subdividido em citopenia refratária (< 2 % de blastos no S.P. e < 5% na M.O.), anemia refratária com excesso de blastos (2 – 19% de blastos no S.P e 5–19% na M.O.) e anemia refratária com excesso de blastos em transformação (20 -29% de blastos no S.P e 20–29% na M.O.); o subgrupo dos pacientes com Síndrome de Down que apresentam SMD e o subgrupo das doenças mielodisplásicas /mieloproliferativas (SMP) representado pela leucemia mielomonocítica juvenil (LMMJ) (Figura 1).

Figura 1 - Classificação da síndrome mielodisplásica na infância



Legenda: CR: Citopenia Refratária; AREB: Anemia Refratária com Excesso de Blastos; AREB-t: Anemia Refratária com Excesso de Blastos em transformação; LMMJ: Leucemia Mielomonocítica Juvenil; SP: Sangue Periférico; MO: Medula Óssea.

Fonte: adaptada de HASLE *et al.*, 2003.

A LMMJ ocorre principalmente em meninos com menos de 2 anos de idade. Esses pacientes apresentam em geral hepato-esplenomegalia, febre, infecção, sangramento, alta contagem leucocitária com uma monocitose absoluta, anemia, trombocitopenia e hemoglobina fetal aumentada. Citogeneticamente, a LMMJ é caracterizada em 25-30% dos casos pela monossomia do cromossomo 7. Cerca de 10% dos pacientes apresentam outras alterações cromossômicas e em cerca de 60% dos casos os cariótipos são normais. Molecularmente, a LMMJ é frequentemente caracterizada por mutações nos genes *NF1*, *N-ras* e *PTPN11*, apresentando a via de sinalização para proliferação celular ativada (CHAN *et al.*, 2009). Devido a LMMJ apresentar características clínicas e biológicas definidas, atualmente este

subgrupo foi retirado da classificação da SMD, sendo considerada uma doença mieloproliferativa (CHAN *et al.*, 2009).

Como podemos notar, a classificação da SMD pediátrica retirou o subgrupo anemia refratária com sideroblastos em anel (ARSA) devido a sua frequência ser muito baixa na infância, aproximadamente 2% dos casos (CHAN *et al.*, 1997; HASLE *et al.*, 2003).

Outra característica desta classificação é o fato do paciente apresentar uma alteração citogenética, isso tem gerado uma discussão, uma vez que, muitos pacientes com SMD primária na infância apresentam cariótipos normais (POLYCHRONOPOULOU *et al.*, 2004).

Em relação à distribuição de casos segundo o subtipo da SMD, a CR tem sido apontada por alguns estudos como relativamente comum, acometendo em torno de 40-60% dos pacientes pediátricos (POLYCHRONOPOULOU *et al.*, 2004). Enquanto os subtipos AREB e AREB-t aparecem em cerca de 15-20% da SMD na infância (WEBB *et al.*, 2002; PASSMORE *et al.*, 2003).

O diagnóstico da SMD primária em pediatria é considerado em muitos pacientes uma prática difícil. Estudos de biópsia de medula óssea revelaram a presença de hipocelularidade nos pacientes do subtipo CR em cerca de 60% dos casos. Nestes casos existe a dificuldade de diagnóstico entre SMD hipocelular e anemia aplástica (POLYCHRONOPOULOU *et al.*, 2004). Baumann e colaboradores (2012) mostraram a importância de uma boa avaliação morfológica para diferenciar a citopenia refratária hipocelular na infância da anemia aplástica, sendo essencial para a escolha da estratégia terapêutica. Além disso, quadros de infecção, desnutrição e doenças congênitas podem dificultar o diagnóstico de SMD.

Em relação a escala prognóstica, tem sido utilizado o IPSS, uma vez que os parâmetros considerados mais importantes para prever evolução da doença e tempo de sobrevivência são: % de blastos na medula óssea, citogenética e citopenias. Entretanto, alguns estudos sugerem que a utilização do IPSS para SMD pediátrica apresenta limitações. Uma dessas limitações está associada ao parâmetro da citogenética, pois como existem poucos estudos abordando o padrão cromossômico em SMD primária pediátrica na literatura, muitas alterações cromossômicas não apresentam seu valor prognóstico definido (HASLE *et al.*, 2004; SASAKI *et al.*, 2001; PASSMORE *et al.*, 2003).

As alterações citogenéticas clonais podem ser detectadas em 30–50% dos pacientes adultos com SMD primária (PANANI & ROUSSOS, 2005; BACHER *et al.*, 2009; WANG *et al.*, 2010). Na infância existem poucos estudos com um grande número de pacientes devido a sua raridade. No entanto, tem sido observado alta incidência de alterações cromossômicas, em

torno de 50-70% dos casos (WEBB *et al.*, 2002; KARDOS *et al.*, 2003; YUSUF *et al.*, 2004; GÖHRING *et al.*, 2010). Essas alterações variam de uma simples mudança estrutural ou numérica até complexas lesões genômicas envolvendo três ou mais cromossomos distintos. Alterações citogenéticas simples ocorrem frequentemente nos estágios iniciais da doença. Entretanto, em estágios de transformação leucêmica e/ou durante a evolução da doença é comum mudanças citogenéticas mais complexas (FERNANDEZ *et al.*, 2000, WANG *et al.*, 2010).

Os estudos citogenéticos mostraram um papel fundamental no diagnóstico dos casos de SMD, principalmente nas crianças, sendo utilizado para a confirmação de clonalidade (SASAKI *et al.*, 2001; PASSMORE *et al.*, 2003, HAASE, 2008). A monossomia do 7 é a alteração cromossômica mais frequente em pacientes com SMD primária da infância, sendo encontrada em aproximadamente 25% dos casos (HASLE & NIEMEYER, 2011). Esta alteração está associada com mau prognóstico e uma rápida progressão para LMA (SASAKI *et al.*, 2001; PASSMORE *et al.*, 2003; AKTAS *et al.*, 2006). A deleção 7q é também frequentemente encontrada em SMD, sendo geralmente acompanhada de outras alterações cromossômicas e associada com mau prognóstico (MHAWECH & SALEEM, 2001). Em SMD de adultos esta alteração é mais observada nos casos de mielodisplasia secundária (KWONG, 2010).

A trissomia do cromossomo 8 é a segunda alteração numérica mais comum em pacientes pediátricos com SMD (RAU *et al.*, 2012; HASLE & NIEMEYER, 2011). A incidência do ganho do cromossomo 8 em SMD primária é de aproximadamente 10%, sendo observada em todos os subgrupos (PANANI & ROUSSOS, 2005). Tanto o IPSS quanto IPSS-R classificam esta alteração como de risco intermediário. Entretanto, alguns estudos apontam que pacientes com esta alteração têm um risco aumentado de transformação leucêmica (SOLÉ *et al.*, 2000; FERNANDEZ *et al.*, 2000).

Outras alterações aparecem com menor frequência em SMD na infância, sendo observada com maior incidência em adultos como: deleção do braço longo dos cromossomos 5 (del 5q) e 20 (del 20q), a deleção do braço curto dos cromossomos 17 (del 17p) e 12 (del 12p) e a inversão do cromossomo 3 (inv 3). Translocações recíprocas são raras e incluem t(1;7)(q10;p10), t(1;3)(p36;q21), t(3;3)(q21;q26); t(6;9)(p23;q34), t(5;12)(q33;p13), e t(5;7)(q33;p11) (DELFORGE *et al.*, 2003; PANANI & ROUSSOS, 2005, BORGONOVO *et al.*, 2005; HAASE *et al.*, 2008; BELLI *et al.*, 2011).

Alterações citogenéticas envolvendo o cromossomo 5 incluem a del(5q), -5 e as translocações não balanceadas. A deleção do braço longo do cromossomo 5 pode ser terminal ou na maioria dos casos intersticial, com o ponto de quebra na região 5q13q33 ou 5q31q33. Neste caso, não se observa uma frequência aumentada de evolução para leucemia, a menos que exista uma combinação com outros defeitos cromossômicos (PANANI & ROUSSOS, 2005). A del(5q) é considerada a alteração cromossômica mais frequente em adultos com SMD primária. Esta alteração quando se manifesta isoladamente pode ser reconhecida como síndrome 5q⁻. Esta síndrome é associada geralmente com pacientes do sexo feminino e idades avançadas. O quadro clínico característico é composto por anemia macrocítica, hiperplasia eritróide na medula óssea, megacariócitos pequenos e hipolobulados, trombocitose, menos de 5% de blastos na medula óssea e diagnóstico de AR (HARRIS *et al.*, 2000; HAASE, *et al.*, 2007). Esta alteração cromossômica é rara na infância e, quando observada geralmente ocorre em um contexto de cariótipo complexo (NIEMEYER & KRATZ, 2008).

Alterações do braço longo do cromossomo 11 são comuns em malignidades mielóides, sendo encontradas em 5% dos casos de SMD primária. Geralmente esta alteração está acompanhada de cariótipos complexos e tem um prognóstico não favorável (PANANI & ROUSSOS, 2005). No entanto, o IPSS-R considera esta alteração cromossômica associada com bom prognóstico.

A deleção do braço curto do cromossomo 17 (17p-) tem sido descrita em 4% dos pacientes com SMD, estando frequentemente associada com alterações adicionais envolvendo principalmente os cromossomos 5 e 7. Pacientes com esta alteração geralmente apresentam as seguintes características morfológicas: disgranulopoese com hipolobulação pseudo-Pelger-Hüet, hipo-granulação e vacúolos observados em pequenos neutrófilos (VALLESPI *et al.*, 1998). Clinicamente a doença é agressiva com resistência ao tratamento e sobrevida mais curta. O gene *TP53* localizado na região 17p13 é tipicamente perdido nestes casos e a inativação do segundo alelo no cromossomo homólogo ocorre em aproximadamente 70% dos casos (LAI *et al.*, 1995; SAITO *et al.*, 2011). No entanto, em malignidades hematológicas pediátricas, existem controvérsias em relação a frequência de alterações cromossômicas e moleculares envolvendo o gene *TP53* (FELIX *et al.*, 1996; SAITO *et al.*, 2011).

Deleção do braço longo do cromossomo 20, como anomalia única ou em associação com outras alterações, ocorre com uma incidência de aproximadamente 5%. A deleção 20q é usualmente intersticial, afetando em geral a região 20q11 e 20q13 (PANANI & ROUSSOS, 2005). Inicialmente alguns estudos mostraram que esta anomalia estava associada com um

pior prognóstico (CAMPBELL & GARSON, 1994). Entretanto, estudos mais recentes e o IPSS sugerem que pacientes que apresentam esta alteração de forma isolada apresentam um prognóstico favorável (GREENBERG *et al.*, 1997; LIU *et al.*, 2006; GREENBERG *et al.*, 2012; BACHER *et al.*, 2014).

A incidência das alterações citogenéticas pode refletir em uma instabilidade genômica clonal, levando a uma pré-disposição para a aquisição de lesões genéticas adicionais. Estudos citogenéticos de acompanhamento de evolução da SMD para LMA demonstraram que alterações cromossômicas simples ocorrendo em subtipos de SMD são acrescidas de outras alterações durante a progressão da doença (FERNANDEZ *et al.*, 2000; WANG *et al.*, 2010), estando envolvidas alterações em oncogenes e genes supressores de tumor (MORI *et al.*, 2000; MHAWECH & SALEEM, 2001; JÄDERSTEN & HELLSTROM-LINDBEERG, 2010).

A progressão histopatológica do tecido normal para o câncer é um processo que ocorre em múltiplas etapas, no qual o somatório de várias lesões genéticas culmina na transformação maligna. O desenvolvimento e a evolução da SMD primária a partir de estágios precoces até estágios mais avançados da doença e sua eventual transformação para leucemia parecem estar de acordo com este conceito (STEENSMA & TEFFERI, 2003). Por isso, a SMD é considerada um modelo ideal para estudo da leucemogênese.

Embora muitas alterações cromossômicas tenham sido identificadas em SMD primária, alterações moleculares responsáveis pelo início e evolução desta doença ainda são pouco conhecidas nos pacientes adultos e principalmente nos pacientes pediátricos (QUESNEL *et al.*, 1998; TIEN *et al.*, 2001, LOOK., 2005). No entanto, recentes descobertas moleculares têm proporcionado novos conhecimentos identificando alterações genéticas e epigenéticas específicas relacionadas com os programas de proliferação, diferenciação e morte celular (apoptose), alterando processos de sinalização molecular. Muitos desses genes mutados têm sido indicados como importantes fatores prognósticos, sendo críticos para o desenvolvimento da doença e sua evolução para LMA (tabela 6) (GREENBERG, 2013).

Tabela 6 - Mutações em genes relacionados ao prognóstico desfavorável em SMD primária

Genes	Função
<i>RUNX1, N-Ras, ETV6, FMS, FLT3, SETBP1</i>	Sinalização /diferenciação celular
<i>TP53, NPM1</i>	Regulação do ciclo celular
<i>BCL2</i>	Apoptose
<i>RPS1, RPL23, RPS4X, RPS25, RPS19</i>	Transcrição
<i>SF3B, SRSF, SETBP1, CUX1, U2AF1</i>	Reguladores transcricional
<i>ASXL1, EZH2, TET, DNMT3A</i>	Reguladores epigenéticos

Fonte: GREENBERG, 2013.

As alterações moleculares envolvidas com o desenvolvimento da SMD e sua evolução para LMA levam a ativação de oncogenes e inativação de genes supressores de tumor. Entre os oncogenes envolvidos na leucemogênese destaca-se o *N-ras*. Mutação no proto-oncogene *N-ras* sinaliza de forma constitutiva para a proliferação celular. Estudos demonstraram mutação pontual no oncogene *N-ras* em 10% a 40% dos casos de SMD primária em pacientes adultos, sendo esta alteração associada com diminuição na sobrevida e alta incidência de progressão leucêmica (NIIMI, 2006). Entretanto, alguns estudos sugerem que a mutação *N-ras* ocorre em estágios iniciais da SMD, uma vez que pacientes com cariótipos normais dos subtipos menos agressivos da doença AR e ARSA podem apresentar *N-ras* mutado (FERNANDEZ *et al.*, 1998). Os achados de mutação *N-ras* em SMD primária ainda são controversos. Tem sido sugerido que a mutação no oncogene *N-ras* pode ocorrer em estágios iniciais ou avançados da doença, podendo contribuir para a patogênese da SMD por estimular inicialmente a expansão clonal ou tardiamente a transformação leucêmica (NISHINO *et al.*, 2005). Em SMD da infância, a presença de mutações nos oncogenes *N-ras* e *K-ras* ocorrem em uma frequência muito baixa. Jekic e colaboradores (2004) estudaram 35 pacientes pediátricos com SMD primária e verificaram a presença de mutação no gene *ras* em apenas três pacientes, estando esse grupo associado com cariótipos normais.

Outro gene alterado descrito em pacientes com SMD é o *c-fms*. O gene *c-fms* codifica o receptor do fator estimulador de colônia CSF-1 ou CSF de macrófagos, sendo sua atividade dependente da ligação à tirosina quinase. CSF-1 quando ativo promove a proliferação e diferenciação de células hematopoéticas da série monócito-macrófago. Mutações no gene *c-fms* resulta em uma proteína com alterações conformacionais, levando a expressão constitutiva do receptor. Mapeado na região q33 do cromossomo 5, o gene *c-fms* tem sido implicado na patogênese de doenças hematológicas da linhagem mielóide. Mutação pontual no códon 969, deste gene ocorre com maior incidência em subtipos mais avançados de SMD

(NISHINO *et al.*, 2005). Além disso, alguns estudos indicam que genes supressores de tumor críticos para o desenvolvimento dos subtipos mais agressivos da SMD e da LMA estão localizados na região 5q31 (ROYER-POKORA, 2006). Estudos de haploinsuficiência sugerem genes como *EGR1* (“Early Growth Response 1”), *CSF1R* (“Colony stimulating factor 1 receptor”), e *RPS14* (“Ribosomal protein S14”) possam contribuir para a transformação maligna (DE SOUZA *et al.*, 2010; BAJAJ *et al.*, 2011). Recentemente, o gene *EGR1* tem sido demonstrado como um regulador direto dos genes supressores de tumor *TP53*, *CDKN1A/p21*, *TGFB* e *PTEN*, e a perda de função destes genes supressores está correlacionada com a imortalidade celular e a “fuga” do programa de apoptose (BARON *et al.*, 2006). Estes estudos foram realizados em pacientes adultos.

O gene *MLL*, localizado na região q23 do cromossomo 11, encontra-se rearranjado em 70% dos casos das leucemias agudas da infância e 10% dos casos das leucemias agudas de adultos (KRIVTSOV & ARMSTRONG, 2007; MEYER *et al.*, 2009; LIM *et al.*, 2014). O gene *MLL* codifica uma proteína com múltiplos domínios, pertencente ao grupo de proteínas Trithorax (TrxG), sendo expressa tanto em células hematopoéticas pluripotentes quanto na população de células progenitoras. Membros da família Trithorax estão associados com a regulação positiva de expressão de genes-alvo. A proteína MLL é processada pós-tradução por clivagem proteolítica, gerando os fragmentos N-terminal e C-terminal. Os domínios associados a porção C-terminal auxiliam na preparação da cromatina para a transcrição eficiente e, os domínios associados a porção N-terminal contém características essenciais para o correto direcionamento do complexo MLL. Desta forma, o complexo MLL coordena três principais mecanismos de modificação da cromatina: metilação, acetilação e remodelamento nucleossômico (KRIVTSOV & ARMSTRONG, 2007; JOBE *et al.*, 2012). Em pacientes adultos com SMD, este gene foi descrito estando associado com a transformação para LMA (IBRAHIM *et al.*, 2000). No entanto, existem poucos estudos mostrando o envolvimento do gene *MLL* em SMD primária pediátrica (RODRIGUES *et al.*, 2007).

Interessantemente, muitos dos genes, frequentemente mutados em SMD primária codificam proteínas envolvidas na maquinaria epigenética da célula, sugerindo uma ligação entre os mecanismos genéticos e epigenéticos na patogênese desta doença.

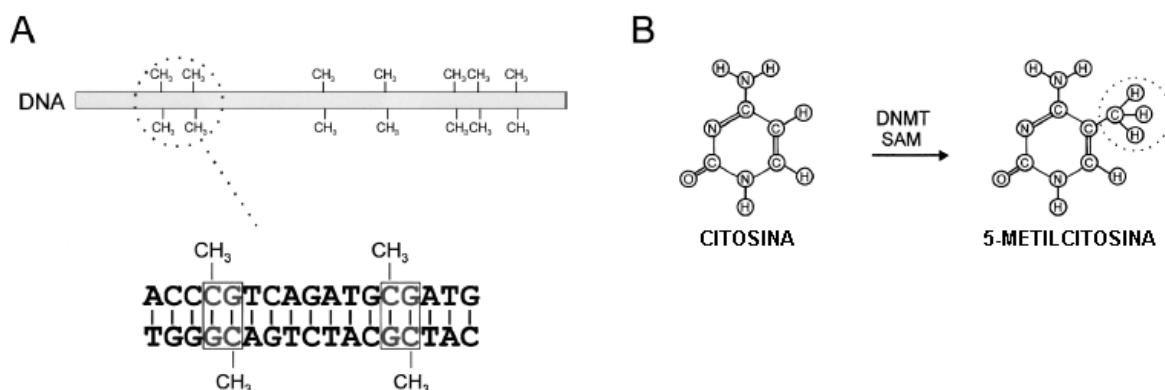
O termo epigenética refere-se a modificações covalentes reversíveis e herdadas da molécula de DNA, sem que haja alteração na sequência de bases (GALM *et al.*, 2006). Mecanismos epigenéticos desempenham um papel essencial no silenciamento transcricional em muitos processos, tais como a inativação do cromossomo X, o "imprinting", o controle da expressão

gênica tecido-específica e a manutenção da integridade cromossômica, agindo também na defesa do genoma contra elementos genéticos móveis (LAIRD & JAENISCH, 1996; BARROS & OFFENBACHER, 2009). Existem dois mecanismos principais envolvidos na epigenética: a metilação do DNA e a modificação de histonas.

A metilação do DNA é um processo epigenético natural que constitui na modificação endógena mais comum no genoma de mamíferos, sendo essencial para o desenvolvimento do organismo (GALM *et al*, 2006). A metilação ocorre somente nas bases citosina que estão localizadas próximas das bases guanina de um dinucleotídeo simétrico, CpG (Figura 2A). Citosinas metiladas representam 0,75-1% do total de bases do DNA (WORN & GULDBERG, 2002).

As ilhas CpGs são encontradas em pequenas regiões de 1-2 Kb, representando, aproximadamente, 2% do genoma, e possuem propriedades distintas quando comparadas com o restante do DNA genômico. Com relação a sua distribuição, as ilhas CpGs são comumente encontradas dentro ou próximas a promotores de genes de manutenção (RAKYAN *et al.*, 2001). Aproximadamente 70% dos dinucleotídeos CpGs estão metilados, no entanto, muitas ilhas CpGs apresentam-se livres de metilação, estando associadas com a atividade transcricional do gene. O padrão de metilação da célula é precisamente reproduzido após a síntese do DNA e estavelmente transmitido para as células filhas. A adição de um grupamento metila (CH_3) na posição 5 da citosina é um evento catalisado por um grupo de enzimas chamadas DNA metiltransferases (DNMT). A DNMT3A e DNMT3B estão envolvidas na metilação "de novo" e DNMT1 promove a manutenção do DNA semi-metilado durante a replicação. A S-adenosil-metionina (SAM) serve como doadora de radicais metila nas reações de transmetilação (Figura 2B) (WORN & GULDBERG, 2002).

Figura 2 - Região de metilação na sequência do DNA e adição do grupamento metila pelas enzimas DNMTs

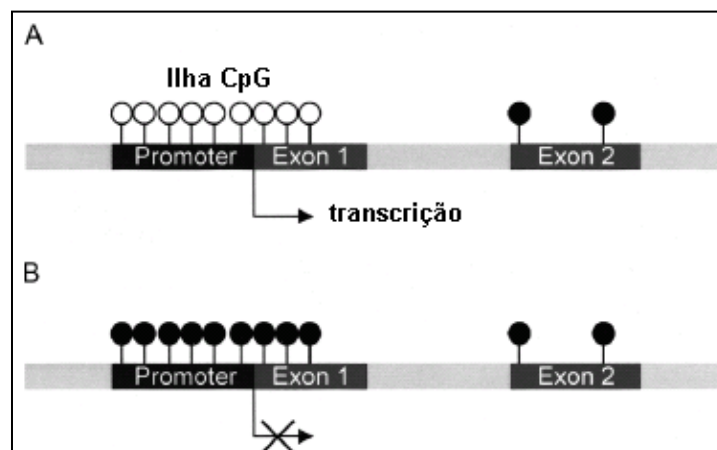


Legenda: A - O genoma humano apresenta grupos metil, os quais ocorrem exclusivamente em resíduos de citosina dentro de um dinucleotídeo simétrico CpG; B - A adição do grupo metil a citosina é catalizada pela DNA metiltransferase (DNMT), usando a S-adenosil-L-metionina (SAM) como um substrato.

Fonte: WORN & GULDBERG, 2002.

A metilação do DNA promove mudanças na estrutura da cromatina, modificando as interações entre o DNA e os fatores de transcrição. Tais mudanças podem regular, reversível ou irreversivelmente, as funções do genoma atuando na repressão transcricional e na organização da cromatina. Genes que são ativamente transcritos tendem a ter baixos níveis de metilação das suas regiões promotoras, enquanto que genes silenciosos, isto é, que não se expressam em determinados tecidos ou circunstâncias, têm sua região promotora altamente metilada (Figura 3) (WORN & GULDBERG, 2002).

Figura 3 - Atividade transcricional do gene de acordo com o padrão de metilação

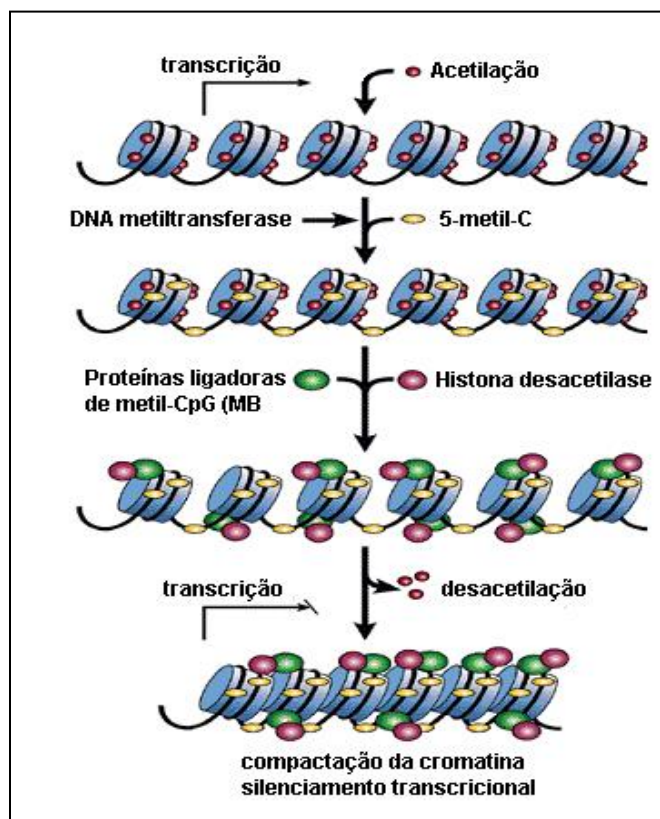


Legenda: Citosinas não metiladas são amplamente encontradas em ilhas CpGs, as quais usualmente estão localizadas no promotor e nas regiões do primeiro éxon de genes “housekeeping”. A - O estado completamente desmetilado de uma ilha CpG na região promotora está relacionado com a atividade transcricional, entretanto; B - metilação completa, causa o silenciamento transcricional.

Fonte: WORN & GULDBERG, 2002.

Estudos iniciais sobre o mecanismo do efeito inibitório da metilação sugeriram uma interferência direta dos grupamentos metila na ligação de fatores de transcrição a seus sítios de reconhecimento na cromatina. Sendo assim, os fatores de transcrição que se associam a sequências que contêm dinucleotídeos CpG não conseguem se ligar a essas sequências quando os resíduos CpG estão metilados. No entanto, modelos alternativos referem-se a mudanças na arquitetura nucleossomal como um elemento de repressão. Este modelo foi reforçado pela identificação de uma família de proteínas que preferencialmente ligam-se a CpGs metilados (MBPs - proteínas ligadoras de CpG metilados) (WADE, 2001). Algumas destas proteínas têm sido diretamente implicadas no silenciamento de genes metilação-dependentes, por recrutar histonas desacetilases (HDACs) para o local da metilação. HDACs catalizam a remoção dos grupos acetil dos nucleossomos, convertendo a estrutura da cromatina aberta para transcrição para uma estrutura fechada, a qual se torna inacessível a maquinaria transcricional basal (Figura 4) (WORN & GULDBERG, 2002; GALM *et al.*, 2006).

Figura 4 - Modelo para o silenciamento transcricional dependente de metilação



Legenda: Citosinas metiladas são reconhecidas por proteínas ligadoras de metil CpG (MBPs), as quais recrutam histonas desacetilases (HDACs) para o local da metilação, convertendo a cromatina em uma estrutura fechada, que se torna inacessível a maquinária de transcrição.

Fonte: WORN & GULDBERG, 2002.

No câncer a hipermetilação de regiões promotoras de genes supressores de tumor é uma importante alteração epigenética que está despertando um grande interesse no estudo de desenvolvimento de novas terapias. Estudos em malignidades hematológicas têm mostrado uma forte relação entre metilação e fenótipo neoplásico.

Em SMD, numerosos estudos de metilação do DNA têm revelado a complexidade da doença a nível epigenético. Uma recente revisão em metilação do DNA em SMD primária descreve os diversos genes frequentemente metilados (tabela 7). Estes genes estão envolvidos em diversas funções como: reparo do DNA, apoptose, proliferação e regulação do ciclo celular (KHAN *et al.*, 2013; SANTINI *et al.*, 2013).

Tabela 7 - Genes frequentemente metilados em SMD primária

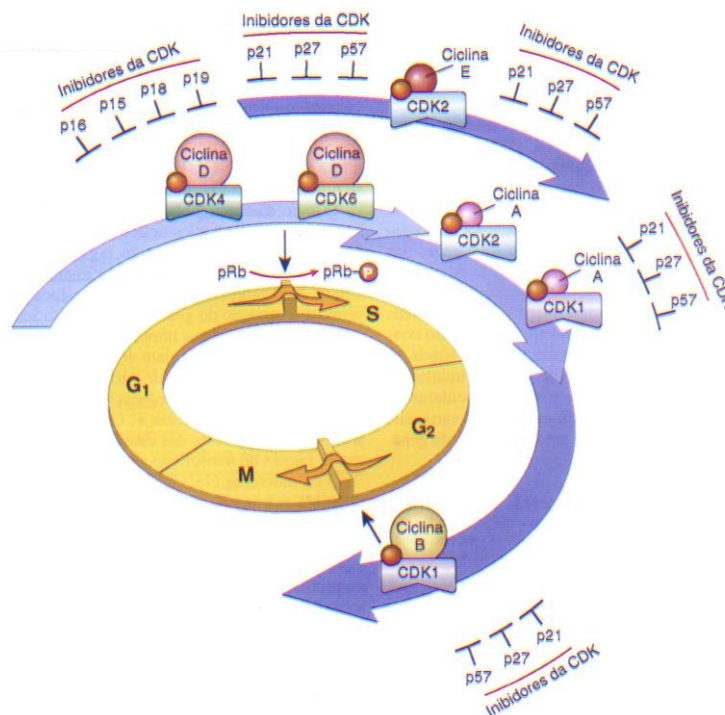
Genes	Função
<i>p15^{INK4b}</i> , <i>p16^{INK4a}</i>	regulação do ciclo celular
Calcitonina	metabolismo do cálcio e fósforo
<i>DAPK-1</i>	Apoptose
E-caderina (<i>CDH1</i>)	Adesão celular
<i>ER</i>	receptor de hormônio
<i>SOCS-1</i>	supressor de citocinas
<i>RIZ1</i>	regulação do ciclo celular

Fonte: SANTINI *et al.*, 2013

Diversos genes envolvidos no controle do ciclo celular encontram-se alterados por metilação nas doenças hematológicas, principalmente os membros da família Ink4, *p15* e *p16* (LEHMANN, 2004, CANDILORO *et al.*, 2008).

Os genes *p15^{INK4b}* e *p16^{INK4a}* estão localizados na região p21 do cromossomo 9. As proteínas codificadas por esses genes induzem a parada do ciclo celular na fase G1-S através da inibição da atividade do complexo ciclina D e CDK4 e CDK6. A transição da fase G1 para S representa um ponto extremamente importante no relógio do ciclo celular (figura 5). Metilação em regiões promotoras dos genes *p15^{INK4b}* e *p16^{INK4a}* induzem a repressão transcricional desses dois genes, contribuindo para a passagem direta da célula para a fase S. Dessa forma, a inibição da expressão desses genes está associada com alta taxa de proliferação celular (LEES, 1995; COTRAN *et al.*, 2000).

Figura 5 - Genes *p15* e *p16*, membros da família INK4 de inibidores do ciclo celular



Legenda: O ciclo celular é dividido em quatro fases – G₁, S, G₂ e M. Estão representados os períodos de atividade dos complexos ciclina-Cdks durante a progressão do ciclo. Várias proteínas inibidoras podem parar o avanço deste ciclo em fases específicas G₁→S e G₂→M. Por exemplo, os membros da família de inibidores INK4 p15 e p16, atuam bloqueando a atividade do complexo ciclina D e CDK4 e CDK6, impedindo o avanço do ciclo da fase G₁ para S.

Fonte: COTRAN *et al.*, 2000.

Em neoplasias hematológicas, tem sido verificado que os genes *p15^{INK4b}* e *p16^{INK4a}* estão frequentemente deletados em leucemia linfóide aguda em crianças e adultos (STREFFORD, 2007; IACOBUCCI *et al.*, 2011). No entanto, em SMD primária, estes dois genes são raramente mutados ou deletados (NAKAMAKI *et al.*, 1997; MARISAVLJEVIC *et al.*, 2013). Estudos mostraram que *p15^{INK4b}* atua como um importante regulador da proliferação e diferenciação das linhagens mielóides, monocítica e megacariocítica, inibindo esses processos (TEOFILI *et al.*, 2001). Posteriormente, foi demonstrado, que o silenciamento transcricional dos genes *p15^{INK4b}* e *p16^{INK4a}* via metilação aberrante é um evento crítico na leucemogênese. A metilação na região promotora do gene *p15^{INK4b}* tem sido observada em SMD e leucemias agudas, tanto linfóide quanto mielóide (HERMAN *et al.*, 1996a, AU *et al.*, 2003; GARCIA-MANERO *et al.*, 2002; KIM *et al.*, 2010).

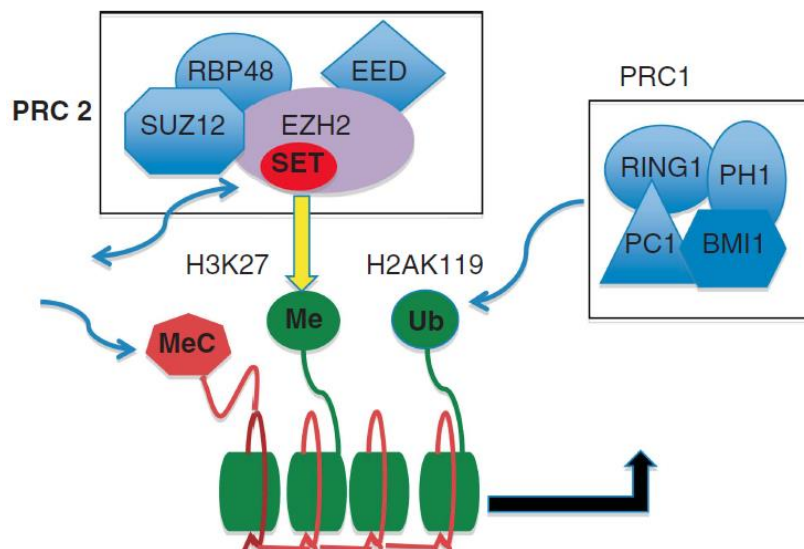
No sentido de verificar o papel desses dois genes no processo de desenvolvimento e evolução da SMD para LMA foram realizados alguns estudos correlacionando alterações

nesses genes com os subtipos da doença segundo a classificação FAB. Alguns grupos demonstraram que a metilação aberrante de $p15^{INK4b}$ ocorre com maior incidência nos casos de expansão blástica como AREB, AREB-t e LMA resultante de transformação de SMD e mais raramente nos subtipos iniciais da doença (UCHIDA *et al.*, 1997; QUESNEL *et al.*, 1998). No entanto, outros estudos mostraram que alterações nos padrões de metilação em $p15^{INK4b}$ podem ocorrer em todos os subtipos da doença (TIEN *et al.*, 2001; AGGERHOLM *et al.*, 2006; HOFMANN *et al.*, 2006). Dessa forma, não é claro se esta alteração epigenética ocorre em fases iniciais do diagnóstico ou se é um evento associado à transformação leucêmica e qual o seu verdadeiro impacto prognóstico.

A maioria desses trabalhos foi realizada em pacientes adultos com SMD primária, existindo poucos estudos de investigação da incidência e do papel da metilação dos genes $p15^{INK4b}$ e $p16^{INK4a}$ em SMD primária na infância (HASEGAWA *et al.*, 2005, VIDAL *et al.*, 2007; KIM *et al.*, 2013).

Um grupo de genes que possuem um papel central em eventos de re-programação epigenética é o grupo da família Polycomb (PcG). Os genes Polycomb codificam as proteínas (PcG) que possuem um papel importante no controle da expressão gênica. Essas proteínas associam-se a cromatina de genes-alvo e atuam como uma plataforma de recrutamento para as enzimas metiltransferases, promovendo o silenciamento do gene (TAKIHARA, 2008; HOCK, 2012). As proteínas PcG compreendem dois complexos repressivos: PRC1, formado pelos genes *MEL-18*, *RING1*, *PC*, *PH* e *Bmi-1*, e PRC2, do qual fazem parte os genes *EED*, *SUZ12*, *RBP48* e *EZH2*. O complexo PRC2 exerce uma atividade metiltransferase levando a metilação da histona H3 na lisina 27 (H3K27me) via domínio SET de EZH2. H3K27me recruta o complexo PRC1, o qual ubiquitina a histona H2AK119, DNA metiltransferases e histonas desacetilases, levando a compactação da cromatina e a repressão transcricional (figura 6) (LUND *et al.*, 2014). A expressão alterada de proteínas da família Polycomb tem sido relacionada com a desregulação da proliferação celular e o desenvolvimento do câncer, entre elas destaca-se EZH2 (TAKIHARA, 2008; CHASE & CROSS, 2011).

Figura 6 - Interação e efeitos do gene *EZH2* na regulação da repressão transcricional



Legenda: O complexo repressivo Polycomb 2 (PRC2) exerce uma atividade metiltransferase atuando na histona H3K27 via domínio SET da subunidade EZH2 no gene-alvo. A metilação H3K27 leva ao recrutamento do complexo PRC1, o qual ubiquitina a histona H2AK119, das DNAs metiltransferases e das histonas desacetilases, levando a compactação da cromatina e a repressão transcricional.

Fonte: LUND *et al.*, 2014.

O gene *EZH2* codifica a proteína histona metil-transferase. Esta proteína é altamente conservada e, apresenta um papel crítico na renovação de células tronco, na manutenção e diferenciação de linhagens celulares específicas, incluindo a miogênese, adipogênese, osteogênese, neurogênese, hematopoese, diferenciação epidermal e hepatogênese (CHEN *et al.*, 2012). *EZH2* também interage e modula as DNAs metiltransferases, tendo um papel importante no remodelamento da cromatina. Este gene está localizado na região 7q36.1, uma região frequentemente deletada em neoplasias mielóides, principalmente na SMD primária da infância (CARDOSO *et al.*, 2000; FISKUS *et al.*, 2006; GRUBACH *et al.*, 2008). Alguns estudos mostraram a presença de mutação pontual do gene *EZH2* em 2%- 6% dos pacientes com SMD primária, estando à mutação em sua maioria em homozigose ou bi-alélica (NIKOLOSKI *et al.*, 2010; MAKISHIMA *et al.*, 2010; ERNST *et al.*, 2010). Experimentos *in vitro* sugerem que mutações em *EZH2* encontradas em pacientes com SMD estão associadas com um pior prognóstico e menor sobrevida (ERNST *et al.*, 2010).

Alguns estudos têm mostrado super-expressão de *EZH2* em diversas malignidades hematológicas e em tumores sólidos, estando associada a um pior prognóstico (TSANG & CHENG, 2011). Em SMD primária, foi observada a existência de correlação entre metilação

do DNA e um aumento de expressão de *EZH2*, sugerindo uma possível participação deste gene no processo de regulação epigenética (XU *et al.*, 2011). No entanto, até o momento não existem estudos com o gene *EZH2* em pacientes pediátricos com SMD primária.

Alterações no padrão de metilação e regulação epigenética têm sido observadas em linhagens celulares que adquirem resistência após o tratamento com drogas (VIDAL *et al.*, 2007). Apesar de, nos últimos anos, vários estudos terem mostrado a incidência e o impacto clínico de múltiplas lesões genéticas em SMD, os mecanismos envolvidos na resistência à terapia de pacientes que não são submetidos ao transplante de células tronco hematopoéticas continuam obscuros.

O fracasso da quimioterapia no tratamento do câncer pode ocorrer através do efluxo aumentado de agentes quimioterápicos, levando a redução intracelular do nível da droga e consequente ausência de resposta ao tratamento. Uma das causas da resistência a múltiplas drogas está relacionada com o aumento de expressão de membros da super-família de genes da cascata de transportadores ligados a ATP (ABC). Transportadores ABC pertencem a uma grande família de proteínas transmembrana, com sete sub-famílias que são designadas de A a G. Dentre os transportadores de resistência a múltiplas drogas destaca-se o gene *ABCB1*, também conhecido como *MDR-1*, o qual codifica a glicoproteína-P (P-gp) que é universalmente descrita como um biomarcador de resistência a múltiplas drogas. A P-gp é uma proteína trans-membrana, a qual realiza atividade de efluxo de xenobióticos e drogas nas células, protegendo o organismo da ação de determinados fármacos. A função da P-gp é impedir a entrada de fármacos na célula ou promover a eliminação dos mesmos, dependendo de sua localização. A super-expressão de *MDR-1* está associada com o fracasso do tratamento em muitos tipos de câncer, tanto em tumores sólidos (rins, fígado, intestino), quanto em neoplasias hematológicas (linfomas e leucemias) (AMBUDKAR *et al.*, 2003; FLETCHER *et al.*, 2010). A descoberta de *MDR-1* possibilitou um avanço no entendimento do mecanismo de resistência à multiplas drogas e levou a identificação de numerosas proteínas com estrutura relacionada e similar capacidade de transporte. Diversos quimioterápicos já foram descritos como substratos para a P-gp, dentre eles podemos citar: colchicina, antraciclina, epipodofilotoxinas, taxanes, camptotecinas, imatinib, mitoxantrone e metotrexate (FLETCHER *et al.*, 2010).

Estudos de expressão do gene *MDR-1* têm sido realizados em pacientes adultos com SMD primária. Estes estudos têm mostrado um aumento de expressão deste gene e, uma associação com a evolução para LMA e a diminuição de sobrevida dos pacientes (LIST *et al.*,

1991; LEPALLEY *et al.*, 1994; ZOCHBAUER *et al.*, 1994; KURATA *et al.*, 2006). Uma revisão da literatura mostrou que, até o momento, nenhum estudo foi realizado em pacientes pediátricos com SMD primária.

O preciso mecanismo de regulação do gene *MDR-1* ainda é desconhecido. Alguns estudos em câncer têm demonstrado que a hipometilação da região promotora do gene *MDR-1* está associada com um aumento de expressão da glicoproteína P e a refratariedade ao tratamento (SHARMA *et al.*, 2010). Em LMA, a metilação do gene *MDR-1* foi observada com baixa frequência (TOYOTA *et al.*, 2001). Em SMD primária não existem estudos mostrando alterações epigenéticas no gene *MDR-1*.

Vários tratamentos vêm sendo utilizados em pacientes adultos e pediátricos com SMD primária, com o objetivo de eliminar as citopenias, assim como de recuperar a hematopoese. Uma das terapias utilizadas é a de suporte que envolve as transfusões sanguíneas e antibióticos; fatores de crescimento isolados ou em combinação, ciclosporina ou globulina anti-timócito (ATG) são também utilizadas em pacientes que apresentam medula óssea hipocelular. Nos subtipos mais avançados da SMD (AREB, AREB-t, LMMC) é utilizada a quimioterapia com agente único: hidroxiurea, etoposídeo, mercaptopurina, baixa dose de arabinosídeo citosina (ARA-C). Em alguns casos é utilizada a quimioterapia intensiva similar àquela dada à pacientes com LMA, como a combinação de fludarabina e alta dose de ARA-C, induzindo inicialmente, a remissão nesses doentes (HELLSTRÖM-LINDBERG, 2000).

O transplante de células tronco hematopoéticas (TCTH) alogênico é, atualmente, a única opção terapêutica curativa para os pacientes com SMD primária. No entanto, o seu uso é limitado para pacientes até 55 anos de idade e que possuam doadores histocompatíveis (GIRALT *et al.*, 2005; WONG *et al.*, 2005; KINDWALL-KELLER, 2009). Para pacientes jovens (≤ 40 anos) com SMD ou LMA secundária à SMD, o TCTH alogênico é apontado como a melhor opção de tratamento (YUSUF *et al.*, 2004; ESPIGADO *et al.*, 2005; SMITH *et al.*, 2013). Inicialmente, a medula óssea era a única fonte de células-tronco hematopoéticas para o TCTH alogênico, no entanto atualmente o sangue de cordão umbilical tem sido utilizado como uma satisfatória fonte de células tronco para diversos grupos de pacientes adultos e pediátricos. Estudos demonstraram que após o transplante de sangue de cordão umbilical a taxa de recaída, de sobrevida livre da doença e a sobrevida total dos pacientes com malignidades mielóides é similar a de outras fontes de células tronco hematopoéticas (BALLEN *et al.*, 2006; BRUNSTEIN *et al.*, 2007). Desta forma, o sangue de cordão

umbilical é uma fonte alternativa de células tronco hematopoéticas para pacientes que necessitam de um transplante alogênico, mas não apresentam doadores histocompatíveis. Em pacientes pediátricos, estudos sugerem que o TCTH deve ser indicado no início do curso da doença, principalmente para aqueles pacientes que apresentam anormalidades citogenéticas de mau prognóstico (CHATTERJEE & CHOUDHRY, 2013; SMITH *et al.*, 2013). No grupo de crianças com AREB e AREB-t estudos mostram que o TCTH pode melhorar a sobrevida, embora a importância da terapia com citoredutores antes do TCTH permaneça controversa. No entanto, devido à presença de complicações clínicas no pós-TCTH, como a doença enxerto versus hospedeiro, possíveis recaídas da doença que podem levar a morte dos pacientes, novas formas de tratamento vem sendo avaliadas (KIKUCHI *et al.*, 2012; CHATTERJEE & CHOUDHRY, 2013).

Com o delineamento das características biológicas que norteiam o fenótipo da SMD primária, novas drogas introduzidas no tratamento desta doença têm mostrado um grande potencial terapêutico. Como por exemplo, agentes imunossupressores, anti-angiogênicos (principalmente a talidomida e lenalidomida) (MUSTO *et al.*, 2004; SYED & SCOTT, 2013), citoprotetores (amifostina), inibidores do receptor da tirosina quinase (mesilato de imatinibe) (GILES *et al.*, 2003), inibidor de farnesil transferase (inibidor da via Ras) (KURZROCK *et al.*, 2004). Além disso, uma nova classe terapêutica chamada inibidores da metiltransferase (IMT) vem sendo utilizada no tratamento da SMD. Os representantes desta classe incluem a azacitidina (5-azacitidina) e decitabina (5-aza 2' deoxicidina). Ambos são agentes hipometilantes que se incorporam no DNA e, então irreversivelmente ligam-se e inibem a ação da DNA metiltransferase. Esta interação resulta inicialmente em um DNA semi-metilado. Após outros ciclos celulares, este, torna-se totalmente não metilado. A ação destes fármacos leva a reativação de genes epigeneticamente reprimidos, como genes supressores de tumor. Agentes desmetilantes têm sido utilizados no tratamento da SMD primária em pacientes adultos de alto risco e, tem sido observado um aumento no tempo de progressão da SMD para LMA. Estudos com azacitidina mostraram um aumento significativo na sobrevida e melhora na qualidade de vida desses pacientes quando comparado com a quimioterapia (SILVERMAN & MUFTI, 2005; ATALLAH *et al.*, 2007, FENAUX *et al.*, 2009; SCOOT *et al.*, 2010). Para o grupo de SMD de baixo risco, azacitidina e decitabina são indicados para pacientes que são altamente dependentes de transfusão, que não respondem ou não são candidatos ao uso de fator de crescimento ou a lenalidomida (GARCIA-MANERO,

2011). Estes estudos são baseados em pacientes adultos. O impacto destes medicamentos na SMD primária na infância ainda é desconhecido.

Devido à raridade da SMD primária na infância, poucos estudos sobre o seu desenvolvimento e a sua evolução para LMA foram realizados. Dessa forma, torna-se fundamental a caracterização de marcadores citogenéticos e moleculares que auxiliem o diagnóstico e a definição de fatores prognósticos. Estes esclarecimentos são importantes para auxiliar na escolha de protocolos de tratamentos, além de adicionar novos conhecimentos associados ao desenvolvimento desta neoplasia hematológica.

1 OBJETIVOS

1.1 Geral

Este trabalho apresenta como objetivo geral identificar biomarcadores de diagnóstico e de prognóstico em SMD primária na infância que contribuam no conhecimento das alterações que levam ao desenvolvimento desta doença e sua evolução para LMA.

1.2 Específicos

- a) Realizar uma análise citogenética retrospectiva e prospectiva (1991-2013) em pacientes com SMD primária na infância e acompanhar citogeneticamente e clinicamente estes pacientes para observar as principais alterações numéricas e estruturais envolvidas no processo de transformação leucêmica.
- b) Caracterizar o padrão cromossômico de pacientes com SMD primária na infância.
- c) Aplicar a técnica de FISH para confirmar as alterações cromossômicas nos seguintes casos: quando os cromossomos apresentarem baixa resolução pela técnica de bandeamento G, quando o número de metáfases analisadas para caracterizar um clone for pequeno e para o monitoramento do tratamento quando a preparação citogenética for sem mitose.
- d) Analisar o padrão de metilação dos genes $p15^{INK4b}$, $p16^{INK4a}$ e $MDR-1$ em células de medula óssea de pacientes com SMD primária na infância e comparar com o padrão obtido em doadores para o TMO e linhagens celulares específicas.
- e) Analisar o padrão de expressão dos genes $MDR-1$ e $EZH2$ em células de medula óssea de pacientes com SMD primária da infância e comparar com o padrão obtido em doadores para o TMO.
- f) Correlacionar os dados moleculares com os subtipos da classificação da SMD primária da infância e com os cariótipos dos pacientes.
- g) Identificar marcadores citogenéticos e moleculares envolvidos no desenvolvimento e na evolução da SMD primária da infância para LMA, na tentativa de sugerir vias de evolução da doença.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Pacientes

Foi realizado um estudo, retrospectivo e prospectivo, no período de 1991 a 2013 em 115 amostras de medula óssea de pacientes pediátricos com síndrome mielodisplásica primária. Esses pacientes foram provenientes das seguintes Instituições: Centro de Transplante de Medula Óssea- Instituto Nacional do Câncer (CEMO-INCA), Serviço de Hematologia (INCA), Instituto Estadual de Hematologia Arthur Siqueira Cavalcanti (HEMORIO), Hospital Universitário Pedro Ernesto (HUPE) e Instituto de Puericultura e Pediatria Martagão Gesteira (IPPMG -UFRJ). A média de idade dos pacientes foi 8,5 anos (variando de 3 meses a 18 anos, desvio padrão: 5,44), sendo 66 pacientes do sexo masculino e 49 do sexo feminino. Os estudos hematológicos e clínicos foram realizados pelos próprios hematologistas nas instituições de origem, como parte da investigação de rotina, e os diagnósticos seguiram os critérios propostos pela classificação de SMD da infância segundo Hasle e colaboradores (2003). Foram incluídos em nosso estudo 3 pacientes com síndrome de Down apresentando SMD primária. Foram excluídos deste estudo os pacientes acima de 18 anos, apresentando SMD secundária e, classificados com leucemia mielomonocítica juvenil (LMMJ). Este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em pesquisa do Instituto Nacional do Câncer (Cep nº 62/10, Anexo A). Todos os procedimentos realizados seguiram as normas de bioética segundo a resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde.

2.2 Análise citogenética

2.2.1 Cultura de células de medula Óssea

Para este procedimento, utilizamos a técnica de Testa e colaboradores (1985) com algumas modificações. As células da medula óssea foram lavadas com meio RPMI 1640 (Life Technologies, USA), em seguida, foi feita uma diluição de 1:20 da suspensão celular em líquido de Thomas (1mL de ácido acético glacial, uma gota de violeta genciana, 100mL de

água destilada) e as células foram contadas na câmara de Newbauer em microscópio ótico contraste de fase (Olympus, USA). Foram incubadas de 5×10^6 a 10×10^6 células/mL em 80% de RPMI e 20% de soro fetal bovino (Life Technologies, USA) a 37°C , numa atmosfera de 5% de CO_2 , por 24 horas. Duas horas antes do término da cultura, foram adicionados $0,05\mu\text{g/mL}$ de colchicina e a cultura foi incubada novamente por mais 1 hora nas mesmas condições.

2.2.2 Término das culturas e preparação das lâminas

Neste procedimento o método utilizado foi o de Hungerford (1965) com modificações. Ao final da incubação, o material foi centrifugado a 1500 rpm (Sorvall T 16R, Thermo Scientific, USA) por 6 minutos. O sobrenadante foi desprezado e o precipitado ressuspense em 5mL de uma solução hipotônica ($\text{KCl } 0,075\text{M}$). O material foi incubado a 37°C por 15 minutos, sendo em seguida centrifugado a 1500 rpm (Sorvall T 16R, Thermo Scientific, USA) por 6 minutos. Foi feita a fixação do material com Solução Carnoy 3:1 (metanol : ácido acético), sendo na primeira fixação adicionado lentamente um volume de 5mL. Após 20 minutos à temperatura ambiente, o material foi centrifugado a 1500 rpm (Sorvall T 16R, Thermo Scientific, USA) durante 6 minutos e o sobrenadante desprezado. O procedimento foi repetido mais 2 vezes e o precipitado da última fixação foi ressuspense em um pequeno volume de fixador, que variou de acordo com a quantidade de material. As lâminas foram preparadas pingando-se uma gota de suspensão celular em uma lâmina limpa e umedecida e o material foi fixado sobre a lâmina na chama. A primeira lâmina obtida foi corada com corante Giemsa 2% em tampão fosfato ($0,102\text{M NaH}_2\text{PO}_4$; $0,098\text{M Na}_2\text{HPO}_4$, pH 6.8) e observada no microscópio ótico para verificar o índice mitótico e a qualidade das metáfases. As demais lâminas foram envelhecidas de 1 dia a 1 semana à temperatura ambiente para o bandejamento GTG.

2.2.3 Bandeamento GTG

Para obtenção de padrões de bandeamento GTG foi utilizada a técnica de Seabright (1971) com o seguinte procedimento: as lâminas foram incubadas em uma solução de tripsina 0,1% em solução Dulbecco (0,137M NaCl; 0,0027M KCl; 0,0015M KH₂PO₄; 0,011M NaH₂PO₄; pH 7.8), em tempos que variaram de 1 segundo a 1 minuto. Em seguida, as lâminas foram lavadas com solução de soro fisiológico (NaCl 9%) e coradas em uma solução de Giemsa (Merck, Alemanha) a 2% em tampão fosfato durante 15 minutos.

2.2.4 Análise cromossômica

Os cromossomos foram identificados e classificados de acordo com o Sistema Internacional de Nomenclatura de Citogenética Humana de 2013 (Shaffer *et al.*, 2013). A análise cromossômica foi realizada em microscopia ótica utilizando no mínimo 20 metáfases por paciente. Um caso foi considerado anormal quando três ou mais células apresentaram a mesma anomalia cromossômica estrutural e/ou numérica. As imagens dos cariótipos anormais dos pacientes analisados foram adquiridas pelo sistema de Cariotipagem Ikaros -MetaSystems (Zeiss, Alemanha).

2.2.5 Citogenética molecular: Análise por Hibridização “in situ” por Fluorescência (FISH)

Para a técnica de FISH foi utilizado o material da preparação citogenética (metáfases e núcleos interfásicos em fixador). Foram utilizadas as sondas para a investigação dos cromossomos: 5, regiões q33-q34 (LSI CSF1R “spectrum orange”/LSID5S23:D5S721 “spectrum green”), 7 (LSI D7S48650 SO/CEP 7 SG), 11, região q23 gene *MLL* (LSI *MLL* “dual color break apart rearrangement probe”) e 17, região p13 gene *TP53* (LSI p53, spectrum orange). Todas as sondas utilizadas foram da Vysis, Abbott Laboratories, USA.

As lâminas foram preparadas em lençol d’água e envelhecidas durante 24 horas. Após este período, as lâminas foram colocadas em uma solução 2x SSC (a partir de uma diluição de

uma solução 20x SSC: 3,0M NaCl e 0,3M Citrato de Sódio pH 7.0) a 37° C por 30 minutos; desidratadas em série com etanol 70%, 80% e 95% à temperatura ambiente por 2 minutos. Em seguida, o material foi desnaturado em uma solução de 70% formamida (Life Technologies, USA)/ 2x SSC, a 73° C por 5 minutos. Foi dimensionado 10µl de sonda previamente desnaturada a uma temperatura de 73°C por 5 minutos, em uma área de 25mm x 25mm e aplicada lamínula de vidro. As lâminas foram seladas com cola de isopor e incubadas por 16 horas em câmara úmida a 37°C. Após o período de hibridização, as lâminas foram transferidas para solução de 0,4x SSC e 0,3% IGEPAL (Sigma, USA) a 73°C durante 2 minutos. Os cromossomos e os núcleos interfásicos foram corados em uma solução de DAPI/Antiphade (125 ng/ml) e a área foi coberta com uma lamínula de vidro e selada com esmalte incolor. A análise foi realizada em microscópio de fluorescência (Olympus BX51, USA) com filtros apropriados e o resultado obtido foi adquirido pelo Sistema de captura ISIS MetaSystems (Zeiss, Alemanha).

2.3 Análise molecular

2.3.1 Extração de DNA

O DNA das células de medula óssea de 77 amostras de pacientes pediátricos com SMD primária com idade média de 8,36 anos (desvio padrão: 5,51), 7 doadores de medula óssea (idade média de 11,42 anos e desvio padrão: 5,16), e das linhagens K562 (estabelecida a partir de células de paciente com leucemia mielóide crônica em crise blástica), DLD-1 (estabelecida a partir de adenocarcinoma coloretal), Raji (estabelecida a partir de linfoma de Burkitt) e MCF-7 (estabelecidas a partir de câncer de mama) foi extraído pelo método de Dnazol (Life Technologies, USA), segundo o protocolo do fabricante. Inicialmente foi adicionada na amostra de medula óssea, uma solução de lise de hemácias RCBL (Sacarose 1,6M, Triton X-100 5%, MgCl₂ 25mM e Tris-HCL 60mM pH 7.5). Após a lise, o material foi centrifugado a 1500 rpm por 6 minutos (Sorvall ST 16R, Thermo Scientific, USA). Em seguida, foi adicionado uma solução de soro fisiológico (9% NaCl) e novamente centrifugado a 1500 rpm por 6 minutos (Sorvall ST 16R, Thermo Scientific, USA). Posteriormente, foi

adicionado 1mL do reagente Dnazol (Life Technologies, USA) e o material foi homogeneizado lentamente. Para a precipitação do DNA foi adicionado 2 mL de etanol 100%. Ao DNA precipitado foi adicionado 1mL de etanol 75%. A amostra de DNA foi centrifugada (Sorvall ST 16R, Thermo Scientific, USA), retirado o etanol, acrescentado uma solução de TE (10mM Tris e 1mM EDTA; pH 7.4). As amostras de DNA foram armazenadas a uma temperatura de aproximadamente 15°C.

2.3.2 Avaliação da integridade e quantificação do DNA

Para avaliar a integridade das amostras de DNA, estas foram submetidas à eletroforese em gel de agarose 0,8% (Life Technologies, USA) diluída em tampão TBE 1X (Tris 89mM, ácido bórico 89mM, EDTA 2mM). Ao gel de agarose foi adicionado 1µL de brometo de etídio a 10µg/µL. No preparo das amostras foi utilizado 1µL de DNA, 1µL de corante (azul de bromofenol 0,25%, xileno cianol 0,25%, glicerol 30%) e a 8µL de água deionizada (MiliQ).

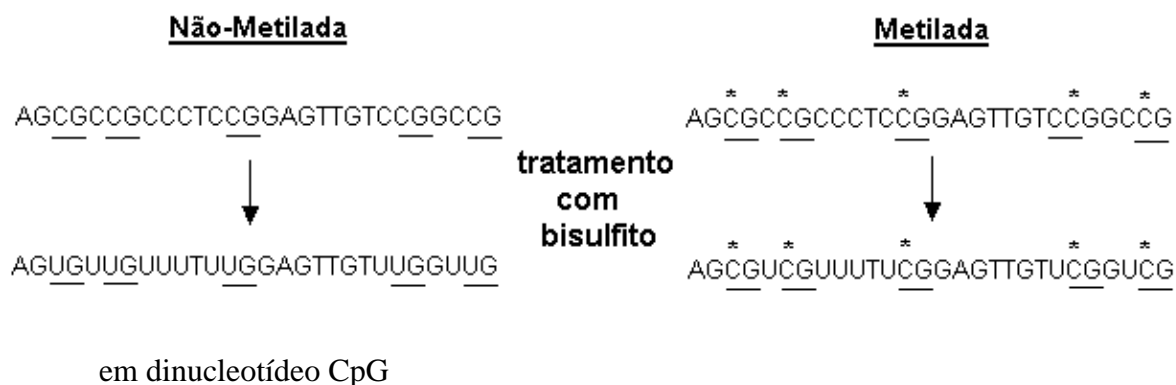
A eletroforese foi realizada a 60V por 1 hora em cuba horizontal (Loccus biotecnologia -LCH -12X14), utilizando como tampão de corrida TBE 1X. Em seguida, o gel foi visualizado em um transiluminador de luz ultravioleta (fotodocumentador - BioRad, USA). A integridade do DNA e a presença de RNA foram avaliadas através do gel de agarose utilizando como padrão de peso molecular os ladders de DNA de 100pb e de 50pb (Invitrogen).

A concentração das amostras de DNA foi estimada através de espectrometria em um biofotômetro (Nanodrop- ND1000). Para isto, inicialmente 1µL de solução de TE (10mM Tris e 1mM EDTA; pH 7.4) foi utilizada como branco na calibração do equipamento. Após a calibração, 1µL de alíquota de DNA foi colocada no aparelho para leitura. A estimativa da concentração da amostra de DNA, assim como, o seu grau de pureza, foi calculada pelo equipamento.

2.3.3 Análise do padrão de metilação da região promotora dos genes $p15^{INK4b}$, $p16^{INK4a}$ e $MDR-1$ em pacientes pediátricos com SMD primária

Para a análise de metilação, todas as amostras de DNA dos pacientes pediátricos com SMD primária, dos doadores de medula óssea (controles negativos) e das linhagens celulares (controles positivos), foram inicialmente submetidas ao tratamento por bisulfito de sódio, independente da metodologia utilizada para verificação da metilação. O tratamento com bisulfito induz a desaminação das bases citosinas não metiladas, convertendo-as em uracil, as quais após a reação de PCR são amplificadas como timina. No entanto, as citosinas metiladas permanecem inalteradas (Figura 7).

Figura 7 - Efeito do tratamento com bisulfito em uma amostra de DNA com seqüências ricas



Legenda: Todas as citosinas fora do dinucleotídeo CpG são desaminadas e convertidas em uracil. As citosinas não metiladas que se encontram dentro do dinucleotídeo CpG sofrem a ação do bisulfito e são convertidas em uracil, no entanto, as citosinas metiladas permanecem inalteradas (*).
Fonte: GALM, 2006.

Utilizamos inicialmente, o método descrito por Herman (1996b) com algumas modificações. Amostras de DNA (2µg) em 50µL de água destilada foram previamente desnaturadas em uma solução de NaOH 0.2mol/L por 10 minutos a 37°C. Após este período foram adicionados 30µL de 10mM hidroquinona (Sigma, USA) e 520µL de 3M bisulfito de sódio hidrogenado, pH 5.0 (Sigma, USA). Foi adicionado óleo mineral sobre as amostras, sendo estas, então, mantidas em banho-maria a 50°C durante 16 horas. O DNA foi purificado utilizando o kit Wizard DNA Clean-Up System (Promega, Madison, WI, USA), segundo a

recomendação do fabricante. O óleo mineral foi retirado das amostras e 1mL de resina foi adicionado. O material foi homogeneizado lentamente e filtrado em uma coluna. As colunas foram lavadas utilizando 2mL de isopropanol 80%. Para eluir o DNA da coluna foram utilizados 50µL de água MILIQ a 70°C. A modificação do DNA foi finalizada com o tratamento em uma solução de NaOH 0,3mol/L por 5 minutos a temperatura ambiente. Em seguida, para a precipitação do DNA foram adicionados 5,5µL de acetato de sódio (3M pH 5.2) e 200µL etanol 100%. As amostras foram mantidas a uma temperatura de 3°C durante 16 horas. Após este período, as amostras foram centrifugadas a 7000 rpm por 30 minutos (Centrifuge 5415C - Eppendorf, USA) e desprezado o sobrenadante. O DNA foi lavado em etanol 70%, seco a temperatura ambiente, ressuspendido em 20µL de água destilada e armazenado a uma temperatura 2-8°C.

Foi utilizado também para a conversão do DNA (pacientes e controles) o “kit Epiect Bisulfite” (Qiagen, USA) de acordo com o protocolo do fabricante. Em 2µg de DNA foram adicionados 85µL de Mix Bisulfito e 35µL de tampão de “DNA protect” em um volume final de 140µL. Para a conversão do DNA, a reação foi realizada utilizando o termociclador (TC-512, Techne, USA), nas seguintes condições: 5min a 95°C, 25 min a 60°C, 5 min a 95°C, 85min a 60°C, 5min a 95°C, 175 min a 60°C e 20°C para a finalização da reação.

Após a conversão, o material foi centrifugado (Sorvall ST 16R, Thermo Scientific, USA) a 12000rpm por 1minuto. Em seguida, foram adicionados 560µL de tampão de ligação contendo 10µL/mL de RNA carreador. A mistura foi homogeneizada em vortex e transferida para a coluna EpiTec spin (Qiagen, USA). As amostras foram centrifugadas (ST16R, Thermo Scientific, USA) a 12000rpm por 1 minuto e o filtrado foi descartado. Foram adicionados 500µL do tampão de desulfonação, seguido de incubação por 15 minutos a temperatura ambiente. Após a centrifugação e descarte do filtrado, foram adicionados 500µL do tampão de lavagem à coluna e o material foi novamente centrifugado por 1 minuto. Este procedimento foi repetido duas vezes. Após esta etapa, o material foi eluído da coluna utilizando 20µL de tampão EB e estocado a uma temperatura de 2-8°C.

Após a modificação do DNA com bisulfito de sódio, utilizamos para a análise do padrão de metilação dos genes *p15^{INK4b}*, *p16^{INK4a}* e *MDR-1* as metodologias qualitativas: a reação em cadeia da polimerase específica para a metilação (MSP) e sequenciamento; semi-quantitativa: análise combinada de bisulfito com enzima de restrição (COBRA) e quantitativas: quantificação da metilação através reação em cadeia da polimerase (QMS-PCR) e dissociação de alta resolução (HRM).

2.3.4 Reação em cadeia da polimerase específica para a metilação: técnica MSP

Para verificar a presença de metilação na região promotora dos genes *p15^{INK4b}* e *p16^{INK4a}* utilizamos a técnica MSP (polimerase específica para a metilação). Nesta análise, usamos os oligonucleotídeos descritos na tabela 8, segundo Herman (1996b).

Tabela 8 - Oligonucleotídeos utilizados na técnica MSP para análise dos genes *p15^{INK4b}* e *p16^{INK4a}*

<i>Genes</i>	<i>Seqüencia dos Oligonucleotídeos (5' – 3')</i>
p15-Mf	GCGTTCGTATTTTGCGGTT
p15-Mr	CGTACAATAACCGAACGACCGA
p15-Uf	TGTGATGTGTTTGTATTTTGTGGTT
p15-Ur	CCATACAATAACCAAACAACCAA
p16-Mf	TTATTAGAGGGTGGGGCGGATCGC
p16-Mr	GACCCCGAACCGCGACCGTAA
p16-Uf	TTATTAGAGGGTGGGGTGGATTGT
p16-Ur	CAACCCCAAACCACAACCATAA

Legenda: M- oligonucleotídeo específico para o alelo metilado; U- oligonucleotídeo específico para alelo não metilado; f- “forward” = senso; r- “reverse” = anti-senso.

Fonte: HERMAN *et al.*,1996.

As condições finais, nas quais as reações de PCR foram conduzidas, consistiram de 3µL do DNA modificado por bisulfito, 6,7mM de MgCl₂ (Life Technologies, USA), 5µL de tampão de reação (Life Technologies, USA), 1,25mM dATP, 1,25mM dTTP, 1,25mM dCTP e 1,25mM dGTP (Life Technologies, USA), 1nmol de cada oligonucleotídeo e 1U de Taq polimerase (Life Technologies, USA) para um volume final de 50µL.

A reação foi realizada utilizando o termociclador PTC-150 (MJ Research) e as condições de ciclagem para ambos os genes incluíram: desnaturação inicial a 95°C por 10 minutos, “hot-started” a 72°C por 5 minutos, 35 ciclos de desnaturação a 95°C por 1 minuto, pareamento a 60°C por 30 segundos, extensão por 30 segundos e extensão final a 72°C por 10 minutos. Após a amplificação, os produtos da PCR foram submetidos à eletroforese em gel de poli-acrilamida 5% (Amersham Biosciences, USA).

O preparo do gel foi realizado com 1,5mL de solução de acrilamida (Amersham Biosciences, USA): bis-acrilamida (Amersham Biosciences, USA) 20% (19:1), 0,3 mL de tampão TBE 10X [tris 0,89M (Amersham Biosciences, USA); ácido bórico 0,89M (Isifar);

EDTA 0,02M (Amersham Biosciences, USA)], 42µL de persulfato de amônio 10% (Amersham Biosciences, USA), 6µL de TEMED (Life Technologies, USA) e água destilada para volume final de 6mL. Em um volume de 5µL do produto de PCR foram acrescentados 2µL do corante de corrida [azul de bromofenol 0,25% (Amersham Biosciences, USA); xileno cianol 0,25% (Amersham Biosciences, USA); glicerol 30% (Isofar, Brasil)]. A eletroforese foi realizada em cuba vertical (Cuba Mini-Protean – BioRad, USA) a 110V por 50 minutos, e o TBE 0,5X (diluído a partir do TBE 10X) foi utilizado como tampão de corrida. Em seguida, o gel foi corado com nitrato de prata (Merck, Alemanha). Para fins comparativos, foi utilizado o padrão de peso molecular Low DNA Mass Ladder (Life Technologies, USA).

2.3.5 “Combined bisulfite restriction analysis”: técnica COBRA

A análise semi-quantitativa de metilação dos genes *p15^{INK4b}*, *p16^{INK4a}* e *MDR-1* foi realizada pela técnica COBRA (“COmbined Bisulfite Restriction Analysis”) (Xiong and Laird, 1997). As condições finais, nas quais as reações de PCR foram conduzidas, consistiram de 3µL do DNA modificado por bisulfito, 6,7mM de MgCl₂ (Life Technologies, USA), 5µL de tampão de reação (Life Technologies, USA), 1,25mM de cada dNTPs (Life Technologies, USA), 1nmol de cada oligonucleotídeo e 1U de Taq polimerase (Life Technologies, USA) para um volume final de 50µL. Antes da adição da enzima Taq polimerase a reação, o DNA foi desnaturado a 95°C por 10 minutos. A reação foi realizada utilizando o termociclador PTC-150 (MJ Research, USA). As condições de ciclagem e os oligonucleotídeos utilizados estão na tabela 9. Após a amplificação, os produtos foram visualizados em gel de poliacrilamida 5% corado com nitrato de prata.

Tabela 9 - Oligonucleotídeos utilizados na técnica de COBRA para a análise dos genes *p15^{INK4b}*, *p16^{INK4a}* e *MDR-1*

Gene	Oligonucleotídeos (senso/ anti-senso)	Temperatura de pareamento (número de ciclos), tempo
<i>p15^{INK4b}</i>	5' GGAGTTTAAGGGGGTGGG 3' 5' CCTAAATTACTTCTAAAAAAAAC 3'	50°C (35), 30 segundos
<i>p16^{INK4a}</i>	5' GGTTTTGGYGAGGGTTGTTT3'	58°C(5) 56°C(5) 54°C(5) 52 °C (26),

	5' ACCCTATCCCTCAAATCCTCTAAAA 3'	30 segundos
<i>MDR-1</i>	5' GTTATAGGAAGTTTGAGTTT 3' 5' AAAAACTATCCCATAATAAC 3'	54 °C (3) 51 °C (4) 48 °C (5) 45 °C (26), 30 segundos

Fonte: Adaptado de TOYOTA *et al.*, 2001

Subsequentemente, 20µL das amostras amplificadas foram submetidas a reação de corte com 2U/µL de enzima de restrição TaqI (*MDR-1* e *p16^{INK4a}*) e NruI (*p15^{INK4b}*) (Life Technologies, USA). Após a digestão, os produtos foram visualizados em gel de poliacrilamida 8% corado com nitrato de prata. A quantificação do DNA em gel de poliacrilamida foi realizada por densitometria.

2.3.6 Sequenciamento

Realizamos o sequenciamento automático das amostras estudadas como uma metodologia adicional confirmatória do padrão de metilação na região promotora dos genes *p15^{INK4b}*, *p16^{INK4a}* e *MDR-1*. As amostras derivadas do produto de PCR foram purificadas utilizando o kit GFXTM PCR (DNA and Gel Band purification Kit- Amersham Biosciences, USA), segundo recomendações do fabricante. Um volume de 30µL do produto de PCR foram acrescentados em 500µL de tampão de captura e colocadas em um tubo contendo uma coluna. A amostra foi centrifugada a 6000 rpm por 30 segundos (5415C, Eppendorf) e o precipitado descartado. Foram adicionados 500µL de tampão de lavagem (10mM TE; etanol 80%) na coluna e centrifugado novamente a 6000 rpm por 30 segundos. A coluna foi lavada com 20µL de água destilada e centrifugada a 6000 rpm por 1 minuto (5415C, Eppendorf) para eluir o DNA. O DNA purificado foi quantificado através de espectometria em um biofotômetro (Nanodrop- ND-1000).

O sequenciamento foi realizado utilizando a Plataforma ABI PRISM 3130xl Genetic Analyser (Life Technologies, USA). Para cada amostra de produto de PCR foram realizados dois sequenciamentos, um utilizando oligonucleotídeos senso (f) e outro oligonucleotídeos anti-senso (r). Para os genes *p15^{INK4b}* e *p16^{INK4a}* foram utilizados os oligonucleotídeos da descritos na tabela 8 e para o gene *MDR-1* os oligonucleotídeos descritos na tabela 9. Para a reação de sequenciamento foram utilizados 100ng do DNA purificado, 3,2pmol do oligonucleotídeo (tabela 7), 1 µL de tampão 5x (400 mM tris HCl, 10 mM MgCl₂, pH 9.0,

Life Technologies, USA) e 1µL do “Mix Big Dye” (Taq + fluoróforos + MgCl₂, Life Technologies, USA) em um volume final de reação de 10 µL. As condições de ciclagem foram 25 ciclos de desnaturação a 96°C por 10 segundos, pareamento a 50°C por 5 segundos e extensão a 60°C por 4 minutos.

Após a PCR, o material foi precipitado com 40µL de isopropanol 75%, deixado a temperatura ambiente por 15 minutos e centrifugado a 4000 rpm por 45 minutos (5804R, Eppendorf). O sobrenadante foi desprezado e o precipitado lavado com 50µL de etanol 70% e centrifugado por 15 minutos a 4000 rpm (5804R, Eppendorf). Após 15 minutos a 37°C foi acrescentado 10µL de formamida ultrapura (Merck, Alemanha). O material foi então desnaturado por 10 min a 96°C utilizando o termociclador (TC-512, Techne, USA) e mantido no gelo. A placa foi então colocada na Plataforma 3130 para a leitura da sequência. A análise do resultado do sequenciamento foi feito através do programa “BioEdit Sequence Alignment Editor” (v.7.0.9, Tom Hall, Ibis Biosciences, CA).

2.3.7 Métodos quantitativos para a análise dos níveis de metilação na região promotora dos genes *p15^{INK4b}*, *p16^{INK4a}* e *MDR-1*

A metodologia de PCR em tempo real específica para metilação (QMS-PCR) foi utilizada para análise dos níveis de metilação da região promotora dos genes *p15^{INK4b}* e *p16^{INK4a}* nos pacientes positivos para a metilação. O DNA das células de medula óssea dos pacientes foi tratado com bisulfito de sódio como descrito anteriormente. Foi utilizado como controle positivo, o DNA de referência totalmente metilado (EpiTect Control DNA methylated, Qiagen, USA), o DNA da linhagem Raji (*p15^{INK4b}*) e da linhagem DLD-1 (*p16^{INK4a}*) e como controle negativo, o DNA de referência totalmente não metilado (EpiTect Control DNA unmethylated, Qiagen, USA) e DNA de doadores de medula óssea. As reações foram feitas utilizando os seguintes oligonucleotídeos: *p15^{INK4b}* Mf: 5’GCGTT CGTATTTTGC GGTT3’/ Mr: 5’CGTACAATAACCGAACGACCGA3’; *p16^{INK4a}* Mf: 5’TTA TTAGAGGGTGGGGCGGATCGC-3’/ 5’MR: GACCCCGAACCGCGACCGTAA3’. Foi utilizado como controle interno o gene de β-actina (ACTNB): 5’-CGCCAACACAGTGCTGTCT-3’/ 5’-CACGGAGTACTTGCGCTCAG-3’. Com base na curva padrão, obtida por uma sequência de diluição combinada entre DNA metilado e não

metilado (100%, 50%, 10% e 0% de metilação), a análise da porcentagem de metilação de cada amostra metilada foi realizada. Todas as amostras foram feitas em duplicatas. A média do valor de Ct foi usada para quantificação. Cada reação de PCR apresentou: 500nM de cada oligonucleotídeo, 100 ng of DNA and 1X da solução "Fast EvaGreen qPCR Master Mix" (Biotium, Inc., USA). As reações foram feitas usando o Corbett Research, Rotor-Gene 6000 software 1.7 (Qiagen, USA) com as seguintes condições de ciclagem: 95°C por 5 minutos e 45 ciclos: 95°C por 20 segundos e 60°C por 1 minuto.

Foi utilizada para análise dos níveis de metilação da região promotora do gene *MDR-1* a metodologia HRM. Esta técnica é uma recente ferramenta de biologia molecular que permite identificar e quantificar variações de somente um nucleotídeo na sequência de DNA amplificado por PCR. O HRM baseia-se nas diferenças de temperatura de dissociação (TM) específicas de cada produto de PCR, sendo desta forma mais específica para o estudo da metilação. Pretendemos, através desta técnica, avaliar a porcentagem de metilação em sequências de DNA da região promotora do gene *MDR-1*. Os DNAs das células de medula óssea dos pacientes, doadores de medula óssea e linhagens celulares foram tratados com bisulfito de sódio como descrito anteriormente. Para a amplificação do gene *MDR-1* foram utilizados os seguintes oligonucleotídeos: *MDR-1*: senso-5'GTTATAGGAAGTTTGAGTTT 3'/ anti-senso- 5'AAAACTATCCATAATAAC 3'. As condições finais, nas quais as reações de PCR foram conduzidas, consistiram de 1µM de cada primer, 10ng de DNA modificado por bisulfito e 1x EpiTect HRM Master Mix (Qiagen, USA). Essas reações foram realizadas utilizando o termociclador Rotor-Gene Q (Qiagen, USA).

Para o nosso estudo, primeiro estabelecemos uma curva-padrão de porcentagem de metilação utilizando DNA universalmente metilado e não metilado (EpiTect Control DNA methylated/ unmethylated, Qiagen, USA) de 100%, 75%, 50%, 25%, 10%, 5% e 0%. Com base nesta curva é que determinamos a porcentagem de metilação, entre as amostras das linhagens, dos doadores e dos pacientes.

Foi realizada, inicialmente, uma análise do padrão de metilação nas linhagens celulares K562, estabelecida a partir de células de paciente com leucemia mielóide crônica em crise blástica e MCF-7 estabelecidas a partir de câncer de mama. Em seguida, realizamos a análise do padrão de metilação do gene *MDR-1* das amostras de medula óssea dos doadores e dos pacientes, utilizando a linhagem MCF-7 como controle positivo. As condições de ciclagem foram: desnaturação inicial de 95°C, por 10 minutos, seguido de 45 ciclos de 95°C por 45 segundos, 60°C por 45 segundos e 72°C por 45 segundos. Após a amplificação os

produtos de PCR foram pré-aquecidos a 60°C por 90 segundos, seguido pela etapa de dissociação por HRM, na variação gradual de 65°C a 90°C, coletando dados de fluorescência a cada 0,1°C por segundo.

2.3.8 Análise de expressão dos genes *MDR-1* e *EZH2* em pacientes pediátricos com SMD primária

2.3.8.1 Extração de RNA e obtenção de cDNA

O RNA total de células mononucleares da medula óssea de 34 pacientes pediátricos com SMD primária com idade média de 8 anos (desvio padrão: 5,51) e 7 doadores de medula óssea (idade média: 11,42 e desvio padrão: 5,16) foi extraído pelo método de TRIzol (Life Technologies, USA) de acordo com o protocolo do fabricante. Inicialmente, foi adicionada nas amostras de medula óssea uma solução de lise de hemácias RCBL (Sacarose 1,6M, Triton X-100 5%, MgCl₂ 25mM e Tris-HCl 60mM pH 7.5). Após a lise, o material foi centrifugado a 1500 rpm por 6 minutos (Sorvall ST 16R, Thermo Scientific, USA) e lavado com solução de soro fisiológico (9% NaCl). Após a lavagem, foi adicionado 1mL de TRIzol (para cada 5-10 x 10⁶ células). Em seguida, foi acrescentado 0,2mL de clorofórmio, homogeneizado e incubado a temperatura ambiente por 3 minutos. Após este tempo, o material foi centrifugado a 7000 rpm por 10 minutos (Sorvall ST 16R, Thermo Scientific, USA) e a fase correspondente ao RNA foi retirada (fase aquosa). Posteriormente, o material foi precipitado com 100% de álcool isopropílico (Merck, Alemanha), ressuspenso em 10µL de água tratada com DEPC e armazenado a temperatura de -70°C. A concentração de RNA foi realizada através de espectrometria em um biofotômetro (Nanodrop, ND-1000).

Para a obtenção de cDNA, inicialmente foi adicionada nas amostras de RNA (4µg) uma mistura contendo 1U de "DNase I amplification grade" (Life Technologies, USA), 1µL de tampão 10X para um volume final de reação de 10µL por 15 minutos a temperatura ambiente. Após este período, foi adicionado 1µL de EDTA (25mM) para inativação da enzima e incubação a 65°C durante 10 minutos. Em seguida, foi feita a reação de transcrição reversa (RT-PCR), usando um volume de 10µL da solução contendo o RNA, 1µL de Oligo

(dT) (50 μ M) (Life Technologies, USA) e 1 μ L de uma mistura de dNTPS (10mM) (Life Technologies, USA) em um volume final de reação de 12 μ L, sendo mantido a 65°C por 5 minutos. Após este período, o material foi incubado imediatamente em gelo por 5 minutos. Foram adicionados 7 μ L de uma mistura contendo 4 μ L de tampão "first-Strand" 5X (Life Technologies, USA), 2 μ L de dithiotreitol (DTT, Life Technologies, USA) e 1 μ L RNase OUT (40U/ μ L, Life Technologies, USA) e incubado a 42°C por 5 minutos. Por último, foi adicionado 1 μ L da enzima SuperScript II (Life Technologies, USA), seguindo-se das incubações a 42°C durante 50 minutos e 70°C durante 15 minutos. O material foi armazenado a uma temperatura de -70°C.

2.3.8.2 Reação em cadeia da polimerase da transcriptase reversa em tempo real (RT-qPCR)

A análise do padrão da expressão dos genes *MDR-1* e *EZH2* em pacientes com SMD primária na infância foi realizada pela metodologia de PCR em tempo real quantitativo. Foram utilizados como controles, amostras de células de medula óssea de doadores para o TCTH e para o controle interno da reação foi utilizado o gene "housekeeping" β -actina. As sequências dos oligonucleotídeos de cada gene estão descritas na tabela 10. Para cada reação foram utilizados 5ng de cDNA, 1,25 μ M de cada oligonucleotídeo dos genes *MDR-1* ou *EZH2*, 0,25 μ M de cada oligonucleotídeo do gene β -actina e 5 μ l Syber-green RT-PCR Master Mix (Life Technologies, USA). As condições de ciclagem foram: desnaturação inicial a 95°C por 10 minutos, seguido de 50 ciclos de 95°C por 20 segundos, 60°C por 45 segundos e 72°C por 20 segundos. Todas as amostras foram feitas em triplicata. Para avaliar a eficiência de amplificação, foi utilizado o método $\Delta\Delta$ Ct. As reações e as análises foram realizadas utilizando o termociclador Corbett Research, Rotor-Gene 6000 software 1.7 (Qiagen, USA).

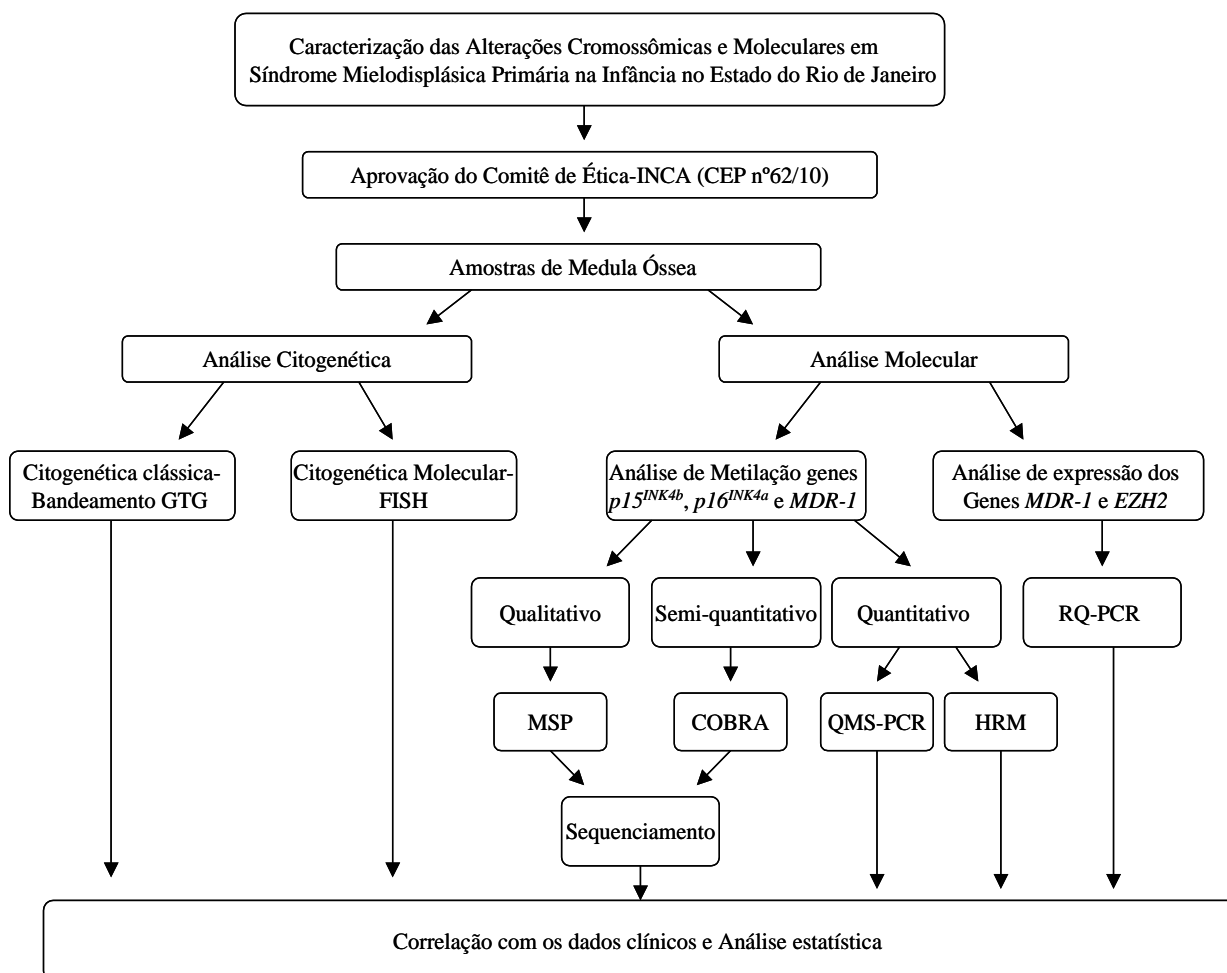
Tabela 10 - Oligonucleotídeos utilizados para a análise de expressão dos genes *MDR-1* e *EZH2* em síndrome mielodisplásica primária na infância

Genes	Oligonucleotídeos (senso/ anti-senso)
<i>MDR-1</i>	5' TCGTGCCCTTGTTAGACAG 3' / 5'CATTCTGGATGGTGGACAGG 3'
<i>Ezh2</i>	5'CAGACGAGCTGATGAAGTAAAGAGTA3'/ 5'CGCAATGAGCTCACAGAAGTC3'
β -actina	5'-TTCCTTCCTGGG CATGGAGTC-3' 5'-AGACAGCACTGTGTTGGCGTA-3'

2.4 Análise estatística

Para a análise estatística foram utilizados os programas SPSS versão 17.0 e GraphPad Prism versão 5.0. Os seguintes testes foram aplicados: χ^2 -test, χ^2 -test com a correção de Yate's, teste exato de Fisher, ANOVA e Mann-Whitney. Foi considerado estatisticamente significativo em nossas análises $p < 0,05$.

2.5 Fluxograma dos métodos utilizados para pesquisa de alterações citogenéticas e moleculares em crianças com SMD primária



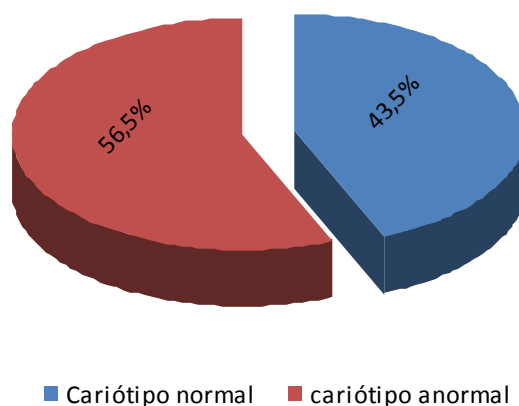
3 RESULTADOS

3.1 Análise citogenética em síndrome mielodisplásica primária na infância

No presente estudo foi feita a análise citogenética em 115 pacientes com síndrome mielodisplásica primária na infância. Do total de pacientes analisados de acordo com a classificação para SMD da infância (HASLE *et al.*, 2003), 78 apresentaram CR, 22 AREB, 15 AREB-t. O índice mitótico variou de regular para bom, com uma boa qualidade de cromossomos metafásicos para definição do padrão cariotípico.

Cariótipos anormais foram detectados em 65 (56,5%) dos 115 pacientes analisados com SMD primária (figura 8). A análise citogenética auxiliou no diagnóstico dos casos com suspeita de SMD primária pediátrica e foi uma importante ferramenta para a escolha do tratamento. Verificamos a presença de cariótipos anormais em 54,5% (36/66) dos pacientes do sexo masculino e 59,2% (29/49) dos pacientes do sexo feminino. Em relação a idade consideramos dois grupos: pacientes com idades inferiores a 12 anos, apresentaram cariótipos anormais em 39/74 (52,7%) e pacientes com idades iguais ou superiores a 12 anos apresentaram cariótipos anormais em 26/41 (63,4%). No apêndice A, podemos observar o padrão cromossômico dos pacientes pediátricos com SMD primária analisados neste estudo.

Figura 8 - Gráfico de setores mostrando a frequência de cariótipos normais versus cariótipos anormais em pacientes pediátricos com SMD primária



Para o cálculo da frequência de casos com alterações cromossômicas nos subtipos foi considerado como 100% o total de casos analisados por subtipo. Dos 78 pacientes com CR, 33 (42,3%) apresentaram cariótipo anormal. Nos subtipos mais avançados da doença a frequência de casos com alterações cromossômicas foi maior, sendo verificada em 17 (77,2%) dos 22 pacientes com AREB e em 15 (100%) dos casos com AREB-t (tabela 11).

No grupo dos pacientes com SD/SMD, cariótipos anormais foram observados ao diagnóstico em 1 paciente com CR e em outro, com AREB-t (tabela 11).

Tabela 11 - Frequência de casos com cariótipos anormais em SMD primária e SD/SMD em pacientes pediátricos

Classificação	Subtipo	Total de Pacientes Analisados	Nº de casos com cariótipos anormais
SMD	CR	78	33 (42,3%)
	AREB	22	17 (77,2%)
	AREB-t	15	15 (100%)
SD/SMD	CR	1	1
	AREB	1	0
	AREB-t	1	1

3.1.1 Distribuição do padrão cromossômico em estágio inicial (CR) e avançados (AREB e AREB-t) da SMD primária na infância

Analisando a distribuição do padrão cromossômico da SMD primária na infância segundo sua classificação, foi verificado que não existe um padrão cariotípico específico por subtipo. No estágio inicial da doença, CR, foi observada uma alta incidência de pacientes com cariótipos normais. Observamos também uma alteração cromossômica constitucional t(3;8)c, presente em 100% das células do paciente analisadas. As alterações cromossômicas clonais observadas neste grupo foram: del(3p), del(4q), del(5q), del(6q), -7 isolada e associada a +20, alterações envolvendo o cromossomo 9 [del(9p), del(9q) e iso (9q)], del(11q), del(12p), +14, del(17p), -19, -21, +Y, +mar, alteração cromossômica biclonal, quebras cromatídicas, cariótipo hiperdiplóide e cariótipo complexo, sendo a alteração mais frequente a del(11q). No subtipo AREB, a incidência de cariótipos normais foi baixa. Neste subtipo foram observadas as seguintes alterações cromossômicas: del(6q), +6, del(7q) isolada e associada a del(12p),

+8, i(9q), del(11q), del(12p) e cariótipo complexo. Similar ao subtipo CR, a del(11q) foi a alteração mais frequente. Em AREB-t, todos os pacientes apresentaram alterações cromossômicas: t(4;7), t(5;8), -7, add(9q) associado com inv(1q), +8 isolado e associado a del(11q), del(12p), +21 associado a um cromossomo marcador e cariótipo complexo, sendo a alteração mais frequente a -7 (tabela 12).

No grupo de pacientes com SD/SMD, foram observados dois pacientes apresentando alterações cromossômicas clonais. Um paciente no estágio inicial da doença, CR, e outro em estágio avançado, AREB-t. Ambos os pacientes apresentaram cariótipos complexos (tabela 12).

Tabela 12 - Distribuição do padrão cromossômico segundo a classificação da SMD Primária na Infância

Subtipo	Cariótipo	Nº de Pacientes	%/ subtipo
CR (78 pacientes)	cariótipo normal	44	56,4%
	t(3;8)c*	1	1,3%
	del(3p)	1	1,3%
	del(4q)	1	1,3%
	del(5q)	1	1,3%
	del(6q)	1	1,3%
	-7 e -7, +20	4	5,1%
	del(9p)	1	1,3%
	del(9q)	1	1,3%
	iso(9q)	1	1,3%
	del(11)(q23)	5	6,4%
	del(12p)	2	2,6%
	del(17p)	4	5,1%
	-19	1	1,3%
	-21	1	1,3%
	+Y	1	1,3%
	+mar	3	3,8%
	alteração biclonal	1	1,3%
	quebras cromatídicas	2	2,5%
	hiperdiplóide	1	1,3%
cariótipos complexos	1	1,3%	
AREB (22 pacientes)	cariótipos normais	5	22,7%
	del(6q)	3	13,6%
	+6	1	4,5%
	del(7q) / del(7q) e del(12p)	3	13,6%
	+8	1	4,5%
	i(9q)	1	4,5%
	del(11q)	6	27,3%
	del(12p)	1	4,5%
cariótipo complexo	1	4,5%	

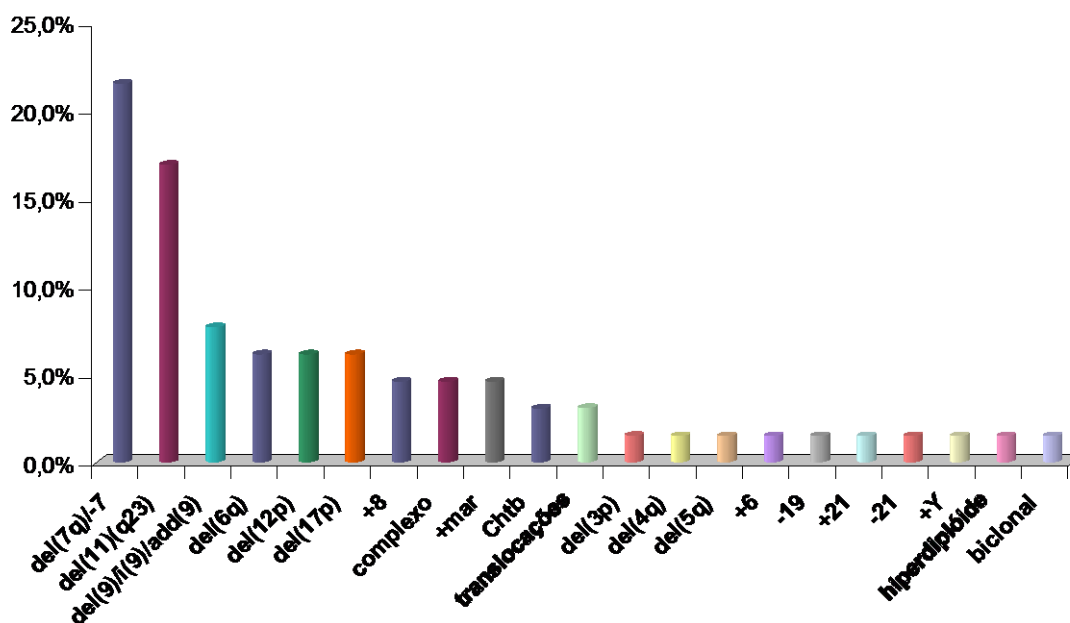
AREB-t (15 pacientes)	cariótipos normais	0	0%
	-7	7	46,7%
	+8 / +8 e del(11q)	2	13,4%
	add(9q) e inv(1q)	1	6,7%
	del(12p)	1	6,7%
	+21, +mar	1	6,7%
	translocações	2	13,4%
	cariótipos complexos	1	6,7%
SD/SMD- CR	+21c*/ cariótipo complexo	1	33,3%
SD/SMD- AREB	cariótipo +21c*	1	33,3%
SD/SMD- AREB-t	+21c*/ cariótipo hiperdiplóide	1	33,3%

Legenda: *: alteração cromossômica constitucional

Verificamos que diferente das leucemias, o padrão cromossômico em pacientes pediátricos com SMD primária é caracterizado principalmente por perdas parciais e completas de cromossomos (as deleções e as monossomias), assim como o ganho cromossômico (trissomias). Como podemos observar, na figura 9, as anomalias cromossômicas mais frequentes em SMD primária na infância foram: alterações envolvendo o cromossomo 7 (-7/7q⁻) isolada ou acompanhada de outras alterações, sendo verificada em 14 (21,54%) pacientes, del(11)(q23) em 11 (16,92%) pacientes, alterações envolvendo o cromossomo 9 [add(9)(q34), del(9)(p21), del(9)(q22-q32) e i(9)(q10)] em 5 (7,69%) pacientes. Outras alterações encontradas com menor frequência foram: del(6q), del(12)(p12) e del(17)(p12) observadas em 4 (6,15%) pacientes cada alteração cromossômica. As alterações +8, +mar e cariótipo complexo foram observados em 3 (4,61%) pacientes (cada alteração cromossômica); quebras cromatídicas (chtb) e translocações [t(5;8) e t(4;7)] em 2 (3,07%) pacientes e del(3)(p23), del(4)(q22), del(5)(q15q35), +6, -19, +21, -21, +Y, cariótipo hiperdiplóide e alteração cromossômica biclonal em 1 (1,54%) paciente (cada alteração cromossômica).

No grupo de pacientes com SD/SMD, 2 pacientes apresentaram cariótipos complexos.

Figura 9 - Gráfico de barras mostrando a frequência das alterações cromossômicas clonais em SMD primária na infância



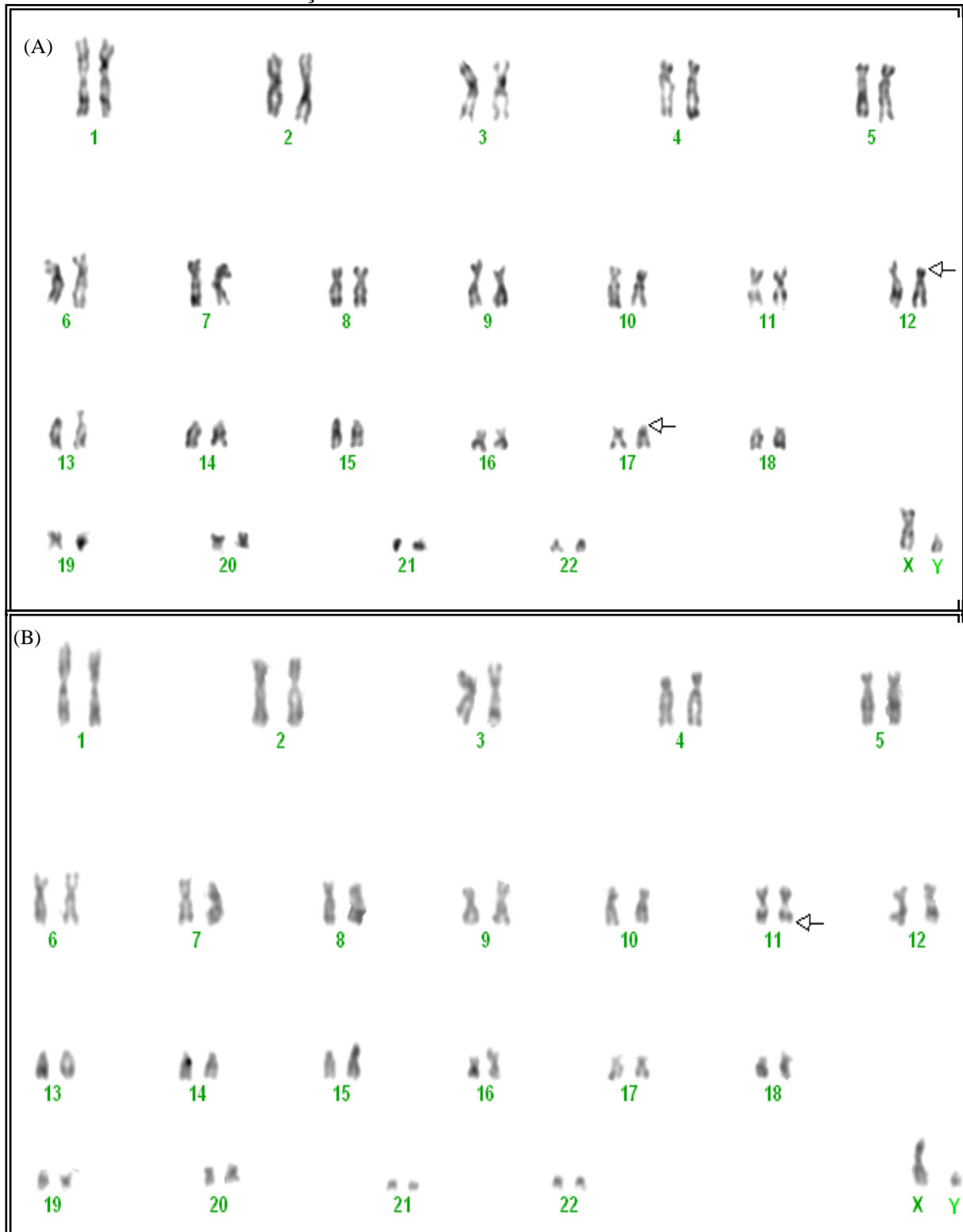
3.1.2 Citogenética molecular: aplicação do FISH em SMD primária na infância

A técnica de hibridização *in situ* por fluorescência (FISH) foi utilizada como uma metodologia complementar à citogenética clássica (bandeamento G). Essa técnica foi aplicada em pacientes com SMD primária pediátrica para confirmar alterações cromossômicas, auxiliando na definição do cariótipo e para o acompanhamento citogenético.

Por exemplo, utilizamos a técnica de FISH para confirmação da presença da deleção do braço curto do cromossomo 17 e a deleção do braço longo do cromossomo 11 na região q23, em uma criança com SMD hipocelular. Esse paciente foi classificado como CR e apresentou dois clones caracterizados citogeneticamente: 46,XY,del(17)(p12)[9]/46,XY,del(17)(p12),del(12)(p13)[5]/46,XY,del(11)(q23)[3]/46,XY[34] (figura 10). Neste caso foram realizadas duas preparações, uma utilizando a sonda do gene *TP53* localizado na região p13 do cromossomo 17 e a outra utilizando a sonda do gene *MLL* localizado no braço longo do cromossomo 11, na região q23. A análise por FISH detectou a ausência dos alelos dos genes *TP53* e *MLL* (figura 11). A análise citogenética exerceu um papel fundamental para a confirmação da doença, uma vez que esta criança não apresentava diagnóstico concluído. Este paciente foi indicado para o transplante de célula tronco hematopoética (TCTH)

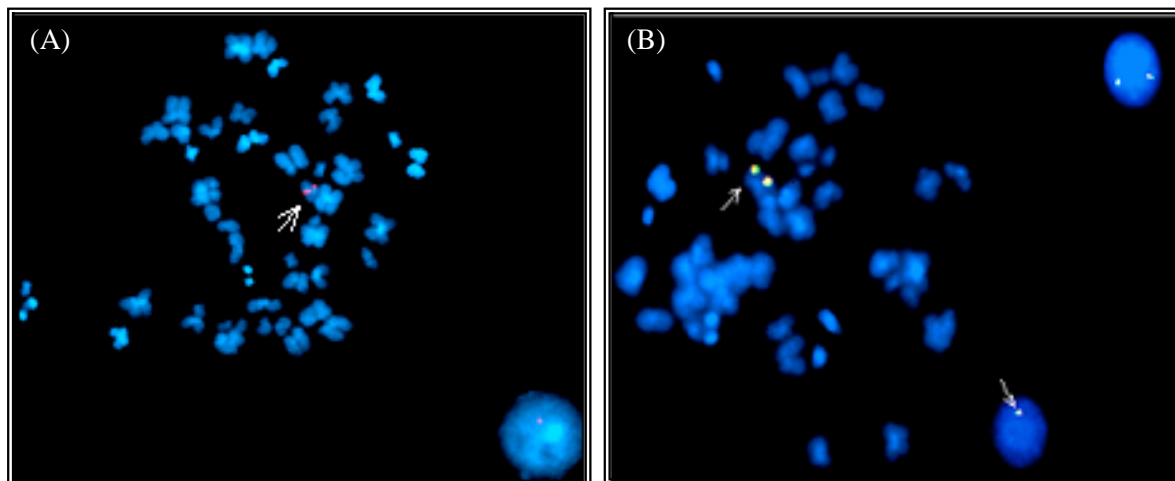
alogênico. Entretanto, não possuía doador HLA compatível, sendo indicado ao transplante de células tronco de cordão umbilical (TCTCU) (doador feminino). Esse paciente encontra-se em remissão citogenética completa (100% de células femininas) após 8 anos do transplante. Este caso corresponde ao primeiro relato da literatura, mostrando uma alteração citogenética biclonal envolvendo os cromossomos 11 e 17 em SMD primária hipocelular na infância e resultou no artigo científico: Rodrigues EF, Souza DC, Camargo A, Tavares RC, Bouzas LF, Ornellas MH, Fernandez TS. Cytogenetic biclonality in a child with hypocelular primary myelodysplastic syndrome. *Cancer Genetics and Cytogenetics*. 2007; 187: 70-72 (apêndice B).

Figura 10 - Análise por citogenética clássica (bandeamento GTG): Cariótipo masculino, mostrando alteração cromossômica biclonal



Legenda: A - del(17)(p12)/del(17)(p12),del(12)(p13) e B - del(11)(q23).

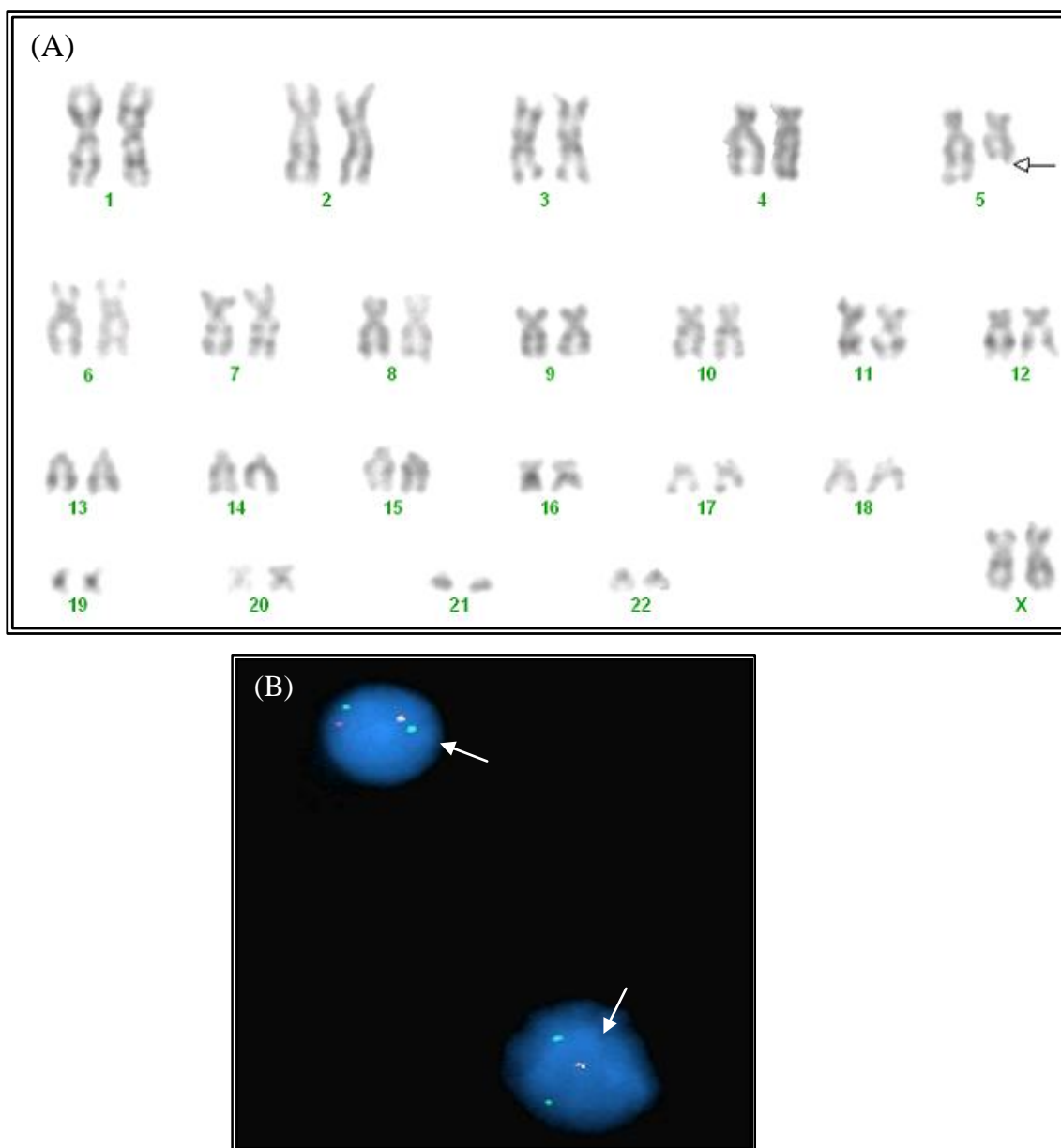
Figura 11 - Análise por citogenética molecular (FISH) utilizando as sondas dos genes *TP53* e *MLL*



Legenda: Podemos observar que tanto em utilizando a sonda *TP53* (C) quanto a sonda *MLL* (D) ocorreu a marcação do gene em apenas um cromossomo na metáfase, mostrando a ausência de seu respectivo alelo (setas). O mesmo podemos observar no núcleo interfásico (setas). Na figura D, podemos observar um núcleo interfásico com duas marcações, caracterizando uma célula normal.

A técnica de FISH também foi aplicada em um caso de SMD hipocelular classificada como CR que apresentou o seguinte padrão cromossômico: 46,XX,del(5)(q15q35)[15]/46,XX[38] (figura 12A). A del(5q) corresponde a uma alteração cromossômica rara na infância. Desta forma, para caracterizarmos melhor esta alteração e verificarmos se houve a perda do gene *c-fms* (localizado na região q33), utilizamos a sonda "dual color" marcando o braço curto do cromossomo 5 (em verde) e a região 5q33-q34 (em vermelha) (LSI CSF1R SO/ LSID5S23:D5S721 SG – Vysis, Inc. Downers Grove, USA). Nosso resultado mostrou a perda da região q33-q34 do cromossomo 5 nesta paciente (figura 12B), confirmando nosso achado prévio da citogenética convencional.

Figura 12 - Análise por citogenética clássica e citogenética molecular (FISH) utilizando a sonda do cromossomo 5

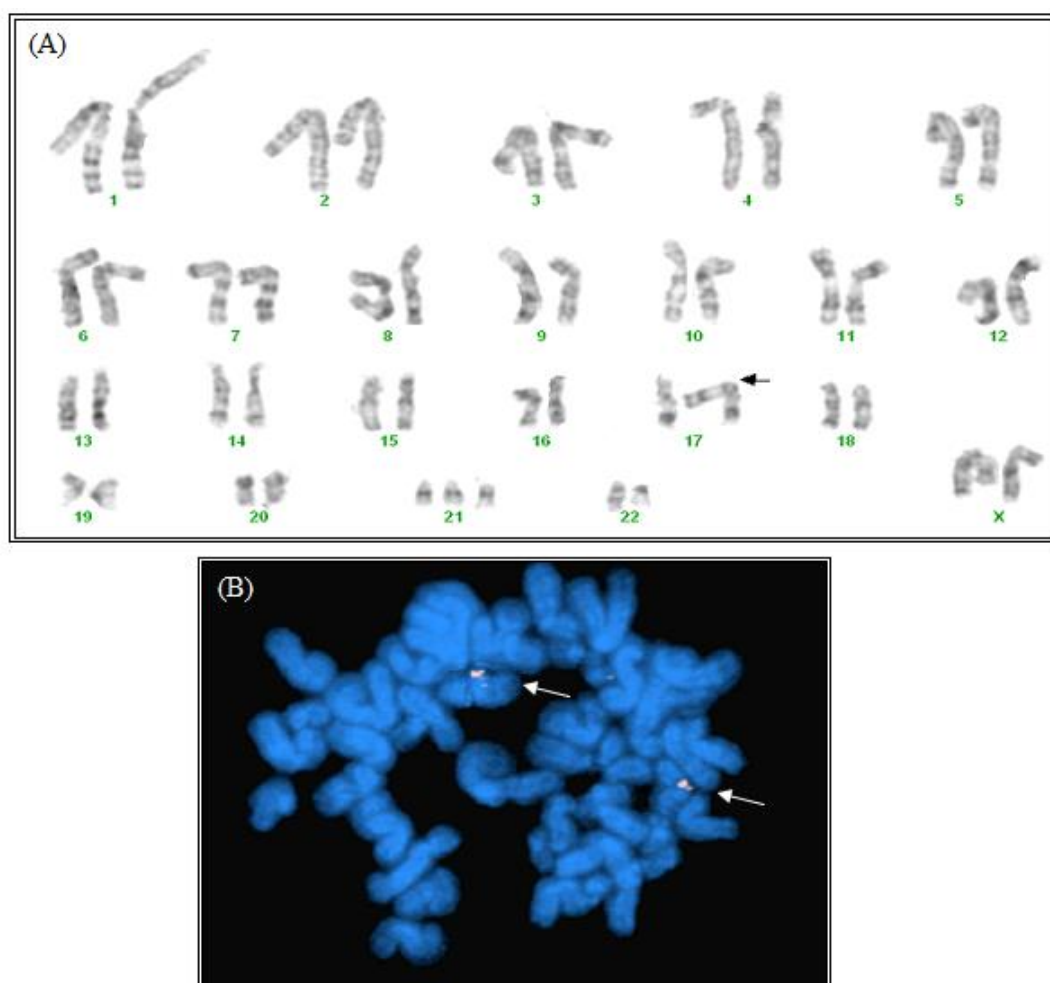


Legenda: (A) Cariótipo feminino, bandeamento GTG, mostrando a alteração cromossômica del(5)(q15q35). (B) Análise por FISH utilizando a sonda de dupla marcação do cromossomo 5. O segmento da sonda de cor verde marca o braço curto do cromossomo 5 e o de cor vermelha, a região 5q33-q34. Podemos observar a marcação em dois núcleos interfásicos, um núcleo apresentando quatro sinais caracterizando os dois cromossomos 5 normais e outro núcleo apresentando três sinais (seta), confirmando a perda da região q33-q34.

Para investigarmos o envolvimento do gene supressor de tumor *TP53* em um cromossomo derivativo, resultante da translocação não balanceada envolvendo provavelmente o braço longo do cromossomo 1 e o braço curto do cromossomo 17, utilizamos a técnica de FISH. Este paciente era portador da SD e a análise por citogenética clássica mostrou o

seguinte padrão cromossômico: 47,XX,der(17)t(1?;17)(q32?;p13),+21c[15]/47,XX,+21c[6] (figura 13A). Através da análise por FISH foi confirmado o derivativo do cromossomo 17, sem o envolvimento do gene supressor de tumor *TP53* (figura 13B). Este paciente apresentou um curso clínico raro, apresentando SMD transitória com evolução da doença para leucemia megacarioblástica aguda. Este estudo resultou em um artigo científico: Rodrigues EF, Costa ES, Diamond HR, Ornellas MH, Abdelhay E, Fernandez TS. Transient myelodysplasia in infant with Down syndrome preceding acute megakaryoblastic leukemia: cytogenetic and immunophenotypic findings. *Cancer Genetics and Cytogenetics*. 2009; 188:54-56 (apêndice C).

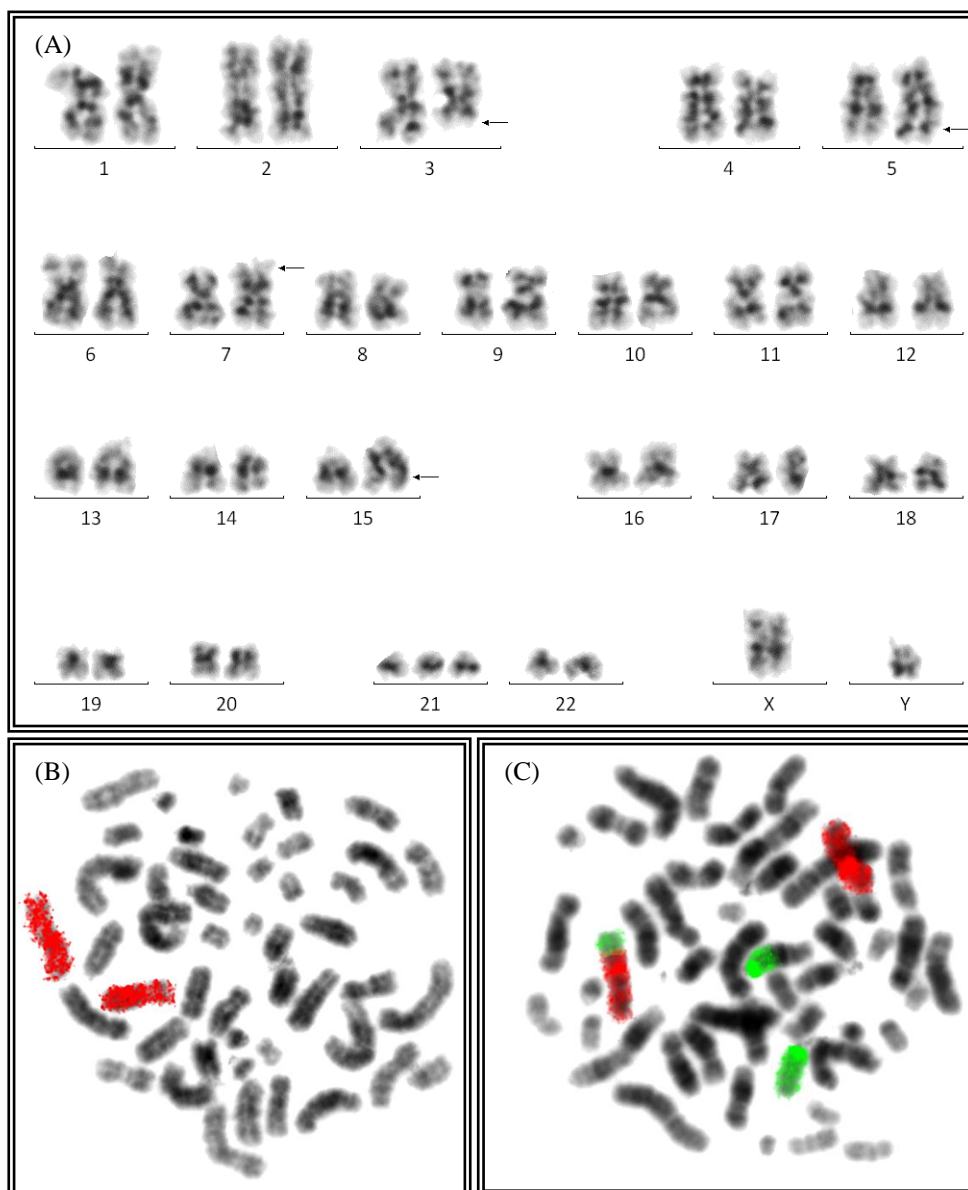
Figura 13 - Análise por citogenética clássica e citogenética molecular (FISH) utilizando a sonda do gene *TP53*



Legenda: (A) Cariótipo feminino, bandeamento GTG, mostrando a alteração cromossômica: der(17)t(1?;17)(q32?;p13). (B) Análise por FISH utilizando a sonda do gene *TP53* localizado na região p13 do cromossomo 17, mostrando a presença do gene *TP53* nos dois cromossomos (seta).

Para auxiliar na definição do cariótipo de um paciente apresentando 1 ano de idade, sexo masculino, portador da SD utilizamos a técnica de FISH. Este paciente ao diagnóstico foi classificado no estágio inicial da doença, CR. A análise citogenética por bandeamento GTG mostrou o seguinte cariótipo: 47,XY,add(7)(p?),add(15)(q?),+21c[14]/ 47,XY,+21c[14]. Durante o acompanhamento clínico e citogenético, este paciente evoluiu para LMA e adquiriu outras alterações cromossômicas, apresentando um cariótipo complexo de difícil definição pela citogenética clássica: 47,XY,t(3;5)(q21;q32),add(7)(p?),add(15)(q?),+21c[14]/ 47,XY,add(7)(p?),add(15)(q?), +21c[5]/47,XY,+21c[1] (figura 14A). Com o objetivo de melhor caracterizar citogeneticamente este cariótipo aplicamos a técnica de FISH. Foram utilizadas as sondas de pintura cromossômica: WCP3 (figura 14B), WCP7 e WCP15 (figura 14C). Após a análise do FISH chegamos a seguinte definição cariotípica: 47,XY,del(3)(q21), add(5q),der(7)t(7;15)(p15;q21q26),add(15)(q21),+21c[14]/47,XY,der(7)t(7;15)(p15;q21q26), add(15)(q21),+21c[5]/47,XY,+21c[1]. Este paciente foi tratado com quimioterapia, entretanto, faleceu.

Figura 14 - Análise por citogenética clássica e citogenética molecular (FISH) utilizando as sondas de pintura cromossômica WCP3, WCP7 e WCP15

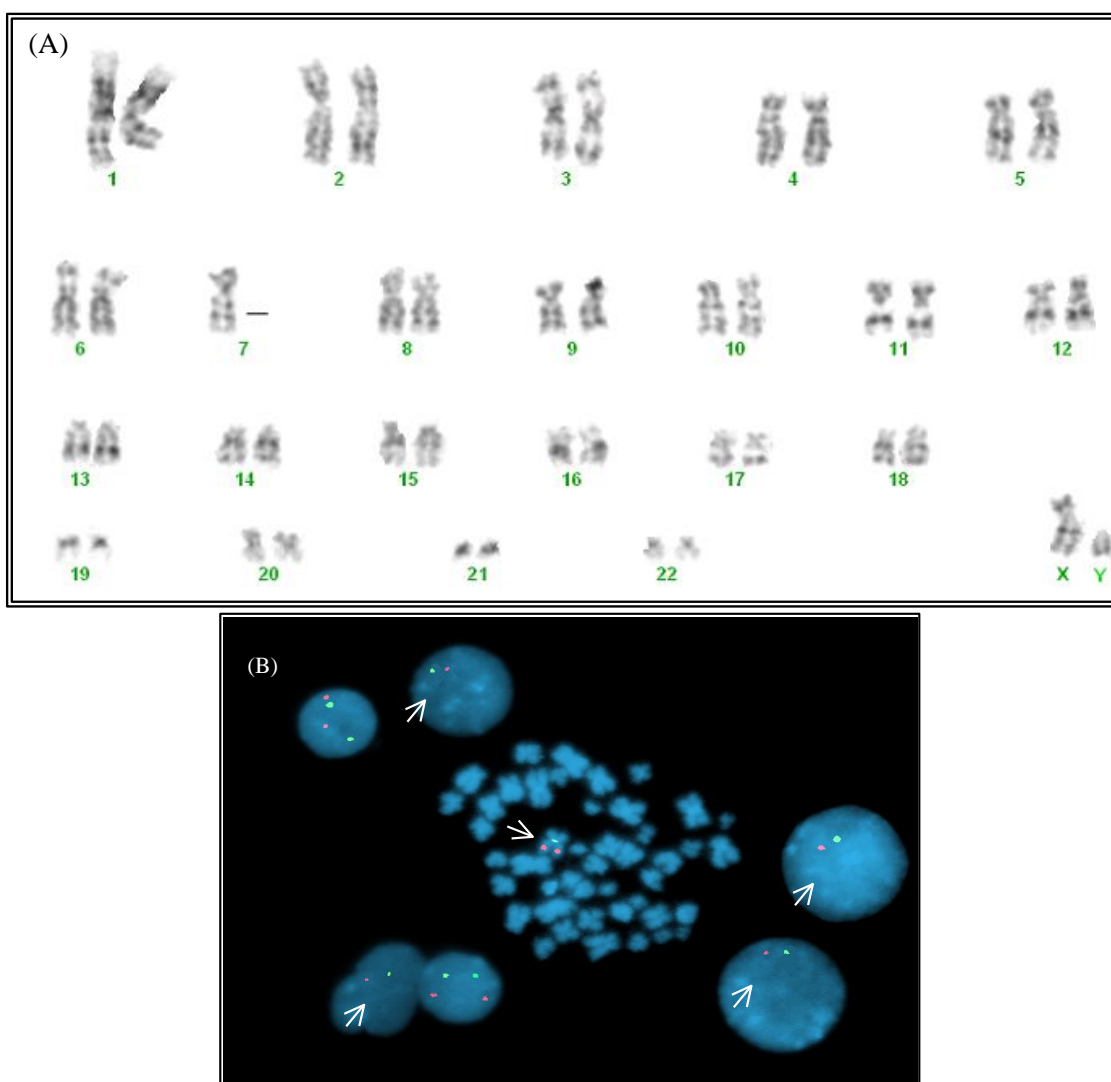


Legenda: (A) Cariótipo masculino mostrando alteração cromossômica complexa, envolvendo os cromossomos 3, 5, 7 e 15 (B) FISH utilizando a sonda de pintura cromossômica WCP3. (C) FISH usando as sondas de pintura cromossômica WCP7 (vermelho) e WCP15 (verde).

Para realizar o acompanhamento de evolução da doença e monitoramento terapêutico (pós-QT) de um paciente apresentando AREB-t e monossomia do cromossomo 7 ao diagnóstico (figura 15A), aplicamos a técnica de FISH. Para esta análise, foi utilizada a sonda com dupla marcação do cromossomo 7 (figura 15B). Esta metodologia foi aplicada, pois para definição do padrão cromossômico no acompanhamento de evolução da doença, o número de metáfases analisadas era muito pequeno, apenas 12. Entretanto, não observamos a presença de

alterações cromossômicas adicionais. O FISH mostrou através de 300 células analisadas, incluindo metáfases e núcleos interfásicos, um aumento do clone apresentando a monossomia do cromossomo 7 (95%). Esta criança evoluiu para LMA e foi indicada o TCTH alogênico. Na busca de um doador não aparentado, iniciou-se a quimioterapia. No monitoramento da terapia observamos células com monossomia do cromossomo 7, indicando a recidiva da doença. Esta criança faleceu após 11 meses do diagnóstico.

Figura 15 - Análise por citogenética clássica e citogenética molecular (FISH) utilizando a sonda do cromossomo 7



Legenda: (A) Cariótipo masculino, bandeamento GTG, mostrando a alteração cromossômica -7. (B) Análise por FISH utilizando a sonda de dupla marcação do cromossomo 7 (LSI D7S486 spectrum orange/ CEP 7 spectrum green, Vysis, Inc. Downers Grove, USA). O segmento da sonda de cor verde marca a região centromérica do cromossomo 7 e o de cor vermelha, a região q31. Podemos observar quatro marcações nos núcleos interfásicos, caracterizando uma célula normal para o cromossomo 7. Observamos a presença de alguns núcleos com apenas dois sinais, caracterizando a monossomia de 7 (setas). Na metáfase, observamos também a marcação em apenas um cromossomo, confirmando a monossomia de 7 (seta).

3.1.3 Alterações cromossômicas observadas durante a evolução da doença (SMD → LMA)

Evolução da doença foi observada em 37 (32,2%) dos 115 pacientes com SMD primária. Estes pacientes apresentaram os seguintes cariótipos: cariótipo normal, del(3p), del(4q), t(4;7), t(5;8), del(6q), -7, del(7q), +8 isolado ou acompanhado de outras alterações cromossômicas, i(9q), add(9q), del(11q), del(12p), +21 acompanhada de um cromossomo marcador e cariótipos complexos (tabela 13). No grupo de SD/SMD todos os 3 pacientes apresentaram evolução da doença.

Tabela 13 - Alterações cromossômicas associadas com a evolução da doença (SMD → LMA)

Cariótipo	Nº total de pacientes	Nº de Pacientes	
		Apresentaram Evolução	Não Apresentaram Evolução
Normal	50	4	46
del(3p)	1	1	0
del(4q)	1	1	0
del(5q)	1	0	1
t(4;7)	1	1	0
t(5;8)	1	1	0
+6	1	0	1
del(6q)	4	2	2
-7/del(7q)	14	10	4
+8 (isolada ou não)	3	3	0
i(9q)	2	1	1
add(9) e outra	1	1	0
del(9)	2	0	2
del(11q)	11	7	4
del(12p)	4	1	3
del(17p)	4	0	4
-19	1	0	1
+21;+mar	1	1	0
-21	1	0	1
+Y	1	0	1
+mar	3	0	3
Chtb	2	0	2
hiperdiploide	1	0	1
biclonal	1	0	1
Complexo	3	3	0

Durante o estudo citogenético dos pacientes pediátricos com SMD primária foi possível observar evolução cariotípica em 9 (7,8%) casos. Esses pacientes foram separados em dois grupos: grupo I: pacientes que não apresentavam alterações clonais ao diagnóstico e adquiriram alteração cromossômica no curso de evolução da doença e grupo II: pacientes que apresentavam clones e subclones citogenéticos ao diagnóstico. No grupo I foram observados 4 pacientes. Todos estes pacientes apresentaram o subtipo CR. Foi verificada aquisição das seguintes alterações cromossômicas: del(17p) em dois pacientes; +14 em 1 paciente e cariótipo complexo em 1 paciente. No grupo II foram observados 5 pacientes, sendo 1 do subtipo CR, 2 do subtipo AREB e 2 do subtipo AREB-t. As alterações cromossômicas observadas neste grupo foram: del(17p)/ del(11q), cariótipo complexo/ cariótipo complexo e dup(1q), del(7q)/ del(7q) e del(12p), add(9q)/ add(9q) e inv(1q) e +21/ +21 e +mar (tabela 14).

No grupo de pacientes com SD/SMD foi observado evolução cariotípica em 2 (66,7%) pacientes. Destes pacientes, 1 apresentava a trissomia do cromossomo 21 constitucional ao diagnóstico. Durante o acompanhamento este paciente adquiriu um der(17)t(1;17)(q32;p13), sendo classificado no grupo I de evolução cariotípica. O outro paciente apresentava ao diagnóstico um segmento cromossômico adicional nos cromossomos 7 e 15. Durante o acompanhamento, este paciente adquiriu uma nova alteração cromossômica t(3;5). Neste caso, o paciente apresentava alterações cromossômicas ao diagnóstico e adquiriu durante a evolução da doença novas alterações cromossômicas, representando o grupo III (tabela 14). Ambos os pacientes evoluíram da doença e foram a óbito.

Tabela 14 - Evolução cariotípica em pacientes pediátricos com SMD primária e SD/SMD

Grupo de evolução	Classificação-Subtipo	Citogenética ao diagnóstico	Evolução Cariotípica
Grupo I	SMD-CR	46,XY[34]	46,XY,del(17)(p12)[4]/46,XY[36]
	SMD-CR	46,XX[38]	46,XX,del(17)(p12)[5]/46,XX[33]
	SMD-CR	46,XX[35]	47,XX,+14[4]/46,XX[31]
	SMD-CR	46,XY[43]	49,XY,+12,+16,+22[3]/51,XY,del(6)(q14),+12,+16,+20,+21,+22[3]/52,XY,+5,del(6)(q14),+12,+16,+20,+21,+22[2]/51,XY,+12,+16,+18,+21,+22[2]/46,XY[14]
Grupo II	SMD-CR	46,XY,del(17)(p12)[9]/ 46,XY,del(17)(p12),del(12)(p13)[5]/ 46,XY,del(11)(q23)[3]/ 46,XY[34]	
	SMD-AREB	58,XX,+X,+3,+5,+6,+8,+10,+11,+12, +13,+18,+20,+21[5]/ 58,XX,idem,dup(1)(q21q31)[14]/ 46,XX[21]	
	SMD-AREB	46,XY,del(7)(q22)[10]/ 46,XY,del(7)(q22),del(12)(p12)[3]/ 46,XY[7]	
	SMD-AREB-t	46,XY,add(9)(q34)[5]/ 46,XY,inv(1)(q21),add(9)(q34)[4]/ 46,XY [42]	
	SMD-AREB-t	47,XX,+21[6]/ 48,XX,+21,+mar[4]/46,XX[10]	
Grupo I	SD/SMD-AREB	47,XX,+21c[25]	47,XX,der(17)t(1;17)(q32;p13),+21c[15]/ 46,XX,+21c[6]
Grupo III	SD/SMD-CR	47,XY,add(7)(p?),add(15)(q?), +21c[14]/ 47,XY,+21c[14]	47,XY,t(3;5)(q21;q32), add(7)(p?),add(15)(q?), +21c[14]/47,XY,add(7)(p?),add(15)(q?), +21c[5]/ 47,XY,+21c[1]

3.2 Distribuição dos pacientes com SMD primária na infância segundo os grupos de risco classificados pelo IPSS

Utilizamos os critérios adotados pelo IPSS para classificar os pacientes com SMD primária na infância de acordo com os grupos de risco. O grupo de risco intermediário 1 foi o mais frequente, sendo observados 65 pacientes (56,5%). No grupo de baixo risco foram observados 10 pacientes (8,7%), no intermediário 2 foram observados 21 pacientes (18,3%) e no de alto risco foi observado 19 pacientes (16,5%). No grupo das crianças com SD/SMD a

distribuição ficou: 1 criança no grupo intermediário 1, 1 criança no intermediário 2 e uma criança no alto risco. Evolução da doença foi verificada em 1 paciente (10%) com grupo de baixo risco, em 7 dos pacientes (10,7%) do grupo de prognóstico intermediário 1, em 12 dos pacientes (57,1%) do grupo de intermediário 2 e 17 dos pacientes (89,5%) classificados no grupo de alto risco (tabela 15).

Tabela 15 - Frequência de pacientes pediátricos com SMD nos diferentes grupos de risco de acordo com o IPSS (1997) e evolução da doença

Classificação IPSS Grupos de Risco	Nº de Pacientes (%)	Nº de Pacientes que apresentaram evolução da doença (%)	Nº de Pacientes que não apresentaram evolução da doença (%)
Baixo	10 (8,7%)	1 (10%)	9 (90%)
Intermediário 1	65 (56,5%)	7 (10,7%)	58 (89,3%)
Intermediário 2	21 (18,3%)	12 (57,1%)	9 (42,9%)
Alto Risco	19 (16,5%)	17 (89,5%)	2 (10,5%)

Verificamos a distribuição dos pacientes de acordo com o prognóstico citogenético segundo o IPSS e associamos com sua evolução. Observamos que dos 115 pacientes estudados, 52 (45,22%) foram classificados em bom prognóstico, 46 (40%) em prognóstico intermediário e 17 (14,78%) em mau prognóstico. A evolução da doença foi verificada em 4 (7,7%) dos pacientes classificados com cariótipo de bom prognóstico, 20 (43,5%) dos pacientes classificados com cariótipo de prognóstico intermediário e 13 (76,5%) dos pacientes classificados com cariótipo de mau prognóstico (tabela 16).

Tabela 16 - Frequência de pacientes pediátricos com SMD nos diferentes grupos de risco citogenéticos de acordo com o IPSS e evolução da doença

Prognóstico cariotípico	Nº de Pacientes (%)	Nº de Pacientes que apresentaram evolução da doença (%)	Nº de Pacientes que não apresentaram evolução da doença (%)
Bom	52 (45,22%)	4 (7,7%)	48 (92,3%)
Intermediário	46 (40%)	20 (43,5%)	26 (56,5%)
Mau	17 (14,78%)	13 (76,5%)	4 (23,5%)

A mesma análise foi realizada utilizando a classificação prognóstica do cariótipo segundo o IPSS-R. Verificamos que dos 115 pacientes analisados, 11 (9,57%) foram classificados em prognósticos muito bom, 59 (51,30%) em prognóstico bom, 40 (34,78%) em prognóstico intermediário, 2 (1,74%) em mau prognóstico e 3 (2,61%) em muito mau prognóstico. A evolução da doença foi verificada em 8 (72,7%) pacientes do grupo de cariótipo de muito bom prognóstico, em 4 (6,7%) pacientes do grupo de cariótipo de bom prognóstico, em 21(52,5%) pacientes do grupo de cariótipo de prognóstico intermediário, em 1(50%) paciente do grupo de cariótipo de mau prognóstico e em 3 (100%) dos pacientes do grupo de cariótipo de muito mau prognóstico (tabela 17).

Tabela 17 - Frequência de pacientes pediátricos com SMD nos diferentes grupos de risco citogenéticos de acordo com o IPSS-R (2012) e evolução da doença

Prognóstico cariotípico	Nº de Pacientes	Nº de Pacientes que apresentaram evolução da doença	Nº de Pacientes que não apresentaram evolução da doença
Muito Bom	11 (9,57%)	8 (72,7%)	3 (27,3%)
Bom	59 (51,30%)	4 (6,7%)	55 (93,3%)
Intermediario	40 (34,78%)	21 (52,5%)	19 (47,5%)
Mau	2 (1,74%)	1 (50%)	1 (50%)
Muito mau	3 (2,61%)	3 (100%)	0 (0%)

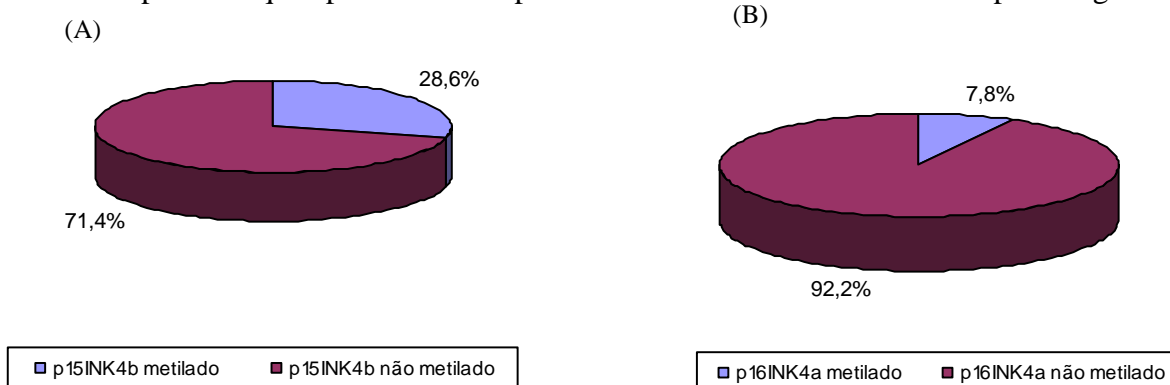
3.3 Análise molecular

3.3.1 Análise da frequência de metilação na região promotora dos genes $p15^{INK4b}$, $p16^{INK4a}$ pela técnica de MSP em pacientes com SMD primária na infância

A análise do padrão de metilação da região promotora dos genes $p15^{INK4b}$ e $p16^{INK4a}$ foi realizada em 77 pacientes com SMD primária na infância (apêndice D). Foi utilizado como controle negativo o DNA de células mononucleares de doadores de medula óssea e como controle positivo o DNA das células da linhagem Raji ($p15^{INK4b}$) e DLD-1 ($p16^{INK4a}$). Verificamos que 25 (32,46%) dos 77 pacientes com SMD primária da infância tinham pelo

menos um dos dois genes analisados metilados. Metilação do gene $p15^{INK4b}$ foi observada em 22 (28,6%) dos 77 pacientes e, apenas 6 (7,8%) pacientes apresentaram metilação para o gene $p16^{INK4a}$ (figura 16).

Figura 16 - Gráficos de setores mostrando a frequência de pacientes pediátricos com SMD primária que apresentaram o padrão metilado versus não metilado para os genes



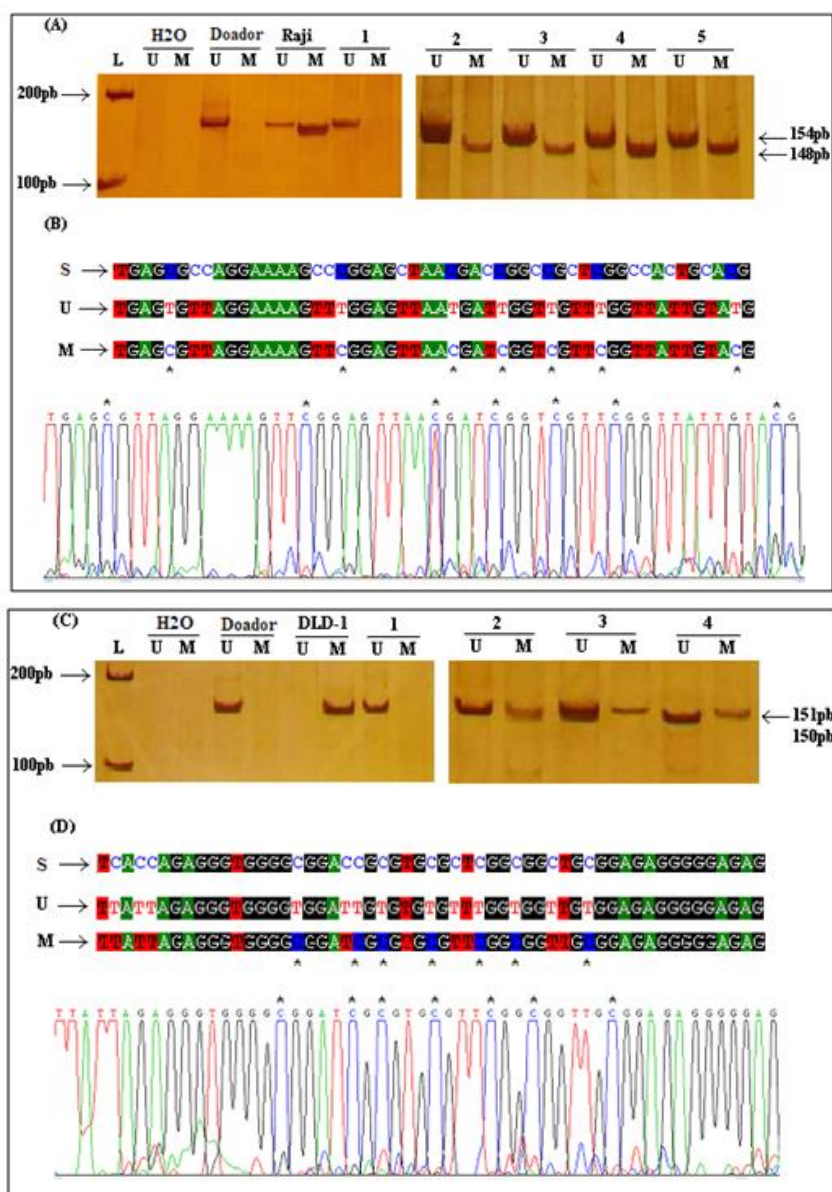
Legenda: (A) $p15^{INK4b}$ e (B) $p16^{INK4a}$.

Verificamos que todos os pacientes mostraram amplificação com os oligonucleotídeos específicos para a sequência não metilada, incluindo aqueles pacientes positivos para a metilação. Não foi detectada a presença de metilação dos genes $p15^{INK4b}$ e $p16^{INK4a}$ nas amostras de DNA dos doadores de medula óssea. As células da linhagem Raji e DLD-1 apresentaram forte amplificação com o par de oligonucleotídeos p15M e p16M, respectivamente (figura 17A e C). Aberrante metilação de ambos os genes foi observada em 3 (3,89%) dos 77 pacientes com SMD primária na infância.

Foram analisados para a metilação dos genes $p15^{INK4b}$ e $p16^{INK4a}$ dois pacientes com SD/SMD. Ambos os pacientes foram negativos para metilação dos genes estudados.

Todos os resultados foram confirmados pela técnica de sequenciamento (figura 17B e D).

Figura 17 - Figura representativa das técnicas de MSP e sequenciamento



Legenda: (A) Fotografia de gel de poliacrilamida 10% corado com nitrato de prata para o gene *p15^{INK4b}* utilizando oligonucleotídeos para p15 U, os quais são específicos para o DNA não metilado (U) e p15M, os quais são específicos para o DNA metilado (M), H₂O (controle negativo da reação), doadores (controle negativo), Raji (controle positivo), 1: paciente não metilado para o gene *p15^{INK4b}*, 2-5: pacientes metilados e não metilados para o gene *p15^{INK4b}*. (B) Produtos de PCR para as amostras metiladas foram sequenciadas pela Plataforma ABI PRISM 3130xGenetic Analyser (Life Technologies, USA). Resultados do sequenciamento das amostras metiladas (M) foram comparados com as sequências selvagem (S) (Genbank) e não metiladas (U) utilizando Bioedit software (v.7.0.9, Tom Hall, Ibis Biosciences, CA). (C) e (D) mostram uma análise similar para o gene *p16^{INK4a}*.

A distribuição da frequência de metilação do gene *p15^{INK4b}* nos diferentes subtipos foi de 10/51 (19,6%) nos pacientes com CR, 5/16 (31,2%) nos pacientes com AREB e 7/10

(70%) nos pacientes com AREB-t. Metilação do gene $p16^{INK4a}$ esteve presente em 2/51 (3,9%) dos pacientes com CR, 3/16 (18,7%) com AREB e em 1/10 (10%) com AREB-t (Tabela 18). A frequência de metilação do gene $p15^{INK4b}$ foi significativamente mais alta em estágios mais avançados da doença (AREB e AREB-t) quando comparado com os estágios iniciais (CR) ($p < 0,02$). Apesar da frequência de metilação no gene $p16^{INK4a}$ ter sido maior nos estágios avançados da doença (AREB e AREB-t) quando comparado com o estágio inicial (CR), este resultado não apresentou significância estatística.

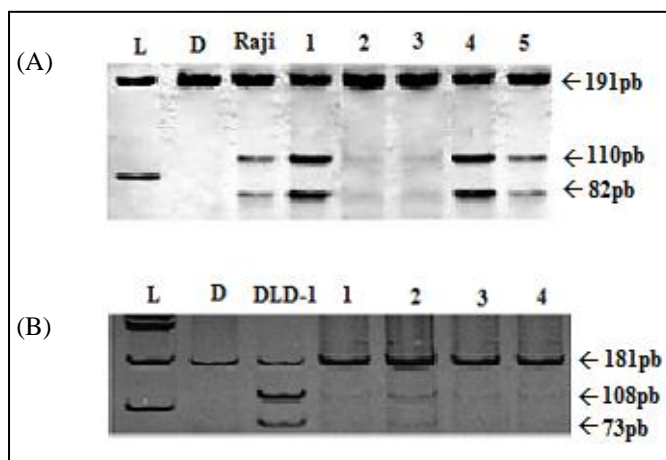
Tabela 18 - Análise de metilação dos genes $p15^{INK4b}$ e $p16^{INK4a}$ em SMD primária na infância pela técnica de MSP

Subtipo	Nº de pacientes	Nº de pacientes com metilação em $p15^{INK4b}$	Nº de pacientes com metilação em $p16^{INK4a}$
CR	51	10 (19,6%)	2 (3,9%)
SMD			
AREB	16	5 (31,2%)	3 (18,7%)
AREB-t	10	7 (70%)	1 (10%)
Total	77	22 (28,6%)	6 (7,8%)

3.3.2 Análise de metilação dos genes $p15^{INK4b}$, $p16^{INK4a}$ e *MDR-1* pela técnica COBRA

Os pacientes que apresentaram metilação nos genes $p15^{INK4b}$ e $p16^{INK4a}$ pela técnica COBRA (figura 18) foram os mesmos observados pela técnica MSP. A análise semi-quantitativa de porcentagem de metilação do gene $p15^{INK4b}$ nos pacientes positivos para metilação variou de 28% a 67%. Para o gene $p16^{INK4a}$ os pacientes apresentam uma taxa de metilação entre 14 a 22%.

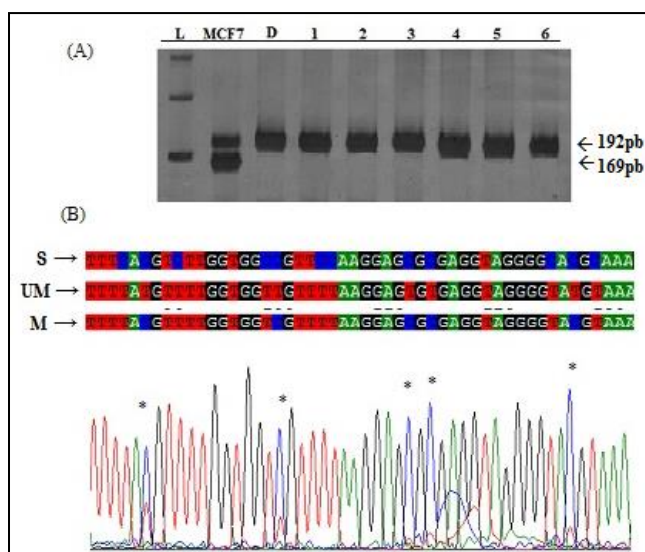
Figura 18 - Figura representativa da técnica COBRA para os genes $p15^{INK4b}$ e $p16^{INK4a}$



Legenda: (A) Fotografia de gel de poliacrilamida 10% corado com nitrato de prata do gene $p15^{INK4b}$ após a digestão com a enzima NruI. L- marcador de peso molecular “low mass” (Life Technologies, USA), D- doador (controle negativo), Raji (controle positivo), 1- 5 pacientes com SMD na infância. (B) análise similar para o gene $p16^{INK4a}$, utilizando para digestão, a enzima TaqI, e a linhagem DLD1, como controle positivo.

A análise de metilação do gene *MDR-1* mostrou que tanto os 7 doadores de medula quanto os 77 pacientes analisados, não apresentaram metilação na região estudada (figura 19A). Esses resultados foram confirmados pelo sequenciamento (figura 19B).

Figura 19 - Figura representativa das técnicas COBRA e sequenciamento para o gene *MDR-1*



Legenda: (A) Fotografia de gel de poliacrilamida 10% corado com nitrato de prata do gene *MDR-1* após a digestão com a enzima TaqI. L- marcador de peso molecular “low mass” (Life Technologies, USA), D- doador, 1- 6: pacientes. (B) Produtos de PCR para as amostras metiladas (linhagem MCF7) e não

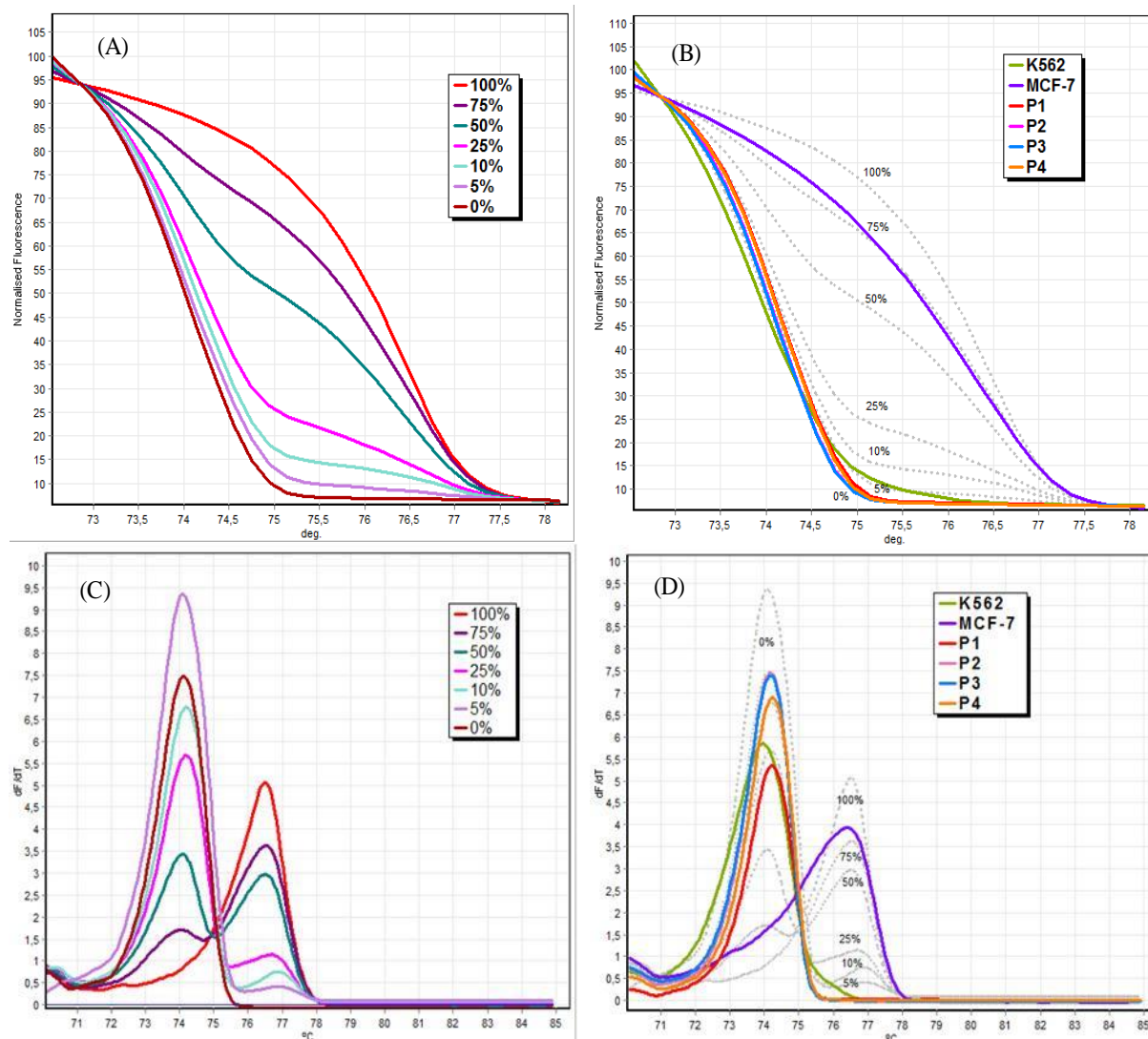
metiladas foram sequenciadas pela Plataforma ABI PRISM 3130x Genetic Analyser (Life Technologies, USA).

3.3.3 Análise quantitativa de metilação dos genes $p15^{INK4b}$, $p16^{INK4a}$ e $MDR-1$

Para avaliar os níveis de metilação nos genes $p15^{INK4b}$, $p16^{INK4a}$ e $MDR-1$ e sua associação com a evolução da doença utilizamos a técnica de QMS-PCR. Através da técnica de QMS-PCR verificamos que a porcentagem de metilação para o gene $p15^{INK4b}$ nos pacientes positivos variou de 37% a 74%. Para o gene $p16^{INK4a}$ os pacientes apresentam uma taxa de metilação entre 21% a 38%. Avaliamos o nível de metilação nos diferentes subtipos e observamos que a metilação do gene $p15^{INK4b}$ foi maior nos subtipos avançados da doença, AREB e AREB-t, quando comparado com o subtipo inicial CR. O mesmo resultado foi observado para o gene $p16^{INK4a}$. Comparando os dois métodos, COBRA e QMS-PCR, verificamos que ambos os métodos mostraram a existência de uma correlação entre os subtipos da doença e o nível de metilação. No entanto, o método de QMS-PCR apresentou maior sensibilidade do que o COBRA ($p < 0,0001$).

Com o objetivo de verificarmos a presença de metilação no gene $MDR-1$ aplicamos a técnica de HRM. Inicialmente, estabelecemos uma curva padrão realizando uma série de diluições 100%, 75%, 50%, 25%, 10%, 5% e 0% (figura 20A e C) com os DNAs universalmente não metilado e metilado. Em relação as linhagens, nossos resultados mostraram que as células da linhagem K562 têm uma baixa porcentagem de metilação, aproximadamente 5% e, que células da linhagem MCF-7 tem aproximadamente 75%-100% de metilação. As amostras de DNA dos 7 doadores e 77 pacientes estudados não apresentaram metilação para o gene $MDR-1$ na sequência analisada (Figura 20B e D).

Figura 20 - Figura representativa da análise do gene *MDR-1* pela técnica de HRM



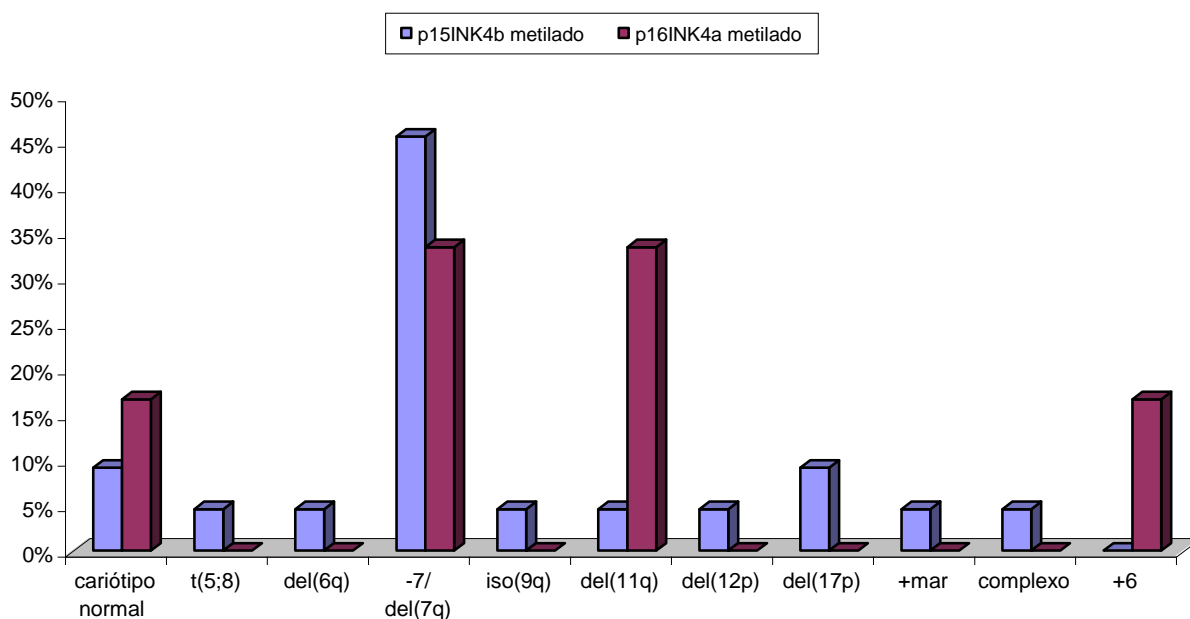
Legenda: Curva padrão normalizada e por dissociação mostrando os diferentes níveis de metilação do gene *MDR-1*: 100%, 75%, 50%, 25%, 10%, 5% e 0% (linhas coloridas A e C). Níveis de metilação das linhagens K562 e MCF-7 e dos pacientes (P1-P4) com SMD primária na infância estão representados por linhas coloridas e a curva padrão representada em linhas cinzas (B e D). Os dados foram exportados do Rotor Gene Q (Qiagen) e editado em TeeChart Office 2.0 (Steema Software).

3.3.4 Correlação entre a presença de metilação na região promotora dos genes *p15^{INK4b}* e *p16^{INK4a}* com os cariótipos e com as características clínicas

Foi observado que 90,9% (20/22) dos pacientes que apresentaram metilação para o gene *p15^{INK4b}* apresentaram cariótipos anormais. Analisando as diferentes alterações com a

metilação do gene $p15^{INK4b}$, verificamos que 45,45% (10) dos pacientes positivos para a metilação deste gene apresentaram alterações envolvendo o cromossomo 7, sugerindo uma forte associação entre a metilação no gene $p15^{INK4b}$ e alterações envolvendo o cromossomo 7 (del(7q)/-7). Foi observado metilação no gene $p15^{INK4b}$ em dois (9,1%) pacientes com cariótipo normal e em dois (9,1%) pacientes com del(17p). Com uma menor frequência (4,54%), a metilação no gene $p15^{INK4b}$ foi observada em pacientes com del(6q), i(9q), del(11q), del(12p), t(5;8), +mar, biclonal e cariótipo complexo. Em relação ao gene $p16^{INK4a}$, foi verificado que 100% dos pacientes positivos para a metilação deste gene apresentaram cariótipo anormal. Metilação do gene $p16^{INK4a}$ foi observada em dois pacientes com alterações envolvendo o cromossomo 7, dois com deleção 11q23, um com +6 e outro com t(5;8). A correlação entre a presença de metilação na região promotora dos genes $p15^{INK4b}$ e $p16^{INK4a}$ com o padrão cromossômico em pacientes pediátricos com SMD primária com pode ser observada na figura 21.

Figura 21 - Gráfico de barras mostrando a associação entre a presença de metilação na região promotora dos genes $p15^{INK4b}$ e $p16^{INK4a}$ com o cariótipo em pacientes com SMD primária na infância



Analisando o padrão de metilação dos genes $p15^{INK4b}$ e $p16^{INK4a}$ com as características clínicas dos pacientes verificamos que, evolução da doença foi verificada em 28 (36,4%) dos 77 pacientes analisados. Metilação do gene $p15^{INK4b}$ foi detectada em 46,4% (13/28) dos pacientes que apresentaram evolução da doença. Em contraste, não houve evolução da SMD para LMA em 72,7% (40/55) dos pacientes com ausência de metilação para o gene $p15^{INK4b}$. De fato, a associação do padrão de metilação com a evolução da doença foi claramente significativa ($p < 0,009$). Observamos evolução da doença em 66,6% (4/6) dos pacientes com metilação para o gene $p16^{INK4a}$. Em contraste, das 71 crianças que não apresentaram metilação para o gene $p16^{INK4a}$ 47 (66,2%) não evoluíram da doença. Não foi observada significância estatística para a correlação entre a presença de metilação no gene $p16^{INK4a}$ e evolução da doença.

A média de evolução da doença em pacientes com metilação em $p15^{INK4b}$ foi 4,5 meses e em pacientes com ausência de metilação para estes genes foi 15,2 meses. Desta forma, observamos que a média de evolução da doença para pacientes que apresentaram metilação para o gene $p15^{INK4b}$ foi aproximadamente três vezes menor do que daqueles que não apresentavam metilação.

A correlação da metilação dos genes $p15^{INK4b}$ e $p16^{INK4a}$ com as características clínicas pode ser observada na tabela 19. Estudando o padrão de metilação no gene $p15^{INK4b}$, não foi observado uma correlação estatisticamente significativa em relação ao sexo dos pacientes. No entanto, foi verificada uma correlação entre a idade, a porcentagem de blastos, citogenética, subtipos e evolução da doença. A análise de correlação entre a presença de metilação no gene $p16^{INK4a}$ com os parâmetros clínicos não apresentou significância estatística.

Tabela 19 - Correlação entre o padrão de metilação da região promotora dos genes $p15^{INK4b}$ e $p16^{INK4a}$ com as características clínicas de pacientes pediátricos com SMD primária

Parâmetros clínicos	Metilação do $p15^{INK4b}$		Metilação do $p16^{INK4a}$		p-valor	
	M (n=22)	UM (n=55)	M (n=6)	UM (n=71)	$p15^{INK4b}$	$p16^{INK4a}$
Idade						
<12 anos (n=53)	9	44	4	49	χ^2 p<0,001	NS
≥ 12 anos (n=24)	13	11	2	22		
Sexo						
masculino (n=42)	15	27	4	38	χ^2 p>0,1	NS
feminino (n=35)	7	28	2	33		
Citogenética						
Normal (n=29)	2	27	0	29	χ^2 p<0,001	NS
Anormal (n=48)	20	28	6	42		
Subtipos SMD						
Subtipo inicial CR (n=51)	10	41	2	49	χ^2 p<0,02	NS
Subtipos avançados AREB (n=16)/ AREB-t (n=10)	12	14	4	22		
Blastos na MO (%)						
<5%	10	41	2	49	χ^2 p<0,001	NS
5-19%	5	11	3	13		
20-29%	7	3	1	9		
Evolução da doença (SMD→LMA)						
Sim (n= 28)	13	15	4	24	χ^2 p<0,009	NS
Não (n= 49)	9	40	2	47		

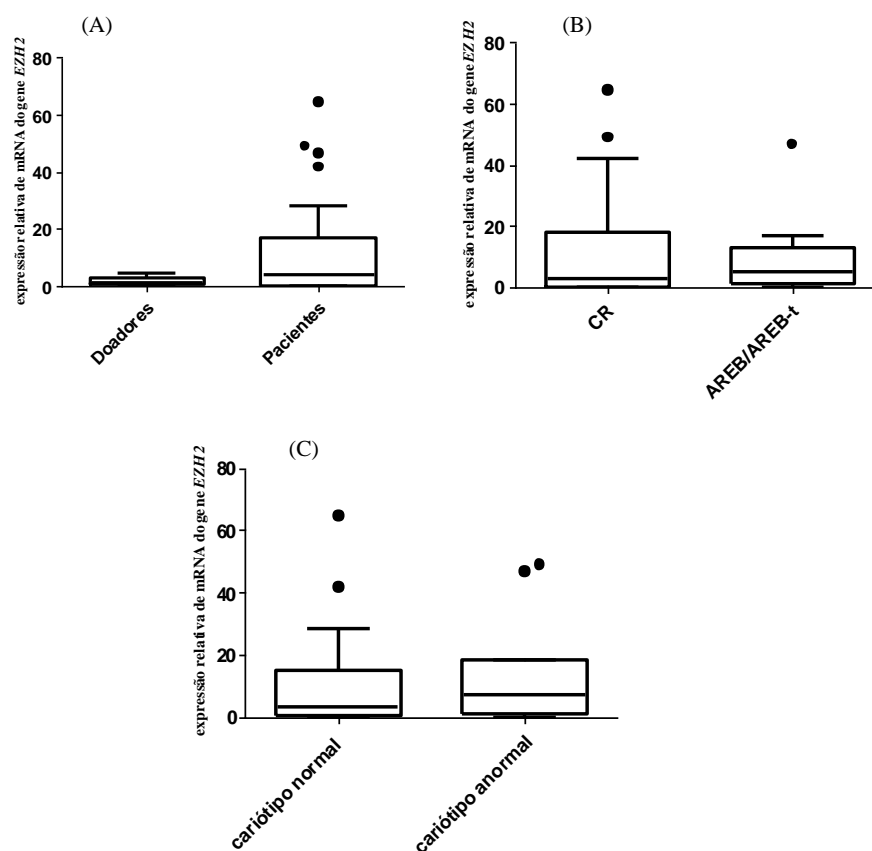
Legenda: CR- citopenia refratária, AREB- anemia refratária com excesso de blastos, AREB-t- anemia refratária com excesso de blastos em transformação, SMD- síndrome mielodisplásica, LMA- leucemia mielóide aguda, NS- não significativo.

3.3.5 Análise do padrão de expressão dos genes *MDR-1* e *EZH2* em pacientes com SMD primária na infância

A análise de expressão dos genes *MDR-1* e *EZH2* em pacientes pediátricos com SMD primária foi realizada pela técnica de qRT-PCR. Para esta análise foram estudados 7 amostras de células de medula óssea de doadores e 34 amostras de células de medula óssea de pacientes com SMD primária da infância. Desses pacientes, 25 foram classificados no subtipo inicial da doença (CR), e 9 nos subtipos avançados (AREB e AREB-t).

Dos 34 pacientes pediátricos com SMD primária, expressão do gene *EZH2* foi observada em 29 pacientes (85%). Os 7 doadores (100%) apresentaram expressão deste gene. A mediana, 4,09 (amplitude de 0 a 64,5), referente aos níveis relativos de expressão do gene *EZH2* nos pacientes foi maior em relação a mediana, 1,0 (amplitude de 0,2 a 4,5), dos doadores (Figura 22A). Analisando os níveis relativos de expressão do gene *EZH2* de acordo com os subtipos da doença, verificamos que o subtipo CR, apresentou a mediana, 2,7 (amplitude de 0-64,5), referente aos níveis relativos de expressão do gene *EZH2*, enquanto os subtipos mais avançados da doença, AREB/AREB-t apresentaram uma mediana, 4,9 (amplitude de 0-46,8) (Figura 22B). Em relação aos cariótipos, observamos que os pacientes com cariótipos anormais, apresentaram a mediana, 6,9 (amplitude de 0-49,2) referente aos níveis relativos de expressão do gene *EZH2* maior em relação aos pacientes com cariótipos normais, cuja mediana foi 4,1 (amplitude de 0-64,5) (Figura 22C). Esses resultados não apresentaram significância estatística (teste de Mann-Whitney).

Figura 22 - Análise dos níveis relativos de expressão do gene *EZH2* nos pacientes pediátricos com SMD primária

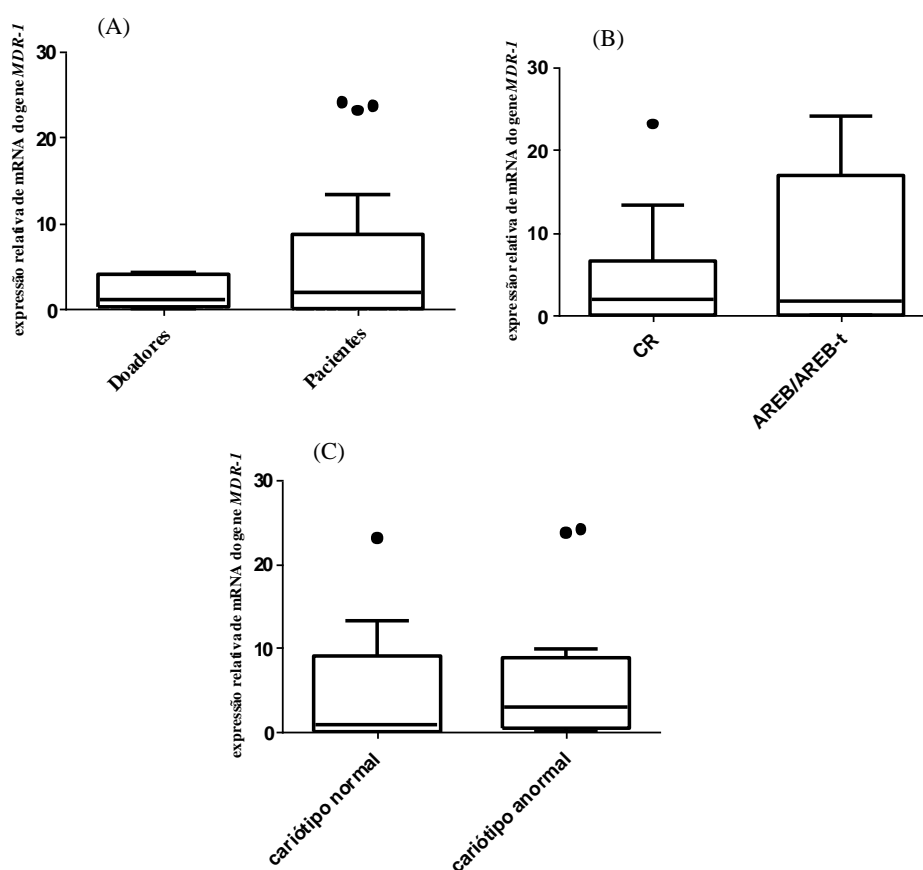


Legenda: (A) Doadores e pacientes; (B) CR e AREB/AREB-t; (C) Cariótipo normal e anormal. Os resultados estão apresentados em gráficos box-plot, mostrando a mediana, amplitude e os pontos representam os “outliers” (GraphPad Prism versão 5.0).

A análise dos níveis relativos de expressão do gene *MDR-1* em 34 pacientes pediátricos com SMD primária, mostrou que 24 (70,6%) pacientes apresentaram a expressão deste gene. Os 7 doadores (100%) apresentaram expressão do gene *MDR-1*. A mediana, 1,9 (amplitude de 0 a 24,1), referente aos níveis relativos de expressão do gene *MDR-1* nos pacientes foi maior em relação a mediana, 1,0 (amplitude de 0,1 a 4,2), dos doadores (Figura 23A). Analisando os níveis relativos de expressão do gene *MDR-1* de acordo com os subtipos da doença, verificamos medianas semelhantes (1,9) para o subtipo inicial, CR (amplitude de 0-23,1) e os subtipos avançados, AREB/AREB-t (amplitude de 0-24,1) (Figura 23B). Em relação aos cariótipos, observamos que os pacientes com cariótipos anormais, apresentaram uma mediana, 2,9 (amplitude de 0-24,1) referente aos níveis relativos de expressão do gene *MDR-1* maior em relação aos pacientes com cariótipos normais, cuja mediana foi 0,9

(amplitude de 0-23,1) (Figura 23C). Esses resultados não apresentaram significância estatística (teste de Mann-Whitney).

Figura 23 - Análise dos níveis relativos de expressão do gene *MDR-1* nos pacientes pediátricos com SMD primária



Legenda: (A) Doadores e pacientes; (B) CR e AREB/AREB-t; (C) Cariótipo normal e anormal. Os resultados estão apresentados em gráficos box-plot, mostrando a mediana, amplitude e os pontos representam os "outliers" (GraphPad Prism versão 5.0).

4 DISCUSSÃO

A síndrome mielodisplásica primária (SMD) compreende um grupo heterogêneo de doenças clonais de célula tronco hematopoética, associada geralmente com a evolução para LMA. A SMD ocorre predominantemente em idosos, sendo rara na infância. Embora os aspectos clínicos, morfológicos e laboratoriais da SMD durante a infância não estejam ainda completamente definidos, alguns estudos sugerem distintas características entre a SMD no adulto e na criança (SASAKI *et al.*, 2001; HASLE *et al.*, 2003). A raridade da SMD na infância e sua grande heterogeneidade contribuem para as dificuldades na classificação e na caracterização de fatores prognósticos.

Existem poucos estudos citogenéticos, moleculares e clínicos em SMD pediátrica envolvendo um grande número de pacientes. No sentido de entender melhor a patogênese da SMD pediátrica procuramos estudar as alterações cromossômicas e moleculares que atuam no desenvolvimento da doença e na sua evolução para LMA. Nosso grupo vem estudando a SMD por um longo período (desde 1991), o que permitiu realizar uma análise citogenética em 115 pacientes pediátricos com SMD e procurar acompanhar a evolução da doença. A idade média dos pacientes do nosso estudo foi de 8,5 anos, havendo uma distribuição similar entre o sexo masculino e o feminino. Estudos realizados na população da Europa e do Canadá, estimaram que a incidência de SMD pediátrica é de aproximadamente 1,8 a 4 casos por milhão de habitantes por ano (HASLE *et al.*, 1995b; HASLE *et al.*, 1999; GLAUBACH *et al.*, 2014). Até o momento, não existem estudos baseados na população brasileira mostrando a incidência da SMD pediátrica. Recentemente, Glaubach e colaboradores (2014) em um artigo de revisão mostraram que a idade média dos pacientes pediátricos com SMD é em torno de 6,8 anos e, a doença parece ser igualmente distribuída entre pacientes do sexo masculino e feminino.

Em nosso estudo observamos que de acordo com a classificação da SMD da infância, proposta por Hasle e colaboradores (2003), o subtipo CR foi o mais frequente, sendo observado em 78 dos 115 pacientes analisados. Os demais subtipos foram observados em menor frequência: 22 casos de AREB, 15 casos de AREB-t. Também foram incluídos neste estudo 3 pacientes portadores de Síndrome de Down apresentando SMD primária. Estes pacientes foram analisados como um grupo separado, SD/SMD, conforme a classificação da SMD pediátrica (HASLE *et al.*, 2003). Estudos iniciais em SMD na infância, utilizando a

classificação FAB, mostraram que a frequência de pacientes apresentando o subtipo menos agressivo AR era baixa, ocorrendo com maior incidência os casos de AREB e AREB-t (PASSMORE *et al.*, 1995; LOCATELLI *et al.*, 1995; MARTINEZ-CLIMENT, 1997). No entanto, estudos mais recentes têm revelado uma predominância do subtipo inicial da doença, CR, (KARDOS *et al.*, 2003; POLYCHRONOPOULOU *et al.*, 2004; NIEMEYER & KRATZ, 2008; GERMING *et al.*, 2008; HASLE & NIEMEYER, 2011; GLAUBACH *et al.*, 2014). Provavelmente, estas diferenças aconteceram devido à dificuldade do diagnóstico de SMD primária na infância, principalmente nos casos com menos de 5% de blastos na medula óssea, onde na prática clínica em pediatria, temos as anemias carenciais por deficiência de vitamina B12 e folato, infecções virais que podem levar a achados com dispoese de células hematopoéticas. Nestes casos, a utilização da combinação de diferentes metodologias de análise como: mielograma, biópsia de medula óssea, análise citogenética e imunofenotipagem é muito importante para o diagnóstico diferencial da SMD em pediatria.

O estudo das alterações cromossômicas na SMD auxilia não somente o diagnóstico, mas evidencia aspectos importantes da biologia da doença que refletem no prognóstico e na evolução do paciente. Anormalidades cromossômicas foram detectadas em 56,5% dos 115 casos estudados com SMD primária na infância. Nos subtipos mais avançados da doença, AREB e AREB-t, foi observado uma alta incidência de cariótipos anormais, 77,2% e 100%, respectivamente. Estudos multicêntricos demonstraram que a incidência de alterações cromossômicas em SMD pediátrica é de 30 a 50%. Similar aos nossos achados, esses estudos revelaram uma alta frequência de anormalidades citogenéticas, principalmente nos subtipos mais avançados, AREB e AREB-t (LUNA-FINEMAN *et al.*, 1999; SASAKI *et al.*, 2001; POLYCHRONOPOULOU *et al.*, 2004; LOPES *et al.*, 2006). A variação na porcentagem de casos com alterações cromossômicas pode estar associada a diversos fatores como variações no número de metáfases analisadas ou na amostra, com tendências para subtipos específicos. Assim, em estudos contendo um maior número de casos apresentando AREB e AREB-t, o índice de anormalidades cromossômicas será maior. Em nosso estudo, procuramos analisar um grande número de metáfases por paciente, uma vez que, no subtipo inicial da SMD na infância, CR, o clone citogeneticamente anormal pode ser muito pequeno, ao contrário do que acontece nos subtipos mais avançados da doença (AREB e AREB-t).

Ao contrário do que é encontrado em outras neoplasias hematológicas, como em leucemias e linfomas, em nosso estudo a análise citogenética sugere a ausência de uma alteração específica correlacionada com um subtipo da doença. O mesmo foi observado em

outros estudos (LUNA-FINEMAN *et al.*, 1999; HARBOTT *et al.*, 2000; JABBOUR *et al.*, 2013).

Neste estudo as anormalidades cromossômicas mais frequentes foram as alterações envolvendo o cromossomo 7 (-7/7q), sendo observada em 21,5% dos pacientes. Destes pacientes 71,4% evoluíram da doença e, 42,8% foram a óbito. Estudos em SMD pediátrica indicam a monossomia do cromossomo 7 como a anormalidade cromossômica de maior incidência, ocorrendo em aproximadamente 18-30% dos casos (AKTAS & TUNCBILEK, 2006; NIEMEYER & KRATZ, 2008, GÖHRING *et al.*, 2010). Diversos estudos, incluindo o IPSS associam as alterações cromossômicas envolvendo o cromossomo 7 com mau prognóstico e elevado risco de transformação leucêmica (AKTAS & TUNCBILEK, 2006; NIEMEYER & KRATZ, 2008). Aktas & Tuncbilek (2006) em uma análise de 43 pacientes pediátricos com SMD primária observaram uma frequência de 18,6% de alterações envolvendo o cromossomo 7 [-7 e del(7q)]. Eles observaram que esses pacientes estavam associados com alta taxa de evolução da doença (62,5%) e mortalidade (75%). Entretanto, Göhring e colaboradores (2010) sugeriram que a monossomia do cromossomo 7, quando identificada de forma isolada, apresenta um prognóstico neutro em pacientes com SMD primária na infância. A recente escala prognóstica IPSS-R, classifica a monossomia do cromossomo 7, quando presente de forma isolada ou acompanhada de outras alterações em um mau prognóstico e, a del(7q), quando presente de forma isolada em um prognóstico intermediário (GREENBERG *et al.*, 2012). Nossos resultados sugerem que alterações envolvendo o cromossomo 7, como alteração única ou acompanhada de outras alterações cromossômicas, estão associadas com a evolução da doença e alta taxa de mortalidade.

Alterações do cromossomo 7 são frequentemente observadas em neoplasias mielóides (AKTAS & TUNCBILEK, 2006; NIEMEYER & KRATZ, 2008; TRIPPUTI *et al.*, 2014). No cromossomo 7 estão localizados alguns genes que possuem um papel importante na hematopoese e progressão do câncer como: os genes do grupo *HoxA*, que são genes homeóticos, reguladores do desenvolvimento; o gene *ETV1* (*ETS*- "translocation variant 1") pertencente a família de fatores de transcrição *ETS* que modulam muitas funções celulares, incluindo proliferação, apoptose, diferenciação, migração, angiogênese; o gene *IL-6*, citocina envolvida na resposta inflamatória, atua na diferenciação de células B e em células progenitoras hematopoéticas; o gene *Twist-1*, fator de transcrição que atua na progressão do câncer; o gene *MDR-1* de resistência a múltiplas drogas, o gene *EZH2* pertencente ao grupo Polycomb relacionado a repressão gênica, entre outros (VARAMBALLY *et al.*, 2002;

CHAUHAN *et al.*, 2012; DESEN & HURET, 2014). Portanto, podemos perceber que alterações no cromossomo 7 terão uma forte influência com o desenvolvimento das neoplasias mielóides e refletem em seu prognóstico.

A deleção do braço longo do cromossomo 11 na região q23 foi a segunda alteração mais frequente em nosso estudo. Nesta região cromossômica está mapeado o gene *MLL*, frequentemente envolvido em leucemias agudas da infância (LLA e LMA). Geralmente, esse gene está associado com alterações cromossômicas do tipo translocação, conferindo mau prognóstico (LIM *et al.*, 2014). O IPSS classificava as alterações envolvendo o cromossomo 11 como de prognóstico intermediário, mas o atual IPSS reclassificou esta alteração cromossômica como estando incluída no grupo de muito bom prognóstico. Nossos resultados sugerem que esta alteração está envolvida em casos de evolução de SMD, CR para AREB e SMD para LMA. Portanto, é necessário um maior número de casos estudados para esclarecer o valor prognóstico desta alteração cromossômica.

A deleção do braço curto do cromossomo de 17 é apontada segundo o IPSS como prognóstico intermediário. Em nossos pacientes, a del(17p) foi observada em 6,15% e esteve presente no subtipo inicial, CR, e em casos com medula óssea hipocelular. Nestes casos vale a pena ressaltar o valor da citogenética como um diagnóstico diferencial entre SMD hipocelular e anemia aplástica, onde a presença de uma alteração cromossômica clonal caracteriza a SMD. Esse dado é muito importante, pois ambas as doenças são indicadas para o TCTH alogênico, no entanto, o condicionamento pré-TMO é específico para cada doença (DONEY *et al.*, 1997; YOUNG *et al.*, 2006). A nível morfológico a del(17p) esteve associada com uma dispoese significativa no setor granulocítio, ocorrendo a presença de células Pelguer-Hüet e ausência de granulações. Essas crianças apresentaram infecções graves e foram indicadas para o transplante de medula óssea, apresentando uma boa resposta ao tratamento. No braço curto do cromossomo 17 está localizado o gene supressor de tumor *TP53*, o qual codifica uma nucleofosfoproteína de 53-KDa que atua como regulador negativo da proliferação celular. Vários tipos de danos no DNA causados, por exemplo, por drogas anti-câncer ou radiações gama, ativam a proteína *TP53* resultando em uma parada do ciclo celular entre as fases G1 e G2, para reparar o dano existente no DNA. Se o DNA não for reparado, a via apoptótica dependente de *TP53* é ativada (PERRY & LEVINE, 1993; FARNEBO *et al.*, 2010). Em pacientes adultos com SMD ou LMA, mutações do *TP53* são observadas em menos de 10% dos casos, sendo frequentemente, associadas com a perda do braço curto do cromossomo 17, cariótipo complexo, resistência à quimioterapia e menor sobrevida (KITA-SASAI *et al.*, 2001;

HAFERLACH *et al.*, 2008). Em malignidades hematológicas pediátricas existe controvérsia quanto à frequência de anormalidades do gene *TP53*. Alguns estudos têm observado uma baixa frequência de alterações do gene *TP53* em pacientes pediátricos com SMD (FELIX *et al.*, 1996; JEKIC *et al.*, 2006; SAITO *et al.*, 2011). No entanto, Silveira e colaboradores (2009) verificaram que, em um total de 19 pacientes pediátricos com SMD, 94,7% apresentaram deleção do gene *TP53* de acordo com análise por FISH. Nesse estudo, foi sugerido que a deleção *TP53* em SMD representa um biomarcador clinicamente relevante que pode ser usado para definir a SMD pediátrica "de novo" (SILVEIRA *et al.*, 2009).

Cariótipos complexos foram observados em 4,61% dos pacientes estudados, estando associados com a evolução da doença. Os cariótipos destes pacientes apresentaram alterações cromossômicas numéricas e/ou estruturais e estiveram associados em todos os subtipos da SMD pediátrica. Recentemente, foi realizado um estudo em relação ao impacto prognóstico do cariótipo complexo em crianças com SMD em estágios avançados da doença. Foi observado que pacientes com cariótipo complexo apresentando uma alteração estrutural estão fortemente associados com um pior prognóstico e menor sobrevida (GÖHRING *et al.*, 2010).

A hiperdiploidia é considerada um cariótipo complexo. A hiperdiploidia I (número cromossômico modal maior que 46) é observada em várias crianças com diferentes neoplasias como a LLA e sua presença confere um prognóstico favorável (PUI, 1995; DASTUGUE *et al.*, 2013). A hiperdiploidia II (mais de 70 cromossomos), uma marca nos tumores anaplásicos, em combinação com translocações cromossômicas pode identificar pacientes com alto risco, estando associados, em geral, com a falha ao tratamento (DOUGLAS *et al.*, 1986; SHAPIRO *et al.*, 1993). Em nosso estudo tivemos uma criança com cariótipo hiperdiploide I, apresentando o estágio inicial da doença, CR. Esta criança foi associada com bom prognóstico. A presença de uma alteração cromossômica estrutural em cariótipo hiperdiploide I foi observado em dois pacientes. Um paciente apresentou a duplicação do braço longo do cromossomo 1 e o outro, a deleção do braço longo do cromossomo 6. Ambos os pacientes evoluíram para LMA. Poucos estudos em SMD na infância correlacionaram o valor prognóstico da hiperdiploidia (FERNANDEZ *et al.*, 2003). Acar e colaboradores (2001) descreveram uma criança com SMD hipocelular apresentando hiperdiploidia associada com mau prognóstico. No entanto, esta criança apresentava alterações congênitas. Dessa forma, em SMD da infância é necessário um estudo envolvendo um maior número de pacientes com hiperdiploidia para definição do seu valor prognóstico.

Observamos a trissomia do cromossomo 8 em 4,61% dos pacientes pediátricos analisados, estando presente em casos de AREB e AREB-t. Estes pacientes apresentaram evolução para LMA e faleceram. Nos pacientes adultos com SMD, a trissomia do cromossomo 8 é a alteração numérica mais comum e, parece ser predominante no sexo masculino. A trissomia do 8 não se associa a um subtipo específico de SMD, mas geralmente está associada com citopenia de uma ou três linhagens (CHAUFFAILLE, 2006). Solé *et al.* (2000) e Fernandez *et al.* (2000) sugeriram que alterações envolvendo o cromossomo 8 estão associadas com mau prognóstico e risco aumentado de transformação leucêmica. No entanto, recentemente Saumell e colaboradores (2012) analisaram o impacto prognóstico da trissomia do 8 isolada ou associada com outras alterações cromossômicas em 257 pacientes adultos com SMD primária. Eles sugeriram que pacientes com a trissomia do cromossomo 8 isolada podem ser incluído no grupo de risco intermediário, uma vez que apresentam um pior prognóstico quando comparado a pacientes com cariótipo normal e com blastos $\geq 5\%$ na medula óssea. Em SMD primária na infância não existem estudos sobre o impacto prognóstico da trissomia do 8. Em nosso estudo, esta alteração foi associada com os subtipos mais avançados da doença (AREB e AREB-t), alta taxa de transformação leucêmica e óbito.

A deleção do braço longo do cromossomo 5 foi observada em apenas um dos nossos pacientes. Esta alteração cromossômica é extremamente rara em crianças. Uma revisão da literatura descrita por Pitman e colaboradores (2006) mostra apenas 7 casos de crianças com del(5q). Em SMD primária em pacientes adultos, a del(5q) apresenta características morfológicas e clínicas específicas, sendo reconhecida como a Síndrome 5q-, entidade adotada pela classificação OMS. A clássica síndrome 5q- foi descrita, pela primeira vez, em 1974 por Van den Berghe e colaboradores. Esta alteração ocorre predominantemente em indivíduos do sexo feminino e idades avançadas, estando relacionada com bom prognóstico e baixo risco de transformação leucêmica. Nos últimos anos, o tratamento com lenalidomida, uma droga imunomodulatória, tem mostrado uma notável eficiência para pacientes com SMD e del(5q). Estudos sugerem que a lenalidomida atua na via de sinalização causada pela haploinsuficiência de genes específicos presentes na região comumente deletada do cromossomo 5. Desta forma, esta droga atua especificamente nos clones del(5q), enquanto promove a repopulação de células normais na medula óssea (GIAGOUNIDIS *et al.*, 2014). Os poucos casos descritos na literatura apresentando del(5q) na infância estiveram associados com mau prognóstico (PITMAN *et al.*, 2006). Em nosso estudo, a del(5q) esteve presente em uma criança do sexo feminino, com 13 anos de idade. Através da análise por FISH foi

detectada a perda de um dos alelos do gene *c-fms*, localizado na região q33q34. Este gene codifica o receptor de fator de crescimento de macrófago e apresenta uma função importante para proliferação e diferenciação de células mielóides (KRYNSKA *et al.*, 2007). O cromossomo 5 contém muitos genes que estão envolvidos na regulação da hematopoese, incluindo citocinas e seus receptores, reguladores de ciclo celular, fatores de transcrição e mediadores de sinalização celular. Este conjunto de genes envolvidos na hematopoese encontram-se entre a região 5q13~q33 e estão associados com as características clínicas dos pacientes com del(5q). A del(5q) pode originar a produção aberrante de citocinas e uma sinalização inapropriada de um ou mais genes. Além disso, características displásicas podem ser encontradas nas três linhagens hematopoéticas em pacientes com del(5q) (GIAGOUNIDIS, 2006).

Em nosso estudo, observamos um caso raro de biclonalidade citogenética envolvendo os cromossomos 11 e 17. O clone com del(17p) adquiriu uma segunda alteração cromossômica del(12p), sugerindo evolução da doença. A metodologia do FISH foi aplicada neste caso e detectou a ausência dos alelos dos genes *TP53* e *MLL*, confirmando a deleção do braço curto do cromossomo 17 e a deleção do braço longo do cromossomo 11, respectivamente. O clone contendo a del(11q) estava presente em um pequeno número de células, sendo visto em apenas 3 das 51 células analisadas. Dessa forma, a técnica de FISH foi importante para a confirmação desta alteração. A análise citogenética foi uma valiosa ferramenta para o diagnóstico, uma vez que havia dúvidas entre anemia aplástica e SMD hipocelular. O cariótipo também foi importante para a escolha do tratamento e para o acompanhamento deste paciente. Este paciente foi tratado com o transplante de células tronco de sangue de cordão umbilical e após 8 anos encontra-se em remissão completa. Este resultado representa o primeiro caso descrito na literatura de uma criança com SMD primária hipocelular apresentando alteração biclonal envolvendo os cromossomos 11 e 17 (apêndice B).

Alteração cromossômica biclonal ocorre raramente em doenças hematológicas. Em SMD, esta alteração foi descrita com uma frequência de 4,3-6,5%. As alterações mais frequentes descritas na literatura envolvendo clones não relacionados foram: del(5q), +8, del(20q), del(7q), +11, +21 e -22 (HAN *et al.*, 2006). Ainda não é claro, se clones citogeneticamente não relacionados indicam uma verdadeira biclonalidade da doença ou se é resultado de uma evolução clonal de um precursor. Nós acreditamos na hipótese de que clones não relacionados cariotipicamente, se originam de um clone maligno comum através de

mudanças moleculares submicroscópicas e um processo de múltiplas etapas de evolução da doença.

A SMD na infância pode ocorrer em pacientes com alterações genéticas constitucionais. Em nosso estudo observamos 3 pacientes com síndrome de Down (SD) e 1 paciente com uma translocação recíproca constitucional.

As crianças com SD apresentam um risco maior de cerca de 10-20 vezes de desenvolverem leucemia aguda, quando comparado com as crianças que não apresentam a SD. A maioria dos casos de SD/LMA corresponde ao subtipo leucemia megacarioblástica aguda (M7). Essas crianças também podem apresentar nos primeiros meses de vida a doença mieloproliferativa transitória (DMT), que pode desaparecer espontaneamente sem o tratamento com a quimioterapia. Alguns estudos mostraram que a base molecular para incidência aumentada de leucemia em crianças com SD, em particular LMA-M7, é devido a mutações somáticas adquiridas no gene *GATA-1*, localizado no cromossomo X, na região p11.

O gene *GATA-1* é um fator de transcrição com domínio "zinc-finger", é essencial para a diferenciação normal das linhagens eritróide e megacariocítica. O efeito da mutação neste gene é a introdução de um "stop codon" e a produção de uma proteína menor (GATA 1S) que possui uma capacidade de transativação alterada devido a perda do domínio de ativação N-terminal. GATA-1S leva a uma hiper-proliferação de precursores hematopoéticos e um bloqueio no programa de diferenciação, comprometendo principalmente a linhagem megacariocítica (VYAS *et al.*, 1999; XAVIER *et al.*, 2011; SHIMIZU *et al.*, 2012). Apesar do aumento do risco de desenvolvimento de leucemia em crianças com SD, elas, em geral, apresentam uma boa resposta ao tratamento quimioterápico com Ara C. Esse fato está associado ao aumento de expressão de genes que apresentam maior sensibilidade a drogas, como o gene cistationina beta sintetase que aumenta a suscetibilidade das células à apoptose (TAUB & GE, 2005). Em SMD, já foram observadas alterações no padrão de metilação da região promotora no gene *GATA1*. Estas alterações levam a inativação funcional de *GATA1* estando associadas com displasias no setor eritróide da SMD (HOPFER *et al.*, 2012)

Em nosso estudo, dois dos três pacientes com SD apresentaram alterações cromossômicas clonais ao diagnóstico. Um paciente no estágio inicial da doença, CR, e outro em estágio avançado, AREB-t. As alterações observadas nestes pacientes foram cariótipo complexo e hiperdiplóide I, respectivamente. Verificamos que o paciente que não apresentava alteração clonal ao diagnóstico, adquiriu uma alteração citogenética durante a evolução da

doença. Os 3 pacientes com SD evoluíram da SMD para LMA e apesar do tratamento quimioterápico, faleceram.

Foi observado em nosso estudo uma criança de 4 anos de idade, sexo feminino, fenótipo normal e com quadro clínico de SMD. A análise citogenética mostrou a presença de uma translocação constitucional envolvendo os cromossomos 3 e 8. Essa alteração cromossômica estava presente em 100% das células de medula óssea e em 100% das células do sangue periférico. O desenvolvimento de leucemias e SMD já foi observado em pacientes com mosaicismos da trissomia do cromossomo 8 constitucional (HASLE *et al.*, 1995a; ZOLLINO *et al.*, 1995; NARENDRAN *et al.*, 2004). Hasle e colaboradores em 1995 descreveram uma criança com fenótipo normal, mosaicismos da trissomia do cromossomo 8 constitucional e SMD. Narendran e colaboradores em 2004, analisaram células do estroma medular em uma criança com SMD e mosaicismos da trissomia do cromossomo 8 constitucional e, sugeriram que esta alteração constitucional pode influenciar na proliferação celular apresentando um papel crítico na patogênese da SMD. A $t(3;8)(p25;q12)$ constitucional ainda não foi descrita em SMD. No entanto, a $t(3;8)(q26;q24)$ clonal já foi descrito em pacientes com SMD e LMA (MERTENS *et al.*, 1987; LIN *et al.*, 2006). Recentemente, Xu e colaboradores (2014) descreveram 6 casos de neoplasias mielóides e $t(3;8)$. Essa alteração cromossômica esteve associada com prognóstico desfavorável e uma média de sobrevida de 10 meses. Em nosso estudo, esta paciente está sendo acompanhada clinicamente e não apresentou evolução da doença. Na região p25 do cromossomo 3 estão localizados diversos genes. Dentre eles podemos citar o gene *CIDEC*, envolvido no processo de fragmentação do DNA de células direcionadas para a apoptose e, os genes *FGD5* e *RAF* envolvidos em vias de proliferação celular. O gene *FGD5* atua ativando CDC42 membro da família Ras e o gene *RAF* codifica uma proteína que integra a via ERK1/2 como uma MAP quinase que atua em conjunto com a subfamília Ras de membrana associada a GTPases. No cromossomo 8, na região p12, está mapeado o gene *SDCBP*, o qual codifica a proteína sintenina-1 que atua na organização do citoesqueleto, adesão celular e ativação de fatores de transcrição, e o gene *CHD7*, um remodelador da cromatina dependente de ATP. Desta forma, a translocação constitucional $t(3;8)(p25;q12)$ pode estar relacionada com alterações em vias de sinalização que levam à predisposição do desenvolvimento da SMD.

Evolução citogenética tem sido observada em pacientes com SMD (BERNASCONI *et al.*, 2010; WANG *et al.*, 2010; JABBOUR *et al.*, 2013). Em nosso estudo, evolução citogenética foi observada em 7,8% dos pacientes pediátricos com SMD primária, não

apresentando uma alteração cromossômica específica. Estudos avaliando a incidência e a significância prognóstica da evolução citogenética em SMD, mostraram uma incidência de 17-29% de evolução clonal em pacientes adultos com SMD, estando associado com transformação para LMA e sobrevida diminuída (BERNASCONI *et al.*, 2010; WANG *et al.*, 2010; JABBOUR *et al.*, 2013). Recentemente, Jabbor e colaboradores (2013) sugeriram que aquisição de alterações cromossômicas durante o acompanhamento de pacientes definidos como de prognóstico de baixo risco, tem risco aumentado de transformação leucêmica e óbito. Estes estudos foram baseados em pacientes adultos com SMD primária e secundária. Em pacientes pediátricos com SMD, o acompanhamento da evolução citogenética é uma prática mais difícil, uma vez que crianças com alterações cromossômicas são em geral, indicadas para o tratamento com TCTH alogênico. Desta forma, até o momento não existem estudos sobre o impacto prognóstico da evolução citogenética em SMD primária na infância. Em nosso estudo, evolução citogenética clonal foi associada com a transformação leucêmica.

De acordo com o padrão cromossômico, a porcentagem de blastos na medula óssea, e o número de citopenias, nossos pacientes foram classificados nos grupos de risco segundo o IPSS. O grupo de risco de maior incidência em nosso estudo foi o intermediário 1, sendo observado em 56,5% (65) dos pacientes com SMD primária pediátrica. Verificamos que 8,7% dos pacientes foram classificados como de baixo risco, 18,3% como de risco intermediário 2 e 16,5% como de alto risco. Pacientes de alto risco estiveram associados com a evolução da doença, sendo verificado em 89,5% (17/19) dos pacientes, e alto índice de mortalidade 63,1% (12/19). Também foi observado uma alta taxa de evolução (57,1%) e mortalidade (47,6%) em pacientes de risco intermediário 2. Em pacientes de baixo risco e risco intermediário, evolução da doença foi verificada com menor incidência, 10% e 10,7%, respectivamente. O IPSS tem mostrado grande valor prognóstico para pacientes adultos com SMD. No entanto, alguns estudos sugerem que os fatores prognósticos que predizem a sobrevida ou progressão em adultos não são os mesmos para os pacientes pediátricos (HASLE *et al.*, 2004). Em um estudo japonês com crianças com SMD, a sobrevida diferiu entre os grupos de risco citogenéticos adotados pelo IPSS (SASAKI *et al.*, 2001). Alguns estudos têm encontrado uma tendência para uma sobrevida maior no grupo citogenético de risco intermediário (HASLE *et al.*, 2004; PASSMORE *et al.*, 2003). Esses resultados mostram a necessidade de um maior número de estudos sobre o impacto prognóstico das alterações cromossômicas em crianças com SMD.

Recentemente, foi realizada uma revisão do IPSS (GREENBERG *et al.*, 2012) e, alguns grupos têm sugerido que este novo sistema é eficaz na estratificação prognóstica de pacientes adultos com SMD (QU *et al.*, 2012). No entanto, existem controvérsias em relação ao valor prognóstico de alguns cariótipos, sendo questionado o fato desse novo sistema ter sido baseado em um número relativamente pequeno de pacientes, no qual 65% dos pacientes apresentavam trissomia do cromossomo 8 (PARDANANI & TEFFERI, 2012). A escala prognóstica revisada (IPSS-R) não foi aplicada ainda para pacientes com SMD primária na infância.

Em nosso estudo, aplicamos ambas as escalas de prognóstico citogenético. Baseado no prognóstico citogenético do IPSS (GREENBERG *et al.*, 1997), os pacientes foram classificados como de cariótipo de bom prognóstico e intermediário, com uma frequência de 45,2% e 40%, respectivamente. Com menor incidência, foi observado pacientes associados com cariótipo de mau prognóstico (14,8%). A evolução da doença esteve associada com maior frequência em pacientes com cariótipo de mau prognóstico (76,5%). Utilizando a escala IPSS-R, verificamos que a maior incidência foi de pacientes classificados com cariótipos de bom prognóstico e intermediário, sendo observado em 51,3% e 34,78%, respectivamente. No entanto, evolução da doença foi observada com uma alta frequência em pacientes classificados em muito bom prognóstico, mau e muito mau, sendo verificado em 72,7%, 50% e 100%, respectivamente. Desta forma, nossos resultados sugerem que essa nova escala de prognóstico citogenético não é completamente eficaz para estratificar os pacientes pediátricos com SMD primária.

A SMD é uma doença clonal que parece ter origem a partir de uma modificação afetando uma célula hematopoética pluripotente. É caracterizada por alterações qualitativas (displasias) e quantitativas (citopenias) em eritrócitos, granulócitos e megacariócitos. As linhagens linfóides também apresentam alterações. Embora o número de células B, seja provavelmente normal em SMD, elas são funcionalmente imaturas, havendo um descontrole na produção de imunoglobulinas. O número de células T e NK ("natural killer") em SMD é reduzido apresentando função prejudicada. Cerca de 10-40% dos casos evoluem para LMA e em raros casos para leucemia linfóide ou bifenotípica (LOPES & LORAND, 1999; AKTAS & TUNCBILEK, 2006; GOEL *et al.*, 2007). Em nosso estudo, foi observado um caso de uma criança com diagnóstico inicial de CR e citogenética normal. Após 4 meses, essa criança apresentou evolução clínica. O estudo citogenético mostrou um cariótipo complexo pela citogenética clássica e fusão *ETV6-RUNX1* [t(12;21)] pela técnica de FISH. A análise

imunofenotípica indicou uma LLA-B. Este paciente foi tratado com quimioterapia e faleceu após 6 meses do diagnóstico. Estudos indicam que a evolução da SMD para LLA ocorre em menos de 1% dos pacientes adultos e é extremamente rara em pacientes pediátricos (GUPTA & BHATIA, 2010). Existem poucos relatos de casos descrevendo a evolução de SMD pediátrica para LLA. Aktas & Tuncbilek (2006) relatam evolução de SMD primária para LLA em duas crianças, caracterizadas citogeneticamente com monossomia do cromossomo 7. O tempo médio de evolução foi de 9 meses. Esses pacientes foram tratados com TCTH e um deles faleceu. Outros dois estudos observaram evolução de SMD pediátrica primária para LLA tipo B, em um período de 4 meses. Entretanto, nesses estudos, a análise citogenética não foi realizada. Esses pacientes apresentaram boa resposta ao tratamento com quimioterapia (GOEL *et al.*, 2007; GUPTA & BHATIA, 2010).

Nossos resultados mostraram que as alterações cromossômicas em SMD primária na infância, assim como na SMD do adulto, são caracterizadas principalmente por perdas parciais ou totais de cromossomos, sugerindo que a principal classe de genes envolvidos na patogênese da SMD é de supressores de tumor, ocorrendo sua inativação ou sua haploinsuficiência. O modelo de lesão em múltiplas etapas exige uma primeira alteração, seguida de outras subsequentes. Sendo assim, a inativação de um gene supressor de tumor se daria pela perda de uma cópia do gene por deleção ou monossomia e a outra sofreria inativação por mutação ou perda de expressão por metilação (ROSENFELD & LIST, 2000; WALTER *et al.*, 2012).

Estudos moleculares em pacientes com SMD descreveram o silenciamento transcricional de diversos genes associados com a metilação de sua região promotora. Estes genes estão envolvidos na regulação do ciclo celular, proliferação, diferenciação, apoptose, adesão celular, entre outros (ISSA, 2010). Entretanto, poucos estudos mostraram a presença de metilação em SMD primária na infância (HASEGAWA *et al.*, 2005; VIDAL *et al.*, 2007, KIM *et al.*, 2013). Isso nos levou a investigar a presença de metilação na região promotora dos genes $p15^{INK4b}$, $p16^{INK4a}$ e $MDR-1$ nos pacientes pediátricos com SMD primária.

Em nosso estudo, a metilação no gene $p15^{INK4b}$ foi observada em 28,57% (22/77) dos pacientes com SMD na infância. As maiores frequências de metilação para o gene $p15^{INK4B}$ estiveram presentes nos subtipos mais avançados de SMD, como AREB e AREB-t, sendo observadas em 31,2% e 70% respectivamente. No subtipo inicial da doença, CR, a frequência de metilação foi mais baixa (19,6%). HASEGAWA e colaboradores (2005), em um estudo similar, apresentou uma frequência superior de metilação neste gene (78%). Esta diferença

pode estar relacionada ao fato da maioria dos seus pacientes terem sido classificados dentro dos subtipos mais avançados AREB e LMMC ou em um subtipo “duvidoso” classificado como SMD/LMA-M6, o qual ele denominou de AREB/M6. Vidal e colaboradores (2006) demonstraram uma frequência de metilação em $p15^{INK4b}$ de 50%, sendo também todos os pacientes classificados dentro dos subtipos mais avançados da SMD, AREB e AREB-t. Kim e colaboradores (2013) analisaram o padrão de metilação do gene $p15^{INK4b}$ em 25 pacientes pediátricos com SMD e observaram uma frequência de metilação para este gene de 28%. Similar ao nosso estudo, a maioria dos pacientes foram classificados no subtipo inicial, CR.

Nossos resultados mostraram que a metilação do gene $p16^{INK4a}$ é um evento raro, ocorrendo em baixa frequência (7,8%) nos pacientes pediátricos analisados, sugerindo que provavelmente este não seja o principal evento envolvido na patogênese da SMD. As proteínas codificadas pelos genes $p15^{INK4b}$ e $p16^{INK4a}$ agem como reguladoras negativas do ciclo celular, inibindo a formação do complexo cilina D/CDK4 e ciclina D/CDK6. Além disso, estão associada ao processo de diferenciação celular e manutenção da homeostase durante a diferenciação das linhagens eritróides (MINAMI *et al.*, 2003). Estudos têm demonstrado silenciamento deste gene por metilação em tumores sólidos, como carcinoma hepatocelular (FUKAI *et al.*, 2005). No entanto, em malignidades hematológicas a frequência de metilação neste gene é baixa ou nula (TOYOTA *et al.*, 2001; GARCIA-MANERO *et al.*, 2002; HASEGAWA *et al.*, 2005; HOFMANN *et al.*, 2006). Vidal e colaboradores (2006) analisando o padrão de metilação de vários genes em SMD da infância, verificaram que nenhum dos pacientes apresentaram metilação no gene $p16^{INK4a}$. O mesmo resultado foi obtido por Hasegawa e colaboradores (2005).

Em nosso estudo, metilação aberrante em ambos os genes, $p15^{INK4b}$ e $p16^{INK4a}$, foi vista em apenas 3 (3,89%) dos 77 pacientes analisados. Embora o número de pacientes seja pequeno, a metilação em ambos os genes $p15^{INK4b}$ e $p16^{INK4a}$ revelou ser um pior prognóstico para pacientes com SMD da infância, visto que 2 dos 3 pacientes evoluíram da doença em um menor período de tempo e foram a óbito.

Alguns grupos já demonstraram a frequência e a importância da hipermetilação na região promotora do gene $p15^{INK4b}$ em pacientes adultos com SMD. A frequência de metilação no gene $p15^{INK4B}$ em adultos com SMD ou leucemia aguda (LA) tem sido observada em torno de 38% a 69% (UCHIDA *et al.*, 1997; QUESNEL *et al.*, 1998; HOFMANN *et al.*, 2006), podendo ser verificada no diagnóstico ou durante a progressão da doença (TIEN *et al.*, 2001).

Jiang e colaboradores (2009) mostraram que alterações no padrão de metilação do DNA é um mecanismo dominante no silenciamento de genes supressores de tumor e, é uma variação clonal no processo de evolução da SMD para LMA. Nossos resultados mostraram uma correlação estatisticamente significativa entre evolução da doença e metilação no gene $p15^{INK4b}$. Dos pacientes que apresentavam metilação para o gene $p15^{INK4b}$, 59,1% (13/22) evoluíram da doença. Apesar da baixa frequência de metilação no gene $p16^{INK4a}$ observada em nossos estudo, estes pacientes estiveram associados com evolução para LMA. Dos pacientes que apresentaram metilação para $p16^{INK4a}$, 66,6% (4/6) evoluíram para LMA. Estudos em SMD têm sugerido que as diferenças no nível de metilação dos genes possam contribuir para a heterogeneidade da SMD (KIM *et al.*, 2010). Em nosso estudo, observamos uma correlação direta entre o nível de metilação no gene $p15^{INK4B}$ dos pacientes com SMD pediátrica e a porcentagem de blastos. Kim e colaboradores (2013) verificaram que altos níveis de metilação do gene $p15^{INK4b}$ estão associados com porcentagem de blastos maior que 5% e cariótipo anormal.

Nossos resultados sugerem que a proliferação do clone mielodisplásico e a evolução da SMD em direção à LMA pode requerer uma "fuga" da regulação da fase G1 do ciclo celular e, a metilação do gene $p15^{INK4B}$ provavelmente exerce um importante papel neste processo. Em adultos com SMD, a metilação do gene $p15^{INK4b}$ esteve associada com estágios avançados da doença (AREB e AREB-t), sugerindo exercer um papel na progressão e evolução para LMA (UCHIDA *et al.*, 1997; QUESNEL *et al.*, 1998; KIM *et al.*, 2010). Em SMD pediátrica, apenas um estudo recente sugere que a metilação no gene $p15^{INK4b}$ está associada com a progressão da doença (KIM *et al.*, 2013)

Metilação dos genes $p15^{INK4b}$ e $p16^{INK4a}$ estiveram associados com cariótipos anormais, 90,9% e 100% respectivamente. Além disso, nossos resultados sugerem uma forte associação entre a presença de metilação em $p15^{INK4b}$ e alterações no cromossomo 7 (-7/del7q), levando à evolução da doença. Uma revisão da literatura mostrou que, até o momento, não foi descrito um estudo mostrando correlação entre as alterações citogenéticas e a presença de metilação em genes nos pacientes adultos e pediátricos com malignidades hematológicas primárias (LLA, LMA e SMD) (GARCIA-MANERO *et al.*, 2003; KIM *et al.*, 2010). No entanto, em pacientes adultos com SMD secundária Au e colaboradores (2003) verificaram uma forte correlação entre metilação do gene $p15^{INK4b}$ e alterações cromossômicas envolvendo o cromossomo 7 (-7/7q-).

Em 2010, nosso grupo publicou um artigo com 47 pacientes pediátricos com SMD primária e a análise de metilação nos genes $p15^{INK4b}$ e $p16^{INK4a}$. Neste estudo Rodrigues e colaboradores (2010), sugeriram que metilação nos genes $p15^{INK4b}$ e $p16^{INK4a}$ sejam biomarcadores de evolução de SMD para LMA (apêndice E e anexo B). Dando continuidade a esse estudo, nossos resultados em 77 pacientes estudados sugerem que apenas a metilação no gene $p15^{INK4b}$ tem um papel importante na transformação leucêmica para pacientes pediátricos com SMD e a metilação no gene $p16^{INK4a}$ é um evento bastante raro. Esse resultado mostra a importância da pesquisa translacional, onde a presença de metilação no gene $p15^{INK4b}$, um biomarcador de evolução da doença, pode ser incorporado na rotina laboratorial como um teste adicional auxiliando na escolha do tratamento.

A hematopoese abrange os fenômenos relacionados à origem, multiplicação e a maturação de células sanguíneas formadas a partir das células-tronco hematopoéticas (HSCs). Mudanças na expressão gênica das HSC fazem parte dos eventos que regulam o equilíbrio entre a auto-renovação e a diferenciação destas células. Estas mudanças são acompanhadas, e frequentemente precedidas, de alterações epigenéticas, embora pouco se conheça acerca dos reguladores epigenéticos que participam da homeostasia sanguínea (SASHIDA & IWANA, 2012).

Evidências têm mostrado que eventos epigenéticos possuem um papel crítico na manutenção da auto-renovação das HSCs, o que também parece ser verdadeiro no contexto das células-tronco leucêmicas (LSCs). Estas questões surgiram a partir da observação de mutações em genes reguladores epigenéticos em doenças hematológicas, fazendo crer que as desregulações epigenéticas possam estar envolvidas na transformação, bem como na manutenção das LSCs (HEIDEL *et al.*, 2011; SASHIDA & IWANA, 2012; SHIH *et al.*, 2012). Portanto, hoje acredita-se que as alterações epigenéticas desempenhem um papel importante na iniciação, na promoção e na progressão neoplásica (ESTELLER, 2008).

Em se tratando de reguladores epigenéticos, o grupo Polycomb (PcG) está envolvido com diferentes tipos de câncer. Em mamíferos os genes *PcG* compreendem dois complexos multiméricos conhecidos como Complexo Polycomb Repressivo (PRC) 1 e 2 (LEVINE *et al.*, 2004). *EZH2* (*Enhance of Zeste 2*) é a subunidade catalítica do complexo PRC2 e possui atividade repressora transcricional baseada na trimetilação da histona 3 (H3K27me3) via domínio SET e utilizando S-adenosilmetionina (SAM) como doador do radical metil. H3K27me3 serve de ponto de ligação para o complexo PRC1, com consequente remodelamento da cromatina. Este evento resulta em uma cromatina compacta, fechada,

tornando a região promotora inacessível aos fatores de transcrição (FRANCIS *et al.*, 2004; ZHOU *et al.*, 2008).

Outros eventos que levam ao silenciamento gênico através de H3K27me₃, incluem as atividades conjuntas de *EZH2* e de enzimas das famílias das DNA metil-transferases (DNMTs) e das histonas deacetilases (HDACs). No trabalho de revisão de Tsang & Cheng (2011), os autores descreveram que genes que adquirem H3K27me₃, estão mais predispostos a hipermetilação de DNA “de novo”. Além disso, *EZH2* se liga, física e funcionalmente, às HDACs, promovendo a desacetilação de diversas lisinas das histonas 3 e 4, incluindo H3K27.

Em geral, *EZH2* não se expressa, ou se expressa em quantidades reduzidas, em tecidos adultos normais. Por outro lado, a expressão aumentada tem sido descrita em diferentes tipos de tumores sólidos, tais como o câncer de próstata e o câncer de mama (VARAMBALLY *et al.*, 2002; BACHMANN *et al.*, 2006). Nesses dois tumores, o aumento de expressão foi associado a um maior do risco de metástases, à agressividade tumoral e a menor sobrevivência dos pacientes. Em nosso estudo, analisamos a expressão de *EZH2* em 34 pacientes pediátricos com SMD primária e verificamos um aumento nos níveis de expressão deste gene em relação aos doadores. Quando analisamos os níveis relativos de expressão de *EZH2* com os subtipos (inicial versus estágios avançados) e com os cariótipos, verificamos um aumento de expressão de *EZH2*, nos subtipos AREB/AREB-t e nos casos com cariótipo anormal. Uma revisão da literatura mostra um único estudo de expressão de *EZH2* em SMD. Xu e colaboradores (2011) avaliaram a expressão deste gene, através de qRT-PCR em amostras de medula óssea de pacientes adultos com SMD. Os autores verificaram um aumento significativo da expressão de *EZH2* e de outros dois genes da família Polycomb, *BMI1* e *RING1* nestes pacientes. Através destas análises os autores concluíram que o aumento da expressão destes genes é comum na SMD e está relacionado a um mau prognóstico.

A SMD é uma doença caracterizada pela refratariedade ao tratamento quimioterápico. O gene *MDR-1*, localizado no braço longo do cromossomo 7 na região q21 codifica a glicoproteína P, responsável pelo transporte de uma ampla variedade de componentes, incluindo agentes quimioterápicos, sendo por isso, relacionado com a resistência a múltiplas drogas em diversos tipos de câncer. Vários estudos têm mostrado que a regulação transcricional deste gene é complexa. No entanto, a literatura sugere a metilação como um dos possíveis mecanismos que pode estar envolvido no processo de ativação e inativação deste gene (KANTHARIDIS *et al.*, 1997; NAKAYAMA *et al.*, 1998; SWERTS *et al.*, 2006; SHI *et al.*, 2011).

Em nosso estudo, a metilação no gene *MDR-1* foi observada em diferentes níveis nas linhagens celulares K562 e MCF7 e observamos uma relação inversa entre os níveis de metilação e expressão (apêndice F). Posteriormente, buscamos analisar o padrão de metilação e de expressão do gene *MDR-1* em indivíduos saudáveis (doadores de medula óssea) e em pacientes pediátricos com SMD. No entanto, não foi observada metilação para este gene em amostras de células de medula óssea de indivíduos saudáveis e nos 34 pacientes com SMD primária pediátrica. Existem poucos estudos abordando o padrão de metilação do gene *MDR-1* em pacientes com leucemia e SMD. Metilação do gene *MDR-1* foi observada em pacientes com LMA com uma baixa frequência (TOYOTA *et al.*, 2001). Shi e colaboradores (2011) analisaram o padrão de metilação do gene *MDR-1* em 228 pacientes com diversas malignidades hematológicas, incluindo dois pacientes com SMD. Eles verificaram uma associação entre o aumento de expressão do gene *MDR-1* com a hipometilação de sua região promotora. Nossos resultados sugerem que pacientes com SMD primária pediátrica não apresentam metilação na região promotora do gene *MDR-1* nos sítios CpG analisados, sendo necessário um estudo com um maior número de pacientes para confirmar os nossos achados. Também é importante o estudo da metilação em outros locais de ilhas CpGs na região promotora do gene *MDR-1*.

Em relação ao nível expressão do gene *MDR-1*, observamos que a expressão deste gene foi maior em pacientes com SMD primária na infância do que nos indivíduos saudáveis, doadores de medula óssea. A análise de expressão do gene *MDR-1* com os diferentes subtipos de SMD mostrou níveis de expressão semelhantes entre o subtipo inicial da doença (CR) e os estágios avançados (AREB/AREB-t). Comparando o nível de expressão com o cariótipo dos pacientes, observamos um aumento no nível de expressão do gene *MDR-1* nos pacientes com cariótipo anormal em relação aos pacientes com cariótipo normal. No entanto, nossos resultados não apresentaram significância estatística. Em malignidades hematológicas, altos níveis de expressão do gene *MDR-1* têm sido associados com baixa resposta à quimioterapia, pior prognóstico, sobrevida reduzida e alta taxa de recidiva da doença (CHAUHAN *et al.*, 2012). Em SMD, expressão do *MDR-1* foi observada especialmente em estágios mais avançados da doença, como AREB, AREB-t e LMA secundária a SMD, estando isto associado a um pior prognóstico, menor sobrevida e alta probabilidade de evolução para LMA. No entanto, estes resultados são baseados na SMD do adulto (LIST *et al.*, 1991; LEPALLEY *et al.*, 1994; ZOCHBAUER *et al.*, 1994; KURATA *et al.*, 2006). Nossos resultados sugerem que a expressão alterada do gene *MDR-1* pode ser uma característica

intrínseca da SMD, contribuindo para a refratariedade ao tratamento e que o aumento de expressão deste gene pode ser um marcador auxiliando na indicação do tratamento com o TCTH alogênico.

Como a SMD é uma doença extremamente heterogênea, diversas vias de desenvolvimento e evolução da doença podem ocorrer. Neste contexto, estudos levantam a seguinte questão: se alterações cromossômicas detectadas em SMD primária são eventos iniciais que levam ao desenvolvimento da doença (causa) ou se são apenas fenômenos secundários (consequência) (CHAUFFAILLE, 2006). De acordo com a teoria de múltiplas etapas de desenvolvimento da SMD primária, nossos resultados sugerem que as alterações cromossômicas são eventos intermediários, desencadeando uma grande instabilidade genética. Expressão alterada do gene *MDR-1* parece ser uma característica da doença associada a refratariedade ao tratamento. Expressão alterada do gene *EZH2* parece também contribuir para o desenvolvimento da SMD, uma vez que este gene possui um papel importante na regulação da auto renovação e diferenciação das células tronco hematopoéticas. A aquisição de alterações no padrão de metilação da região promotora do gene *p15^{INK4b}* é um evento tardio associado com a transformação leucêmica, sendo um provável marcador de evolução da doença. Nossos resultados sugerem que uma provável via de evolução em SMD primária na infância seria a associação $-7/\text{del}(7q)$ e metilação em *p15^{INK4b}*.

CONCLUSÕES

- a) A SMD primária na infância apresenta uma alta frequência de alterações cromossômicas (56,5%);
- b) O estudo citogenético mostrou que o padrão cariotípico da SMD primária na infância é caracterizado principalmente por perdas parciais ou completas de cromossomos (deleções e monossomias) e ganhos cromossômicos (trissomias);
- c) A análise citogenética mostrou ser essencial no processo de diagnóstico de todos os casos de suspeita de SMD pediátrica sendo uma importante ferramenta para a escolha do tratamento;
- d) As anomalias cromossômicas de maior frequência neste estudo foram as alterações envolvendo o cromossomo 7 (-7/7q) e del(11)(q23);
- e) A metilação da região promotora do gene *p15^{INK4b}* é um evento frequente em subtipos mais avançados da SMD primária na infância e está associada com a transformação leucêmica;
- f) A metilação na região promotora do gene *p16^{INK4a}* é um evento raro em SMD primária na infância, estando possivelmente associada com a evolução da doença;
- g) Metilação na região promotora no gene *p15^{INK4b}* mostrou uma forte associação entre as alterações envolvendo o cromossomo -7/7q-, sugerindo uma provável via de evolução da doença;
- h) Expressão do gene *EZH2* é um evento frequente em pacientes com SMD primária na infância; estando associado principalmente com cariótipos anormais e estágios avançados da doença.
- i) Expressão do gene *MDR-1* é um evento frequente em pacientes com SMD primária na infância; estando associado principalmente com cariótipos anormais, no entanto, parece apresentar níveis de expressão semelhantes no estágio inicial, CR, e avançados (AREB/AREB-t).
- j) As alterações cromossômicas, -7/7q-; del(11)(q23) e cariótipos complexos, e presença de metilação em *p15^{INK4b}* estão associadas com mau prognóstico, sendo prováveis biomarcadores de evolução da doença.

REFERÊNCIAS

- ACAR, H.; CALIŞKAN, U.U.; KAYNAK, M.; *et al.* Hyperdiploid karyotype in a childhood MDS patient. *Clin Lab Haematol.* v.23, n.4, p. 255-258, 2001.
- AGGERHOLM, A.; HOLM, M.S.; GULDBERG, P.; *et al.* Promoter hypermethylation of $p15^{INK4B}$, *HIC1*, *CDH1*, and *ER* is frequent in myelodysplastic syndrome and predicts poor prognosis in early-stage patients. *Eur. J. Haematol.* v.76, p. 23-32, 2006.
- AKTAS D & TUNCBILEK E. Myelodysplastic syndrom associated with monosomy 7 in childhood: a retrospective study. *Cancer Genet. Cytogenet.* v.171, p.72-75, 2006.
- AMBUDKAR, S.V.; KIMCHI-SARFATY, C.; SAUNA, Z.E; *et al.* P-glycoprotein: from genomics to mechanism. *Oncogene.* v.22, n.47, p.7468-7485, 2003.
- ATALLAH E, KANTARJIAN H, GARCIA-MANERO G. The role of decitabine in the treatment of myelodysplastic syndromes. *Exp. O. Pharmac.*v.8, p.65-73, 2007.
- AU, W.Y.; FUNG, A.; MAN, C.; *et al.* Aberrant *p15* gene promoter methylation in therapy-related myelodysplastic syndrome and acute myeloid leukaemia: clinicopathological and karyotypic associations. *Br. J. Haematol.*v.120, p.1062-1065, 2003.
- BACHER, U.; HAFERLACH, T.; KERN, W.; *et al.* The impact of cytomorphology, cytogenetics, molecular genetics and immunophenotyping in a comprehensive diagnostic workup of myelodysplastic syndromes. *Cancer.* p. 4524-4532, 2009.
- BACHER, U.; HAFERLACH, T.; SCHNITTGER, S.; *et al.* Investigation of 305 patients with myelodysplastic syndromes and 20q deletion for associated cytogenetic and molecular genetic lesions and their prognostic impact. *Br J Haematol.* v.164, n.6, p.822-833, 2014.
- BACHMANN, I.M.; HALVORSEN, O.J.; COLLETT, K.; *et al.* EZH2 expression is associated with high proliferation rate and aggressive tumor subgroups in cutaneous melanoma and cancers of the endometrium, prostate, and breast. *J Clin Oncol.* v.24, n.2, p.268-273, 2006.
- BAJAJ, R.; XU, F.; XIANG, B.; *et al.* Evidence-based genomic diagnosis characterized chromosomal and cryptic imbalances in 30 elderly patients with myelodysplastic syndrome and acute myeloid leukemia. *Mol Cytogenet.* v.4, n.3, p. 1-10, 2011.
- BALLEN, K.K.; HALEY, N.R.; Kurtzberg, J.; *et al.* Outcomes of 122 diverse adult and pediatric cord blood transplant recipients from a large cord blood bank. *Transfusion.* v. 46, p. 2063-2070, 2006.
- BARON, V.; ADAMSON, E.D.; Calogero, A.; *et al.* The transcription factor Egr1 is a direct regulator of multiple tumor suppressors including TGFbeta1, PTEN, p53, and fibronectin. *Cancer Gene Ther.* v.13, n.2, p.115-124, 2006.
- BARROS, S.P.; OFFENBACHER, S. Epigenetics: connecting environment and genotype to phenotype and disease. *J Dent Res.* v.88, n.5, p.400-408, 2009.

- BAUMANN, I.; FÜHRER, M.; BEHRENDT, S.; *et al.* Morphological differentiation of severe aplastic anaemia from hypocellular refractory cytopenia of childhood: reproducibility of histopathological diagnostic criteria. *Histopathology*. v.61, n.1, p.10-17, 2012.
- BELLI, C.B.; BENGIÓ, R.; ARANGUREN, P.N.; *et al.* Partial and total monosomal karyotypes in myelodysplastic syndromes: comparative prognostic relevance among 421 patients. *Am J Hematol*. v.86, n.7, p.540-545, 2011.
- BENNETT, J.M.; CATOVSKY, D.; DANIEL, M.T.; *et al.* Proposals for the classification of the myelodysplastic syndromes. *Br J Haematol*. v.51, p.189-199, 1982.
- BERNASCONI, P.; KLERSY, C.; BONI, M.; *et al.* Does cytogenetic evolution have any prognostic relevance in myelodysplastic syndromes? A study on 153 patients from a single institution. *Ann Hematol*. v.89, n.6, p.545-551, 2010.
- BORGONOVO, T.; RIBEIRO, E.M.S.F.; CORNÉLIO, D.A.; *et al.* Cytogenetic study of Brazilian patients with myelodysplastic syndrome (MDS). *Genetics and Molecular Biology*. v.28, p.654-660, 2005.
- BRUNSTEIN, C.G.; BAKER, K.S.; WAGNER, J.E. Umbilical cord blood transplantation for myeloid malignancies. *Curr Opin Hematol*. v.14, p.162-169, 2007.
- CAMPBELL, L.J.; GARSON, O.M. The prognostic significance of deletion of the long arm of chromosome 20 in myeloid disorders. *Leukemia*. v.8, p.67-71, 1994.
- CANDILORO, I.L.M.; MIKESKA, T.; HOKLAND, P.; *et al.* *Epigenetics & Chromatin*.v.1, p.1-10, 2008.
- CARDOSO, C.; MIGNON, C.; HETET, G.; *et al.* The human *EZH2* gene: genomic organization and revised mapping in 7q35 within the critical region for malignant myeloid disorders. *Eur J Hum Genet*. v.8, p.174-180, 2000.
- CHAN, G.C.; WANG, W.C.; RAIMONDI, S.C.; *et al.* Myelodysplastic syndrome in children: differentiation from acute myeloid leukemia with a low blast count. *Leukemia*. v.11, p. 206-211, 1997.
- CHAN, R.J.; COOPER, T.; KRATZ, C.P.; *et al.* Juvenile myelomonocytic leukemia: a report from the 2nd *International JMML Symposium*. *Leuk Res*. v.33, n.3, p.355-362, 2009.
- CHASE A, CROSS NC. Aberrations of *EZH2* in cancer. *Clin Cancer Res*. v.17, n.9, p.2613-2618, 2011.
- CHATTERJEE, T.; CHOUDHRY, V.P. Childhood myelodysplastic syndrome. *Indian J Pediatr*. v.80, p.764-771, 2013.
- CHAUHAN, P.S.; BHUSHAN, B.; SINGH, L.C.; *et al.* Expression of genes related to multiple drug resistance and apoptosis in acute leukemia: response to induction chemotherapy. *Exp Mol Pathol*. v. 92, n.1, p.44-49, 2012.

CHEN, J.; LI, J.; HAN, Q.; *et al.* Enhancer of zeste homolog 2 is overexpressed and contributes to epigenetic inactivation of p21 and phosphatase and tensin homolog in B-cell acute lymphoblastic leukemia. *Exp Biol Med* (Maywood). v.237, p.1110-1116, 2012.

COTRAN, R.S.; KUMAR, V.; COLLINS, T. *Neoplasias*. In: Robbins, Patologia Estrutural e Funcional. Guanabara Koogan. 6ª ed., p. 253-254, 2000.

CREUTZIG, U.; CANTÙ-RAJNOLDI, A.; RITTER, J.; *et al.* Myelodysplastic syndromes in childhood. Report of 21 patients from Italy and West Germany. *Am J Pediatr Hematol Oncol*. v.9, n.4, p.324-330, 1987.

DASTUGUE, N.; SUCIU, S.; PLAT, G.; *et al.* Hyperdiploidy with 58-66 chromosomes in childhood B-acute lymphoblastic leukemia is highly curable: 58951 CLG-EORTC results. *Blood*. v.121, n.13, p.2415-2423, 2013.

DE SIMONE, A.; CANTÙ RAJNOLDI, A.; SAINATI, L.; *et al.* Spontaneous remission from RAEB in a child. *Leukemia*. v.15, n.5, p.856-857, 2001.

DE SOUZA, D.C.; OTERO, L.; TAVARES, R.C.; *et al.* An uncommon case of a child with del(5q) and hypocellular myelodysplastic syndrome. *Pediatr Blood Cancer*. v.55, n. 4, p.767, 2010.

DELFORGE, M. Understanding the pathogenesis of myelodysplastic syndromes. *The Hematol. J*. v. 4, p.303-309, 2003.

DESSEN P, HURET JL . Chromosome . *Atlas Genet Cytogenet Oncol Haematol*. Disponível em : http://AtlasGeneticsOncology.org/Indexbychrom/idxa_7.html. Acesso em: May 2014.

DONEY, K.; LEISENRING, W.; STORB, R.; *et al.* Primary treatment of acquired aplastic anemia: outcomes with bone marrow transplantation and immunosuppressive therapy. Seattle Bone Marrow Transplant Team. *Ann Intern Med*. v.126, n.2, p.107-115, 1997.

ECONOMOPOULOU, C.; PAPPAS, V.; PAPAGEORGIOU, S.; *et al.* Cell cycle and apoptosis regulatory gene expression in the bone marrow of patients with de novo myelodysplastic syndromes (MDS). *Ann Hematol*. v.89, n.4, p.349-58, 2010.

ERNST, T.; CHASE, A.J.; SCORE, J.; *et al.* Inactivating mutations of the histone methyltransferase gene EZH2 in myeloid disorders. *Nat. Genet*. v.42, n.8, p.722-726, 2010.

ESPIGADO, I.; MARÍN-NIEBLA, A.; PÉREZ-HURTADO, J.M.; *et al.* Hemopoietic Stem Cell transplantation in Childhood: Reduction in Mortality and Improvement of Survival Over the Years. *Transpl. Proceed*. v.37, p.1555-1556, 2005.

ESTELLER, M. EPIGENETICS IN CANCER. *N Engl J Med*. v.358, n.11, p.1148-1159, 2008.

FARNEBO, M.; BYKOV, V.J.; WIMAN, K.G. The p53 tumor suppressor: a master regulator of diverse cellular processes and therapeutic target in cancer. *Biochem Biophys Res Commun.* v.396, n.1, p.85-89, 2010.

FELIX, C.A.; HOSLER, M.R.; PROVVISOR, D.; *et al.* The p53 gene in pediatric therapy-related leukemia and myelodysplasia. *Blood.* v.87, n.10, p.4376-4381, 1996.

FENAUX, P.; ADES, L. Review of azacitidine trials in Intermediate-2-and High-risk myelodysplastic syndromes. *Leuk Res.* v.2, p.S7-11, 2009.

FERNANDEZ, T.S.; MENEZES, D.S.; MACEDO SILVA, M.L.; *et al.* Correlation of *N-ras* point mutations with specific chromosomal abnormalities in primary myelodysplastic syndrome. *Leuk Res.* v.22, p.125-134, 1998.

FERNANDEZ, T.S.; ABDELHAY, E.; DE SOUZA, F.T.; *et al.* Chromosomal alterations associated with evolution from myelodysplastic syndrome to acute myeloid leukemia. *Leuk. Res.* v.24; p.839-848, 2000.

FERNANDEZ, T.S.; ORNELLAS, M.H.; TAVARES, R.C.; *et al.* Hyperdiploid karyotype in a child with hypocellular primary myelodysplastic syndrome. *Eur J Haematol.* v.71, n.5, p.399-401, 2003.

FIKUS, W.; PRANPAT, M.; BALASIS, M.; *et al.* Histone deacetylase inhibitors deplete enhancer of zeste 2 and associated polycomb repressive complex 2 proteins in human acute leukemia cells. *Mol Cancer Ther.* v.5, n.12, p.3096-3104, 2006.

FLETCHER, J.I.; HABER, M.; HENDERSON, M.J.; *et al.* ABC transporters in cancer: more than just drug efflux pumps. *Nat Rev Cancer.* v.10, n.2, p.147-156, 2010.

FRANCIS, N.J.; KINGSTON, R.E.; WOODCOCK, C.L. Chromatin compaction by a polycomb group protein complex. *Science.* v.306, n.5701, p.1574-157, 2004.

FUKAI, K.; YOKOSUKA, O.; IMAZEKI, F.; *et al.* Methylation status of p14ARF, p15INK4b, and p16INK4a genes in human hepatocellular carcinoma. *Liver Int.* v.25, n.6, p.1209-1216, 2005.

GALM, O.; HERMAN, J.G.; BAYLIN, S.B. The fundamental role of epigenetics in hematopoietic malignancies. *Blood Reviews.* v.20, p.1-13, 2006.

GARANDEAU, C.; PAUTAS, E.; ANDREUX, M.; *et al.* Myelodysplastic syndromes. *Ann. Biol. Clin.* v.58, p.405-416, 2000.

GARCIA-MANERO, G.; RAMOS-BUESO, C.; DANIEL, J.; *et al.* DNA methylation patterns at relapse in adult acute lymphocytic leukemia. *Clin. Cancer Res.* v.8; p.1897-1903; 2002.

GARCIA-MANERO, G. Methylation, aging, and pediatric acute lymphocytic leukemia. *Leukemia.* v.17, p.2063-2064, 2003.

GARCIA-MANERO, G.; GORE, S.D.; COGLE, C.; *et al.* Phase I study of oral azacitidine in myelodysplastic syndromes, chronic myelomonocytic leukemia, and acute myeloid leukemia. *J Clin Oncol.* v.29, n.18, p.2521-2527, 2011.

GARCIA-MANERO, G. Myelodysplastic syndromes: 2012 update on diagnosis, risk-stratification, and management. *American Journal of Hematology.* v.87, p.693-701, 2012.

GERMING, U.; AUL, C.; NIEMEYER, C.M.; *et al.* Epidemiology, classification and prognosis of adults and children with myelodysplastic syndromes. *Ann Hematol.* v.87, n.9, p.691-699, 2008.

GIAGOUNIDIS, A.A.; GERMING, U.; AUL, C. Biological and prognostic significance of chromosome 5q deletions in myeloid malignancies. *Clin Cancer Res.* v.12, n.1, p.5-10, 2006.

GIAGOUNIDIS, A.; HAASE, D. Morphology, cytogenetics and classification of MDS. *Best Pract Res Clin Haematol.* v.26, n.4, p.337-353, 2013.

GIAGOUNIDIS, A.; MUFTI, G.J.; FENAUX, P.; *et al.* Lenalidomide as a disease-modifying agent in patients with del(5q) myelodysplastic syndromes: linking mechanism of action to clinical outcomes. *Ann Hematol.* v.93, n.1, p.1-11, 2014.

GILES, F.J.; STOPECK, A.T.; SILVERMAN, L.R.; *et al.* SU5416, a small molecule tyrosine kinase receptor inhibitor, has biologic activity in patients with refractory acute myeloid leukemia or myelodysplastic syndromes. *Blood.*v.102, p.795-801, 2003.

GIRALT, S. Bone marrow transplant in myelodysplastic syndromes: new technologies, same questions. *Curr Hematol Rep.* v.4, p.200-207, 2005.

GLAUBACH, T.; ROBINSON, L.J.; COREY, S.J. Pediatric myelodysplastic syndromes: they do exist! *J Pediatr Hematol Oncol.*v.36, n.1, p.1-7, 2014.

GOEL, R.; KUMAR, R.; BAKHSHI, S. Transformation of childhood MDS-refractory anemia to acute lymphoblastic leukemia. *J Pediatr Hematol Oncol.* v.29, n.10, p.725-727, 2007.

GÖHRING, G.; MICHALOVA, K.; BEVERLOO, H.B.; *et al.* Complex karyotype newly defined: the strongest prognostic factor in advanced childhood myelodysplastic syndrome. *Blood.* v.116, n.19, p.3766-3769, 2010.

GREENBERG, P.; COX, C.; LEBEAU, M.M.; *et al.* International scoring system for evaluating prognosis in myelodysplastic syndromes. *Blood.* v.89, p.2079-2088, 1997.

GREENBERG, P.L.; TUECHLER, H.; SCHANZ, J.; *et al.* Revised International Prognostic Scoring System (IPSS-R) for Myelodysplastic Syndromes. *Blood.* v.120, n.12, p.2454-2465, 2012.

GREENBERG, P.L. The multifaceted nature of myelodysplastic syndromes: clinical, molecular, and biological prognostic features. *J Natl Compr Canc Netw.* v.11, n.7, p.877-884, 2013.

GRUBACH, L.; JUHL-CHRISTENSEN, C.; RETHMEIER, A.; *et al.* Gene expression profiling of Polycomb, Hox and Meis genes in patients with acute myeloid leukaemia. *Eur J Haematol.*; v.81, n.2, p.112-122, 2008.

GUPTA, V.; BHATIA, B. Transformation of myelodysplastic syndrome to acute lymphoblastic leukemia in a child. *Indian J Hematol Blood Transfus.* v.26, n.3, p.111-113, 2010.

HAASE, D. Cytogenetic features in myelodysplastic syndromes. *Ann Hematol.* v.87, p.515-526, 2008.

HAASE, D.; GERMING, U.; SCHANZ, J.; *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, p.4385-4395, 2007.

HAFERLACH, C.; DICKER, F.; HERHOLZ, H.; *et al.* Mutations of the TP53 gene in acute myeloid leukemia are strongly associated with a complex aberrant karyotype. *Leukemia.* v.22, n.8, p.1539-1541, 2008.

HAN, J.Y.; THEIL, K.S.; HOELTGE, G. Frequencies and characterization of cytogenetically unrelated clones in various hematologic malignancies: seven years of experiences in a single institution. *Cancer Genet. Cytogenet.* v.164, p.128-132, 2006.

HARBOTT, J.; HAAS, O.A.; KERNDROP, G.; *et al.* Cytogenetic evaluation of children with MDS and JMML. Results of the European working group of childhood MDS (EWOG-MDS). *Leukemia.* v.14, p.961, 2000.

HARRIS, N.L.; JAFFE, E.S.; DIEBOLD, J.; *et al.* The World Health Organization classification of hematological malignancies report of the Clinical Advisory Committee Meeting, Airlie House, Virginia, November 1997. *Mod Pathol.* v.13, p.193-207, 2000.

HASEGAWA DMANABE, A.; KUBOTA, T.; KAWASAKI, H.; *et al.* Methylation status of the *p15* and *p16* genes in paediatric myelodysplastic syndrome and juvenile myelomonocytic leukaemia. *Br. J. Haematol.* v.128, p.805-812, 2005.

HASLE, H.; CLAUSEN, N.; PEDERSEN, B.; *et al.* Myelodysplastic syndrome in a child with constitutional trisomy 8 mosaicism and normal phenotype. *Cancer Genet Cytogenet.* v.79, n.1, p.79-81, 1995a.

HASLE, H.; KERNDROP, G.; JACOBSEN, B.B. Childhood myelodysplastic syndrome in Denmark: incidence and predisposing conditions. *Leukemia.* v.9, p.1569-1572, 1995b.

HASLE, H.; ARICÒ, M.; BASSO, G.; *et al.* Myelodysplastic syndrome, juvenile myelomonocytic leukemia, and acute myeloid leukemia associated with complete or partial monosomy 7. *European Working Group on MDS in Childhood (EWOG-MDS).* v.13, p.376-385, 1999.

HASLE, H.; NIEMEYER, C. M.; CHESSELS, J.M.; *et al.* A pediatric approach to the WHO classification of myelodysplastic and myeloproliferative diseases. *Leukemia.* v.17, n.277-282, 2003.

HASLE, H.; BAUMANN, I.; BERGSTRÄSSER, E.; *et al.* The international prognostic scoring system (IPSS) for childhood myelodysplastic syndrome (MDS) and juvenile myelomonocytic leukemia (JMML). *Leukemia*. v.18, p.2008-2014, 2004.

HASLE, H. Myelodysplastic and myeloproliferative disorders in children. *Curr Opin Pediatr*. v.19, n.1, p.1-8, 2007.

HASLE, H.; NIEMEYER, C.M. Advances in the prognostication and management of advanced MDS in children. *British Journal of Haematology*. v.154, n.2, p.185-195, 2011.

HEAD, D.R. Proposed changes in the definitions of acute myeloid leukemia and myelodysplastic syndrome: are they helpful? *Curr Opin Oncol*. v.14, p.19-23, 2002.

HEIDEL, F.H.; MAR, B.G.; ARMSTRONG, S.A. Self-renewal related signaling in myeloid leukemia stem cells. *Int J Hematol*. v.94, n.2, p.109-117, 2011.

HELLSTRÖM-LINDBERG, E.; WILLMAN, C.; BARRETT, A.J.; *et al.* Achievements in understanding and treatment of myelodysplastic syndromes. *Hematology*. v.2000, n.1, p.110-132, 2000.

HERMAN, J.; GRAFF, J.R.; MYÖHÄNEN, S.; *et al.* Methylation-specific PCR: A novel PCR assay for methylation status of CpG islands. *Proc. Natl. Acad. Sci. Medical Sciences*. v.93, p. 9821-9826, 1996b.

HOCK, H. A complex Polycomb issue: the two faces of EZH2 in cancer. *Genes Dev*. v.26, n.8, p.751-755, 2012.

HOFMANN, W-K.; TAKEUCHI, S.; TAKEUCHI, N.; *et al.* Comparative analysis of hypermethylation of cell cycle control and DNA-mismatch repair genes in low-density and CD34+ bone marrow cells from patients with myelodysplastic syndrome. *Leuk. Reseach*. v.30, p.1347-1353, 2006.

HOPFER, O.; NOLTE, F.; MOSSNER, M.; *et al.* Epigenetic dysregulation of *GATA1* is involved in myelodysplastic syndromes dyserythropoiesis. *Eur J Haematol*. v.88, n.2, p.144-153, 2012.

HUNGERFORD, D.A. Leukocytes cultured from small inocula of whole blood and the preparation of metaphase chromosomes by treatment with hypotonic KCl. *Stain Technol*. v.40, n.6, p.333-338, 1965.

HUANG, J.; LAI, P.; ZHOU, M.; *et al.* A multiparametric flow cytometry immunophenotypic scoring system for the diagnosis and prognosis of myelodysplastic syndromes. *Clin Lab*. v.58, n.11, p.1241-1251, 2012.

HUMBERT, J.R.; HATHAWAY, W.E.; ROBIN, A.; *et al.* Preleukemia in children with missing bone marrow C chromosome and a myeloproliferative disorder. *Br J haematol*. v.21, p.705-716, 1971.

IACOBUCCI, I.; FERRARI, A.; LONETTI, A.; *et al.* CDKN2A/B alterations impair prognosis in adult BCR-ABL1-positive acute lymphoblastic leukemia patients. *Clin Cancer Res.* v.17, n.23, p.7413-7423, 2011.

IBRAHIM, S.; ESTEY, E.H.; PIERCE, S.; *et al.* 11q23 abnormalities in patients with acute myelodysplastic syndrome as detected by molecular and cytogenetic analyses. *Am J Clin. Pathol.* v.114, p.793-797, 2000.

ISSA J-P. Epigenetic Changes in the Myelodysplastic syndrome. *Hematol. Oncol. Clin N Am.* v. 24, p.317-330, 2010.

JABBOUR, E.; TAKAHASHI, K.; WANG, X.; *et al.* Acquisition of cytogenetic abnormalities in patients with IPSS defined lower-risk myelodysplastic syndrome is associated with poor prognosis and transformation to acute myelogenous leukemia. *Am J Hematol.* v.88, n.10, p.831-837, 2013.

JÄDERSTEN, M., HELLSTRÖM-LINDBERG, E. Myelodysplastic syndromes: biology and treatment. *J Intern Med.* v.265, n.3, p.307-328, 2009.

JÄDERSTEN, M.; HELLSTRÖM-LINDBERG, E. New clues to the molecular pathogenesis of myelodysplastic syndromes. *Exp Cell Res.* v.316, n.8, p.1390-1396, 2010.

JAKAB, Z.; BALOGH, E.; KISS, C.; *et al.* Biclinal chromosomal aberrations in a child with myelodysplastic syndrome. *Cancer Genet Cytogenet.* v.108, p.113-118, 1999.

JEKIC, B.; NOVAKOVIC, I.; LUKOVIC, L.; *et al.* Low frequency of *N-ras* and *K-ras* gene mutation in childhood myelodysplastic syndromes. *Cancer Genet. Cytogenet.* v.154, p.180-182, 2004.

JEKIC, B.; NOVAKOVIC, I.; LUKOVIC, L.; *et al.* Lack of *Tp53* and *FMS* gene mutations in children with myelodysplastic syndrome. *Cancer Genet. Cytogenet.* v.166, p.163-165, 2006.

JIANG, Y.; DUNBAR, A.; LUKASZ, P.; *et al.* Aberrant DNA methylation is a dominant mechanism in MDS progression to AML. *Blood.* v.113, p.1315-1325, 2009.

JOBE, E.M.; MCQUATE, A.L.; ZHAO, X. Crosstalk among Epigenetic Pathways Regulates Neurogenesis. *Front Neurosci.* v.6, n.59, p.1-15, 2012.

KANTHARIDIS, P.; EL-OSTA, A.; DESILVA, M.; *et al.* Altered methylation of the human *MDR1* promoter is associated with acquired multidrug resistance. *Clin Cancer Res.* v.3, n.11, p.2025-2032, 1997.

KARDOS, G.; BAUMANN, I.; PASSMORE, J.; *et al.* Refractory anemia in childhood: a retrospective analysis of 67 patients with particular reference to monosomy 7. *Blood.* v.102, p.1997-2003, 2003.

KHAN, H.; VALE, C.; BHAGAT, T.; *et al.* Role of DNA methylation in the pathogenesis and treatment of myelodysplastic syndromes. *Semin Hematol.* v.50, n.1, p.16-37, 2013.

KLEIHAUER, E. The preleukemic syndromes (hematopoietic dysplasia) in childhood. *Eurpian J Pediatric*.v.133, p.5-10, 1980.

KIKUCHI, A.; HASEGAWA, D.; OHTSUKA, Y.; *et al.* Outcome of children with refractory anaemia with excess of blast (RAEB) and RAEB in transformation (RAEB-T) in the Japanese MDS99 study. *Br J Haematol*. V.158, n.5, p.657-661, 2012.

KIKUKAWA, M.; AOKI, N.; SAKAMOTO, Y.; *et al.* Study of p53 in elderly patients with myelodysplastic syndromes by immunohistochemistry and DNA analysis. *A. J. Pathol*. v.155, p.717-721, 1999.

KIM, M.; OH, B.; KIM, S.Y.; *et al.* p15INK4b methylation correlates with thrombocytopenia, blast percentage, and survival in myelodysplastic syndromes in a dose dependent manner: quantitation using pyrosequencing study. *Leuk Res*. v.34, n.6, p.718-722, 2010.

KIM, M.; KOOK, H.; PARK, H.J.; *et al.* Quantitative comparison of CDKN2B methylation in pediatric and adult myelodysplastic syndromes. *Acta Haematol*.v.130, n.2, p.115-121, 2013.

KINDWALL-KELLER, T.; ISOLA, L.M. The evolution of hematopoietic SCT in myelodysplastic syndrome. *Bone Marrow Transplantation*.v.43, n.8, p.597-609, 2009.

KITA-SASAI, Y.; HORIIKE, S.; MISAWA, S.; *et al.* International prognostic scoring system and TP53 mutations are independent prognostic indicators for patients with myelodysplastic syndrome. *Br J Haematol*. v.115, n.2, p.309-312, 2001.

KRIVTSOV, A.V.; ARMSTRONG, S.A. MLL translocations, histone modifications and leukaemia stem-cell development. *Nat Rev Cancer*. v.7, n.11, p.823-833, 2007.

KRYSINSKA, H.; HOOGENKAMP, M.; INGRAM, R.; *et al.* A two-step, PU.1-dependent mechanism for developmentally regulated chromatin remodeling and transcription of the *c-fms* gene. *Mol Cell Biol*. v.27, n.3, p.878-887, 2007.

KURATA, M.; HASEGAWA, M.; NAKAGAWA, Y.; *et al.* Expression dynamics of drug resistance genes, multidrug resistance 1 (MDR1) and lung resistance protein (LRP) during the evolution of overt leukemia in myelodysplastic syndromes. *Exp Mol Pathol*. v.81, n.3, p.249-254, 2006.

KURZROCK, R.; ALBITAR, M.; CORTES, J.E.; *et al.* Phase II study of R115777, a farnesyl transferase inhibitor, in myelodysplastic syndrome. *J Clin Oncol*. v.22, p.1287-1292, 2004.

KWONG YL. Azathioprine: association with therapy-related myelodysplastic syndrome and acute myeloid leukemia. *J Rheumatol*. v.37, n.3, p.485-490, 2010.

LAI, J-L.; PREUDHOMME, C.; ZANDECKI, M.; *et al.* Myelodysplastic syndromes and acute myeloid leukemia with 17p deletion. An entity characterized by specific dysgranulopoiesis and high incidence of *p53* mutations. *Leukemia*. v.9, n.3, p.370-381, 1995.

LAIRD, P.W.; JAENISCH, R. The role of DNA methylation in cancer genetic and epigenetics. *Annu Rev Genet.* v.30, p.441-464, 1996.

LEES, E. Cyclin dependent kinase regulation. *Curr. Opin. Cell. Biol.* v.7, p.773-780, 1995.

LEHMANN, U.; BRAKENSIEK, K.; KREIPE, H. Role of epigenetic change in hematological malignancies. *Ann Hematol.* v.83, p.137-152, 2004.

LEPELLEY, P.; SOENEN, V.; PREUDHOMME, C.; *et al.* Expression of the multidrug resistance P-glycoprotein and its relationship to hematological characteristics and response to treatment in myelodysplastic syndromes. *Leukemia.*v.8, n.6, p.998-1004, 1994.

LEVINE, S.S.; KING, I.F.; KINGSTON, R.E. Division of labor in polycomb group repression. *Trends Biochem Sci.* v.29, n.9, p.478-485, 2004.

LIM, J.H.; JANG, S.; PARK, C.J.; *et al.* FISH analysis of MLL gene rearrangements: detection of the concurrent loss or gain of the 3' signal and its prognostic significance. *Int J Lab Hematol.* v.25, 2014.

LIN, P.; MEDEIROS, L.J.; YIN, C.C.; *et al.* Translocation (3;8)(q26;q24): a recurrent chromosomal abnormality in myelodysplastic syndrome and acute myeloid leukemia. *Cancer Genet Cytogenet.* v.166, n.1, p.82-85, 2006

LIST, A.F.; SPIER, C.M.; CLINE, A.; *et al.* Expression of the multidrug resistance gene product (P-glycoprotein) in myelodysplasia is associated with a stem cell phenotype. *Br J Haematol.* v.78, n.1, p.28-34, 1991.

LIST, A.F.; VARDIMAN, J.; ISSA, J-PJ.; *et al.* Dewitte TM. Myelodysplastic syndromes. *American Society of Hematology.* p.297-316, 2004.

LIU, Y.C.; ITO, Y.; HSIAO, H.H.; *et al.* Risk factor analysis in myelodysplastic syndrome patients with del(20q): prognosis revisited. *Cancer Genet. Cytogenet.* v.171, p. 9-16, 2006.

LOCATELLI, F.; ZECCA, M.; PESSION, A.; *et al.* Myelodysplastic Syndromes: the pediatric point view. *Haematologica.* v.80, p.268-279, 1995.

LOOK, A.T. Molecular Pathogenesis of MDS. *Amer. Society Hematol.* p.156-160, 2005

LOPES, L.F.; LORAND-METZE, I. Childhood myelodysplastic syndromes in a Brazilian population. *Pediatr Hematol Oncol.* v.16, p.347-353, 1999.

LOPES, L.F.; LORAND-METZE, I.; NIERO-MELO, L.; *et al.* The Brazilian Pediatric Myelodysplastic Cooperative Group strategies: are they relevant to improve educational approach and correct diagnosis? *Leuk Res.* v.26, p.637-642, 2002.

LOPES, L.F.; LATORRE, M.R. Experiences on MDS and JMML from Brazil. In: Lopes LF, Hasle H, editors. Myelodysplastic and myeloproliferative disorders in children. São Paulo: *Lemar and Tecmedd.* p.259-270, 2003.

LOPES, L.F.; LORAND-METZE, I.; MENDES, W.L.; *et al.* Síndrome mielodisplásica na infância. *Rev. Brasil. Hematol. Hemoterap.* v.28, p.226-237, 2006.

LORAND-METZE, I. Síndromes Mielodisplásicas. Conceito e Classificação. Diagnóstico. Evolução e Complicações. *In: Hematologia: Fundamentos e Práticas.* Editora Atheneu. Zago MA, p.519-536, 2005.

LUNA-FINEMAN, S.; SHANNO, K.M.; ATWATER, S.K.; *et al.* Myelodysplastic and myeloproliferative disorders of childhood: a study of 167 patients. *Blood.* v.93, p.459-466, 1999.

LUND, K.; ADAMS, P.D.; COPLAND, M. EZH2 in normal and malignant hematopoiesis. *Leukemia.* v.28, n.1, p.44-49, 2014.

MAKISHIMA, H.; JANKOWSKA, A.M.; TIU, R.V.; *et al.* Novel homo- and hemizygous mutations in EZH2 in myeloid malignancies. *Leukemia.* v.24, n.10, p.1799-1804, 2010.

MALCOVATI, L.; GERMING, U.; KUENDGEN, A.; *et al.* Time-dependent prognostic scoring system for predicting survival and leukemic evolution in myelodysplastic syndromes. *J Clin Oncol.* v.25, p.3503-3510, 2007.

MALCOVATI, L.; NIMER, S.D. Myelodysplastic syndromes: diagnosis and staging. *Cancer Control.* v.15, p.4-13, 2008.

MANDEL, K.; DROR, Y.; POON, A.; *et al.* A practical, comprehensive classification for pediatric myelodysplastic syndromes: the CCC system. *J Pediatr Hematol Oncol.* v.24, p.596-605, 2002.

MARISAVLJEVIC, D.; PANTIC, M.; DJORDJEVIC, V. Only particular cytogenetic events are related to disease progression in sequential cytogenetic studies in myelodysplastic syndromes. *J Buon.* v.18, n.2, p.535-536, 2013.

MARTINEZ-CLIMENT, J.A. Molecular Cytogenetics of Childhood hematological malignancies. *Leukemia.* v.11, p.1999-2021, 1997

MERTENS, F.; JOHANSSON, B.; BILLSTRÖM, R.; *et al.* A case of myelodysplastic syndrome with high platelet counts and a t(3;8)(q26;q24). *Cancer Genet Cytogenet.* v.27, n.1, p.1-4, 1987.

MEYER, C.; KOWARZ, E.; HOFMANN, J.; *et al.* New insights to the MLL recombinome of acute leukemias. *Leukemia.* v.23, p.1490-1499, 2009.

MHAWECH, P.; SALEEM, A. Myelodysplastic syndrome: review of the cytogenetic and molecular data. *Clin. Rev. Oncology Hematol.* v.40, p.229-238, 2001.

MINAMI, R.; MUTA, K.; UMEMURA, T.; *et al.* p16^{INK4A} induces differentiation and apoptosis in erythroid lineage cells. *Exp Hematol.* v.31, p.355-362, 2003.

MORI, N.; MOROSETTI, R.; HOFLEHNER, E.; *et al.* Allelic Loss in the progression of myelodysplastic syndrome. *Cancer Res.* v.60, p.3039-3042, 2000.

MUFTI, G.J.; BENNETT, J.M.; GOASGUEN, J.; *et al.* International Working Group on Morphology of Myelodysplastic Syndrome. Diagnosis and classification of myelodysplastic syndrome: International Working Group on Morphology of myelodysplastic syndrome (IWGM-MDS) consensus proposals for the definition and enumeration of myeloblasts and ring sideroblasts. *Haematologica.* v.93, n.11, p.1712-1717, 2008.

MUSTO, P. Thalidomide therapy for myelodysplastic syndromes: current status and future perspectives. *Leuk Res.* v.28, p.325-332, 2004.

NAKAMAKI, T.; BARTRAM, C.; SERIU, T.; *et al.* Molecular analysis of the cyclin-dependent kinase inhibitor genes, p15, p16, p18 and p19 in the myelodysplastic syndromes. *Leuk Res.* v.21, p.235-240, 1997.

NAKAYAMA, M.; WADA, M.; HARADA, T.; *et al.* Hypomethylation status of CpG sites at the promoter region and overexpression of the human MDR1 gene in acute myeloid leukemias. *Blood.* v.92, n.11, p.4296-4307, 1998.

NARENDRAN, A.; HAWKINS, L.M.; GANJAVI, H.; *et al.* Characterization of bone marrow stromal abnormalities in a patient with constitutional trisomy 8 mosaicism and myelodysplastic syndrome. *Pediatr Hematol Oncol.* v.21, n.3, p.209-221, 2004.

NIEMEYER, C.M.; KRATZ, C.P. Paediatric myelodysplastic syndromes and juvenile myelomonocytic leukemia: molecular classification and treatment options. *British Journal of Haematology.* v.140, p.610-624, 2008.

NIIMI, H.; HARADA, L.H.; HARADA, Y.; *et al.* Hyperactivation of the RAS signaling pathway in myelodysplastic syndrome with AML1/RUNX1 point mutations. *Leukemia.* v.20, p.35-44, 2006.

NISHINO, H.T.; CHANG, C-C. Myelodysplastic Syndromes: Clinicopathologic features, pathobiology, and molecular pathogenesis. *Arch Pathol Lab Med.* v.129, p.1299-1310, 2005.

NISSE, C.; HAGUENOER, J.M.; GRANDBASTIEN, B.; *et al.* Occupational and environmental risk factors of the myelodysplastic syndromes in the North of France. *Br J Haematol.* v.112, p. 927-935, 2001.

NIKOLOSKI, G.; LANGEMEIJER, S.M.; KUIPER, R.P.; *et al.* Somatic mutations of the histone methyltransferase gene EZH2 in myelodysplastic syndromes. *Nat Genet.* v.42, n.8, p.665-667, 2010.

NÖSSLINGER, T.; REISNER, R.; KOLLER, E.; *et al.* Myelodysplastic syndromes, from French-American-British to World Health Organization: comparison of classifications on 431 unselected patients from a single institution. *Blood.* v.98, p.2935-2941, 2001.

OGATA, K. Myelodysplastic Syndromes: Recent progress in diagnosis and understanding of their pathophysiology. *J. Nippon Med Sch.* v.73, p.300-307, 2006.

- OLNEY, H.J.; LE BEAU, M.M. Evaluation of recurring cytogenetic abnormalities in the treatment of myelodysplastic syndromes. *Leuk Res.* v.31, n.4, p.427-434, 2007.
- OLNEY, H.J.; LE BEAU, M.M. The cytogenetics of myelodysplastic syndromes. *Best Pract Res Clin Haematol.* v.14, n.3, p.479-495, 2001.
- PANANI, A.D.; ROUSSOS, C. Cytogenetic aspects of adult primary myelodysplastic syndromes: Clinical implications. *Cancer Letters.* v.235, p.177–190, 2005.
- PARDANANI, A.; TEFFERI, A. Cytogenetic risk stratification in myelodysplastic syndromes: are we there yet? *J Clin Oncol.* v.30, n.21, p.2703-2704, 2012.
- PARK, M.J.; KIM, H.J.; KIM, S.H.; *et al.* Is International Prognostic Scoring System (IPSS) still standard in predicting prognosis in patients with myelodysplastic syndrome? External validation of the WHO Classification-Based Prognostic Scoring System (WPSS) and comparison with IPSS. *Eur J Haematol* v. 81, p.364-373, 2008.
- PASSMORE, S.J.; HANN, I.M.; STILLER, C.A.; *et al.* Paediatric myelodysplastic: a study of 68 children and a new prognostic scoring system. *Blood.* v.85, p.1742-1750, 1995.
- PASSMORE, S.J.; CHEESSELLS, J.M.; KEMPSKI, H.; *et al.* Paediatric myelodysplastic syndromes and juvenila myelomonocytic leukemia in UK: a population-based study of incidence and survival. *Br J Haematol.* v.21, p.758-767, 2003.
- PERRY, M.E.; LEVINE, A.J. Tumor-suppressor p53 and the cell cycle. *Curr Opin Genet Dev.* v. 3, p50-54, 1993.
- PITMAN, S.D.; VICTORIO, A.; ROWSELL, E.; *et al.* 5q- Syndrome in a child with slowly progressive pancytopenia. A case report and review of the literature. *J Pediatr Hematol Oncol.* v.28, p.115-119, 2006.
- POLYCHRONOPOULOU, S.; PANAGIOTOU, J.P.; KOSSIVA, L.; *et al.* Clinical and morphological features of paediatric myelodysplastic syndromes: a review of 34 cases. *Acta Paediatric.* v.93, p.1015-1023, 2004.
- PUI, C.H. CHILDHOOD LEUKEMIAS. *N Engl J Med.* v.332, n.24, p.1618-1630, 1995.
- QU, S.; XU, Z.; ZHANG, Y.; *et al.* Impacts of cytogenetic categories in the Revised International Prognostic Scoring System on the prognosis of primary myelodysplastic syndromes: results of a single-center study. *Leuk Lymphoma.* v.53, n.5, p.940-946, 2012.
- QUESNEL, B.; GUILLERM, G.; VEREECQUE, R.; *et al.* Methylation of the p15^{INK4} gene in myelodysplastic syndromes is frequent and acquired during disease progression. *Blood.* v.8, p.2985-2990, 1998.
- RAU, A.T.; SHREEDHARA, A.K.; KUMAR, S. Myelodysplastic syndromes in children: where are we today? *Ochsner J.* v.12, p.216-220, 2012.
- RAKYAN, V.K.; PREIS, J.; MORGAN, H.D.; *et al.* The marks, mechanisms and memory of epigenetics states in mammalian. *Biochem J.* v.356, p.1-10, 2001.

REIS-ALVES, S.C.; TRAINA, F.; HARADA, G.; *et al.* Immunophenotyping in myelodysplastic syndromes can add prognostic information to well-established and new clinical scores. *PLoS One*. v.8, n.12, p.e81048, 2013.

RODRIGUES, E.F.; DE SOUZA, D.C.; CAMARGO, A.; *et al.* Cytogenetic biclonality in a child with hypocellular primary myelodysplastic syndrome. *Cancer Genet Cytogenet*. v.178, n.1, p.70-72, 2007.

RODRIGUES, E.F.; SANTOS-REBOUÇAS, C.B.; Gonçalves Pimentel, M.M.; *et al.* Epigenetic alterations of p15(INK4B) and p16(INK4A) genes in pediatric primary myelodysplastic syndrome. *Leuk Lymphoma*. v.51, n.10, p.1887-1894, 2010.

ROSENFELD, C.; LIST, A. A hypothesis for the pathogenesis of myelodysplastic syndromes: implications for new therapies. *Leukemia*.v.14, n.1, p.2-8, 2000.

ROYER-POKORA, B.; TROST, D.; MÜLLER, N.; *et al.* Delineation by molecular cytogenetics of 5q deletion breakpoints in myelodysplastic syndromes and acute myeloid leukemia. *Cancer Genet Cytogenet*. v.167, n.1, p.66-69, 2006.

SAITO, S.; MATSUDA, K.; TAIRA, C.; *et al.* Genetic analysis of TP53 in childhood myelodysplastic syndrome and juvenile myelomonocytic leukemia. *Leuk Res*.v.35, n.12, p.1578-1584, 2011.

SANTINI, V.; MELNICK, A.; MACIEJEWSKI, J.P.; *et al.* Epigenetics in focus: pathogenesis of myelodysplastic syndromes and the role of hypomethylating agents. *Crit Rev Oncol Hematol*. v.88, n.2, p.231-245, 2013.

SASAKI, H.; MANABE, A.; KOJIMA, S.; *et al.* Myelodysplastic syndrome in childhood: a retrospective study of 189 patients in Japan. *Leukemia*. v.15, p.1713-1720, 2001.

SASHIDA, G.; IWAMA, A. Epigenetic regulation of hematopoiesis. *Int J Hematol*.v.96, n.4, p.405-412, 2012.

SAUMELL, S.; FLORENSA, L.; LUÑO, E.; *et al.* Prognostic value of trisomy 8 as a single anomaly and the influence of additional cytogenetic aberrations in primary myelodysplastic syndromes. *Br J Haematol*.v.159, n.3, p.311-321, 2012.

SCOOT, B.L.; RAMAKRISHNAN, A.; STORER, B.; *et al.* Prolonged responses in patients with MDS and CMML treated with azacitidine and etanercept. *Br J Haematol*. v.148, p.944-947, 2010.

SEYMOUR, J.F.; FENAUX, P.; SILVERMAN, L.R.; *et al.* Effects of azacitidine compared with conventional care regimens in elderly (≥ 75 years) patients with higher-risk myelodysplastic syndromes. *Crit Rev Oncol Hematol*. v.76, n.3, p.218-227, 2010.

SEABRIGHT, M. A rapid banding technique for human chromosomes. *Lancet*. v.2, p.971-972, 1971.

SHAFFER, L.G.; MCGOWAN-JORDAN, J.; SCHMID, M.; *et al.* *ISCN: An International System for Human Cytogenetic Nomenclature* (2013). 2013.

SHAPIRO, J.R.; PU, P.Y.; MOHAMED, A.N.; *et al.* Chromosome number and carmustine sensitivity in human gliomas. *Cancer*. 1993 Jun 15;71(12):4007-21.

SHARMA, G.; MIRZA, S.; PARSHAD, R.; *et al.* CpG hypomethylation of MDR1 gene in tumor and serum of invasive ductal breast carcinoma patients. *Clin Biochem*. v.43, n.4-5, p.373-379, 2010.

SHI, C.J.; WANG, F.; REN, M.F.; *et al.* Up-regulation of ABCB1/P-glycoprotein by escaping promoter hypermethylation indicates poor prognosis in hematologic malignancy patients with and without bone marrow transplantation. *Leuk Res*. v.35, n.1, p.73-79, 2011.

SHIH, A.H.; ABDEL-WAHAB, O.; PATEL, J.P.; *et al.* The role of mutations in epigenetic regulators in myeloid malignancies. *Nat Rev Cancer*. v.12, n.9, p.599-612, 2012.

SHIMIZU R, YAMAMOTO M. Contribution of GATA1 dysfunction to multi-step leukemogenesis. *Cancer Sci*. v.103, n.12, p.2039-2044, 2012.

SILVEIRA, C.G.; OLIVEIRA, F.M.; VALERA, E.T.; *et al.* New recurrent deletions in the PPARgamma and TP53 genes are associated with childhood myelodysplastic syndrome. *Leuk Res*. v.33, n.1, p.19-27, 2009.

SILVERMAN, L.R.; MUFTI, G. Methylation inhibitor therapy in the treatment of myelodysplastic syndrome. *Nat Clin Pract Oncol*. v.2, p.12-23, 2005.

SMITH, A.R.; CHRISTIANSEN, E.C.; WAGNER, J.E.; *et al.* Early hematopoietic stem cell transplant is associated with favorable outcomes in children with MDS. *Pediatr Blood Cancer*. v.60, n.4, p.705-710, 2013.

SOLE, F.; ESPINET, B.; SANZ, G.F.; *et al.* Incidence, characterization and prognostic significance of chromosomal abnormalities in 640 patients with primary myelodysplastic syndromes. Grupo Cooperativo Espanol de Citogenetica Hematologica. *Br J Haematol*. v.108, p.346-356, 2000.

SOLÉ, F.; LUÑO, E.; SANZO, C.; *et al.* Identification of novel cytogenetic markers with prognostic significance in a series of 968 patients with primary myelodysplastic syndromes. *Haematologica*. v.90, n.9, p.1168-1178, 2005.

STEENSMA, D.P.; TEFFERI, A. The myelodysplastic syndrome(s): a perspective and highlighting current controversies. *Leuk Res*.v.27, p.95-120, 2003.

STEENSMA, D.P.; BAER, M.R.; SLACK, J.L.; *et al.* Multicenter study of decitabine administered daily for 5 days every 4 weeks to adults with myelodysplastic syndromes: the alternative dosing for outpatient treatment (ADOPT) trial. *J Clin Oncol*. v.27, n.23, p.3842-3848, 2009.

STREFFORD, J.C.; WORLEY, H.; BARBER, K.; *et al.* Genome complexity in acute lymphoblastic leukemia is revealed by array-based comparative genomic hybridization. *Oncogene*. v.26, n.29, p.4306-4318, 2007.

SWERTS, K.; DE MOERLOOSE, B.; DHOOGHE, C.; *et al.* Prognostic significance of multidrug resistance-related proteins in childhood acute lymphoblastic leukaemia. *Eur J Cancer*. v.42, n.3, p.295-309, 2006.

SYED, Y.Y.; SCOTT, L.J. Lenalidomide: a review of its use in patients with transfusion-dependent anaemia due to low- or intermediate-1-risk myelodysplastic syndrome associated with 5q chromosome deletion. *Drugs*. v.73, n.11, p.1183-1196, 2013.

TAKIHARA, Y. Role of Polycomb-group gene in sustains activities of normal and malignant stem cells. *Int J Hematol*. v.87, p.25-34, 2008.

TAUB, J.W.; GE, Y. Down syndrome, drug metabolism and chromosome 21. *Pediatr Blood Cancer*. v.44, n.1, p.33-39, 2005.

TEOFILI, L.; MARTINI, M.; DI MARIO, A.; *et al.* Expression of p15^{INK4b} gene during megakaryocytic differentiation of normal and myelodysplastic hemetopoietic progenitors. *Blood*. v.98, p.495-497, 2001.

TESTA, J.R.; MISAWA, S.; OGUMA, N.; *et al.* Chromosomal alterations in acute leukemia patients studied with improved culture methods. *Cancer Res*. v.45, p.430-434, 1985.

TIEN, H-F.; TANG, J-L.; TSAY, W.; *et al.* Methylation of the p15^{INK4B} gene in myelodysplastic syndrome: it can be detected early or during disease progression and is highly associated with leukaemic transformation. *Brit. J. Haematol*. v.112, p.148-154, 2001.

TIU, R.V.; VISCONTE, V.; TRAINA, F.; *et al.* Updates in cytogenetics and molecular markers in MDS. *Curr Hematol Malig Rep*. v.6, n2, p.126-135, 2011.

TOMONAGA, M.; NAGAI, K. Hypocellular Myelodysplastic Syndromes and Hypocellular Acute Myeloid Leukemia: Relationship to Aplastic Anemia. *In: The Myelodysplastic Syndromes: Pathobiol. Clin Management ed. John M Bennett*. p.121-138, 2002.

TOYOTA, M.; KOPECKY, K.J.; Toyota, M-O.; *et al.* Methylation profiling in acute myeloid leukemia. *Blood*. v. 97, p.2823-2829, 2001.

TRIPPUTI, P.; BIANCHI, P.; FERMO, E.; *et al.* Chromosome 7q31.1 deletion in myeloid neoplasms. *Hum Pathol*. v.45, n.2, p.368-371, 2014.

TSANG, D.P.; CHENG, A.S. Epigenetic regulation of signaling pathways in cancer: role of the histone methyltransferase EZH2. *J Gastroenterol Hepatol*. v.26, n.1, p.19-27, 2011.

UCHIDA, T.; KINOSHITA, T.; NAGAI, H.; *et al.* Hypermethylation of the p15INK4B gene in myelodysplastic syndromes. *Blood*. p.1403-1409, 1997.

VALLESPI, T.; IMBERT, M.; MECUCCI, C.; *et al.* Diagnosis, classification, and cytogenetics of myelodysplastic syndromes. *Haematologica*. v.83, p.258-275, 1998.

VAN DEN BERGHE, H.; CASSIMAN, J.J.; DAVID, G.; *et al.* Distinct haematological disorder with deletion of long arm of no. 5 chromosome. *Nature*. v.251, n.5474, p. 437-438, 1974.

- VARAMBALLY, S.; DHANASEKARAN, S.M.; ZHOU, M.; *et al.* The polycomb group protein EZH2 is involved in progression of prostate cancer. *Nature*. v.419, n.6907, p.624-629, 2002.
- VARDIMAN, J.W.; HARRIS, N.L.; BRUNNING, R.D. The World Health Organization (WHO) classification of the myeloid neoplasms. *Blood*. v.100, n.7, p.2292-2302, 2002.
- VARMA, N.; VARMA S. Proliferative indices, cytogenetics, immunophenotype and other prognostic parameters in myelodysplastic syndromes. *Indian J Pathol Microbiol*. v.11, p.97-101, 2009.
- VIDAL, O.D.; PAIXÃO, V.A.; BRAIT, M.; *et al.* Aberrant methylation in pediatric myelodysplastic syndrome. *Leuk Res*. v.31, n.2, p.175-181, 2007.
- VYAS, P.; AULT, K.; JACKSON, C.W.; *et al.* Consequences of GATA-1 deficiency in megakaryocytes and platelets. *Blood*. v.93, n.9, p.2867-2875, 1999.
- WADE, P.A. Methyl CpG binding proteins: coupling chromatin architecture to gene regulation. *Oncogene*. v.20, p.3166-3173, 2001.
- WALTER, M.J.; SHEN, D.; DING, L.; *et al.* Clonal architecture of secondary acute myeloid leukemia. *N Engl J Med*. v.366, n.12, p.1090-1098, 2012.
- WANG, C-G.; YE, Y-J.; YUAN, J.; *et al.* EZH2 and STAT6 expression profiles are correlated with colorectal cancer stage and prognosis. *Wourld Journal of gastroenterology*. v.16, p.2421-2427, 2010.
- WEBB, D.K.H.; PASSMORE, S.J.; HANN, I.M.; *et al.* Results of treatment of children with refractory anaemia with excess blasts (RAEB) and RAEB in transformation (RABE-t) in Great Britain 1990-99. *Br J Haematol*. v.117, p.33-39, 2002.
- WESTERS, T.M.; IRELAND, R.; KERN, W.; *et al.* Standardization of flow cytometry in myelodysplastic syndromes: a report from an international consortium and the European LeukemiaNet Working Group. *Leukemia*. v.26, n.7, p.1730-1741, 2012.
- WONG, K.F.; SO, C.C. Hypoplastic Myelodysplastic Syndrome – a Clinical, Morphologic, or Genetic Diagnosis? *Cancer Genet Cytogenet*. v.138, p.85-88, 2002.
- WONG, R.; SHAHJAHAN, M.; WANG, X.; *et al.* Prognostic factors for outcomes of patients with refractory or relapsed acute myelogenous leukemia or myelodysplastic syndromes undergoing allogeneic progenitor cell transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant*. v.11, p.108-114, 2005.
- WOODS, W.G.; BARNARD, D.R.; ALONZO, T.A.; *et al.* Prospective study of 90 children requiring treatment for juvenile myelomonocytic leukemia or myelodysplastic syndrome: a report from the children's cancer group. *J Clin Oncol*. v.20, p.434-440, 2002.
- WORM, J.; GULDBERG, P. DNA methylation: an epigenetic pathway to cancer and a promising target for anticancer therapy. *J Oral Pathol Med*. v.31, p.443-449, 2002.

YUSUF, U.; FRANGOUL, H.A.; GOOLEY, T.A.; *et al.* Allogeneic bone marrow transplantation in children with myelodysplastic syndrome or juvenile myelomonocytic leukemia: the Seattle experience. *Bone Marrow Transplant.* v.33, p.805-814, 2004.

YOUNG, N.S.; CALADO, R.T.; SCHEINBERG, P. Current concepts in the pathophysiology and treatment of aplastic anemia. *Blood.* v.108, n.8, p.2509-2519, 2006.

XAVIER, A.C.; EDWARDS, H.; DOMBKOWSKI, A.A.; *et al.* A unique role of GATA1s in Down syndrome acute megakaryocytic leukemia biology and therapy. *PLoS One.* v.6, n.11, p.e27486, 2011.

XU, F.; LI, X.; WU, L.; *et al.* Overexpression of the EZH2, RING1 and BMI1 genes is common in myelodysplastic syndromes: relation to adverse epigenetic alteration and poor prognostic scoring. *Ann. Hematol.* v.90, n.6, p.643:653, 2011.

XU, X.; SU, M.; LEVY, N.B.; *et al.* Myeloid neoplasm with t(3;8)(q26;q24): report of six cases and review of the literature. *Leuk Lymphoma.* v.24; 2014.

ZHOU, X.; SUN, H.; ELLEN, T.P.; *et al.* Arsenite alters global histone H3 methylation. *Carcinogenesis.* v.29, n.9, p.1831-1836, 2008.

ZÖCHBAUER, S.; GSUR, A.; GÖTZL, M.; *et al.* MDR1 gene expression in myelodysplastic syndrome and in acute myeloid leukemia evolving from myelodysplastic syndrome. *Anticancer Res.* v.14, p.1293-1295, 1994.

ZOLLINO, M.; GENUARDI, M.; BAJER, J.; *et al.* Constitutional trisomy 8 and myelodysplasia: report of a case and review of the literature. *Leuk Res.* v.19, n.10, p.733-736, 1995.

APÊNDICE A - Tabela 1: Análise Citogenética em Síndrome Mielodisplásica Primária na Infância

n°	Idade/ Sexo	Classificação	Resultado citogenético	Evolução/ Tratamento	IPSS
1	12a/ M	CR	46,XY,-7,+20[13]/46,XY[7]	não/ TCTH	int 2
2	7a/ M	CR	46,XY,del(12)(p12)[6]/46,XY[37]	não/ TCTH	int 1
3	8a/ F	CR	46,XX[30]	não/ TCTH	int 1
4	18a/ F	CR	46,XX,del(6)(q21)[3]/46,XX[35]	sim- AREB/ TCTH/ óbito	int 1
5	7a/ M	CR	46,XY[32]	não/ transfusão	int 1
6	15a/ F	CR	46,XX[36]	não/ transfusão	int 1
7	16a/ F	CR	47,XX,+mar[2]/46,XX[27]	não/ TCTH/ óbito	int 1
8	7a/ F	CR	46,XX[30]	não/ transfusão	int 1
9	6a/ F	CR	46,XX[32]	não/ transfusão	int 1
10	14a/ M	CR	46,XY,del(17p12)[15]/46,XY[28]	TCTH/ não	int 1
11	8 a/ F	CR	46,XX,del(9)(p12)[3]/46,XX[19]	não/ TCTCU óbito	int 1
12	13a/ M	CR	46,XY,del(17)(p12)[9]/46,XY,del(17)(p12), del(12)(p13)[5]/46,XY,del(11)(q23)[3]/46,XY[34]	não/ TCTCU	int 1
13	9a/ M	CR	46,XY,del(3)(p23)[5]/46,XY[38]	sim - AREB/ Fator de Cresc. (EPO)	int 1
14	1a/ M	CR	46,XY[32]	não/ transfusão	int 1
15	3a/ M	CR	46,XY,+der(3)del(3)(q21),-7,-9,+mar[2]/ 46,XY[27]	sim -AREB/ QT	int 2
16	13a/ F	CR	46,XX,del(5)(q14q31)[15]/ 46,XX[28]	não/ TCTH	int 1
17	14a/ M	CR	46,XY,del(11)(q23)[5]/ 46,XY[17]	não/ transfusão	int 1
18	7a/ F	CR	46,XX,del(12)(p13)[10]/46,XX[28]	não/ TCTH/ óbito	int 1
19	2a/ M	CR	45,XY,-19[4]/46,XY[25]	não/ transfusão	int 2
20	15a/ F	CR	46,XX[22]	não/ transfusão	int 1
21	7a/ F	CR	46,XX[25]	não/ transfusão/ óbito	int 1
22	2a/F	CR	46,XX,del(4)(q22)[6]/46,XX[28]	sim- AREB/ transfusão	int 1
23	4a/ M	CR	47,XY,+mar[4]/ 46,XY[49]	não/ acomp. clínico	int 1
24	2a/ M	CR	46,XY[30]	sim- AREB-t/ fator de cresc. (GCSF)	baixo risco
24a	3a/ M	AREB-t	46,XY[20]		

25	7m/ M	CR	46,XY[34]	não/ fator de cresc. (GCSF)	int 1
25a	2a/ M	CR	46,XY,del(17)(p12)[4]/46,XY[36]	não/ transfusão	int 1
26	2a/ F	CR	46,XX,del(17)(p12)[5]/46,XX[45]	Não	int 1
27	5a/ F	CR	46,XX[16]	não/ transfusão	int 1
28	12a/ F	CR	46,XX[32]	não/ transfusão	int 1
29	2a/ F	CR	46,XX[25]	não/ transfusão	int 1
30	18a/ M	CR	46,XY[46]	não/ acomp. clínico	int 1
31	11a/ M	CR	46,XY,del(11)(q23)[8]/46,XY[20]	sim-AREB	int 2
32	4a/ M	CR	46,XY,del(11)(q23)[5]/46,XY[31]	sim- LMA/ TCTH	int1
33	7a/ M	CR	45,XY,-21[5]/46,XY[42]	não/ acomp. clínico	int 1
34	6a/ M	CR	46,XY[38]	não/ transfusão/ óbito	int 1
35	2a/ F	CR	46,XX,del(11)(q23)[3]/46,XX[12]	sim- AREB/ transfusão	int 2
36	9m/ F	CR	46,XX[33]	não/ acomp. clínico	int 1
37	9a/ F	CR	46,XX[22]	não/ acomp. clínico	int 1
38	7m/ M	CR	46,XY[32]	não/ transfusão	baixo risco
39	11a/ F	CR	46,XX,i(9)(q10)[14]/46,XX[6]	não/ acomp. clínico	int 1
40	11m/ M	CR	46,XY[42]	não/ acomp. clínico	int 1
41	1a/ M	CR	46,XY[30]	não/ acomp. clínico	baixo risco
42	4a/ F	CR	46,XX,del(9)(q22q32)[2]/46,XX[22]	não/ QT	int 2
43	3a/ M	CR	46,XY[29]	não/ acomp. clínico	int 1
44	17a/ F	CR	46, XX [12]	não/ acomp. clínico/ óbito	int 1
45	13a/ M	CR	46,XY[28]	não/ TCTH	int 1
46	2a/ M	CR	46,XY[26]	não/ fator de cresc. (GCSF)	baixo risco
47	5m/ F	CR	46,XX[38]	não	baixo risco
47a	3a/ F	CR	46,XX,del(17)(p12)[5]/46,XX[33]	TCTH	
48	9a/ F	CR	46,XX[30]	não/ acomp. clínico	baixo risco
49	4a/ F	CR	46,XX,t(3;8)(p25;q12)c[26]	não/ acomp. clínico	int 1
50	8a/ M	CR	46,XY[31]	não/ acomp. clínico	baixo risco
51	3m/ F	CR	45,XX,-7[24]/46,XX[2]	não/ acomp. clínico	int 1
52	9a/ M	CR	46,XY[43]	sim - LLA/ QT	int 1
52a	9a/ M	LLA	49,XY,+12,+16,+22[3]/51,XY,del(6)(q14),+12,+16,+20,+21,+22[3]/52,XY,+5,del(6)(q14),	óbito	

			+12,+16,+20,+21,+22[2]/51,XY,+12,+16,+18,+21,+22[2]/46,XY[14]		
53	16a/ M	CR	46,XY[27]	não/ acomp. clínico	int 1
54	2a/ F	CR	46,XX[35]	sim-AREB/ acomp. clínico	int 1
54a	4a/ F	AREB	47,XX,+14[4]/46,XX[31]		
55	13a/ M	CR	47,XY,+Y[12]/46,XY[8]	não/ acomp. clínico	baixo risco
56	14a/ M	CR	46,XY[30]	transusão	int 1
57	5a/ M	CR	47,XY,+mar[3]/46,XY[37]	não/TCTH /óbito	int 1
58	17a/ M	CR	46,XY[28]	não/ acomp. clínico	int 1
59	11a/ M	CR	46,XY[30]	não/ acomp. clínico	int 1
60	11a/ F	CR	46,XX[30]	não/ acomp. clínico	baixo risco
61	11a/ M	CR	46,XY[20]	não/ acomp. clínico	baixo risco
62	7a/ M	CR	46,XY,del(11)(q23)[4]/46,XY[48]	não/ TCTH /óbito	int 1
63	9a/ F	CR	46,XX[20]	TCTH /óbito	int 1
64	16a/ F	CR	51,XX,+4,+6,+8,+14,+20[3]/46,XX[41]	não/ TCTH	int 1
65	14a/ M	CR	46,XY,del(17)(p12)[15]/46,XY[28]	não/ TCTH	int 1
66	12a/ M	CR	46,XY[25]	não/ TCTH	int 1
67	11a/ F	CR	46,XX[20]	não/ TCTH	int 1
68	5a/ M	CR	46,XY[20]	não/ TCTH	int 1
69	12a/ F	CR	46,XX[49]	não/ TCTH	int 1
70	17a/ F	CR	46,XX[29]	TCTH/ óbito	int 1
71	7a/ M	CR	46,XY[20]	TCTH/ óbito	int 1
72	15a/ M	CR	46,XY[25]	TCTH/ óbito	int 1
73	16a/ M	CR	46,XY[29]	TCTH/ óbito	int 1
74	18a/ M	CR	46,XY,ctb[6]/46,XY[20]	não/ TCTH	int 1
75	9a/ M	CR	46,XY,del(17)(p12)[5]/46,XY[16]	TCTH/ óbito	int 1
76	10a/ F	CR	46,XX,ctb[8]/46,XX[30]	não/ TCTH	int 1
77	10a/ M	CR	45,XY,-7[26]	sim- AREB-t	int 2
77a	10a/ M	AREB-t	45,XY,-7[20]	sim- LMA/ QT/ óbito	alto risco
78	13a/M	CR	45,XY,-7[25]	sim- AREB/ QT	int 1
78a	14a/M	AREB	45,XY,-7[20]		
79	2a/ F	AREB	46,XX,del(11)(q23)[8]/46,XX[14]	sim- AREB/ TCTH	int 2

80	10a/ F	AREB	46,XX,del(6)(q24)[3]/46,XX[15]	sim-LMA/ QT/ óbito	int 2
81	7 a/F	AREB	46,XX,del(6)(q23)[8]/46,XX[18]	Óbito	int 2
82	2a/F	AREB	46,XX,del(11)(q23)[5]/46,XX[18]	sim- LMA/ TCTH	int 2
83	16a/ M	AREB	47,XY,+8[30]/46,XY[25]	sim- LMA/ QT/ óbito	int 2
84	7a/ F	AREB	46,XX,i(9)(q10)[15]/46,XX[7]	sim- LMA/ TCTH/ óbito	int 2
85	14a/ F	AREB	46,XX,del(11)(q23)[4]/46,XX[23]	sim- LMA/ TCTH/ óbito	int 2
86	13a/ F	AREB	46,XX,del(7)(q22)[10]/46,XX[12]	não/ TCTH	alto risco
87	12a/ M	AREB	46,XY,del(11)(q23)[12]/46,XY[8]	sim- LMA/ QT	int 2
88	6a/ F	AREB	58,XX,+X,+3,+5,+6,+8,+10,+11,+12,+13,+18,+20,+21[5]/58,XX,idem.dup(1)(q21q31)[14]/46,XX[21]	sim- LMA/ QT	alto risco
89	14a/ M	AREB	46,XY,del(7)(q22)[10]/46,XY,del(7)(q22),del(12)(p12)[3]/46,XY[7]	sim- LMA/ QT	alto risco
90	9a/ F	AREB	47,XX,+6[26]/46,XX[16]	não/ transfusão/ óbito	int 2
91	9m/ M	AREB	46,XY,del(6)(q23)[5]/46,XY[15]	não/ óbito	int 2
92	2a/ M	AREB	46,XY[34]	não/ acomp. clínico	int 1
93	4a/ M	AREB	46,XY[30]	não/ acomp. clínico	int 1
94	2a/ M	AREB	46,XY[33]	sim- LMA/ QT/ óbito	int 1
95	3m/ M	AREB	46,XX[30]	não/ transfusão	alto risco
96	4a/ M	AREB	46,XY,del(11)(q23)[6]/46,XY[16]	não/ TCTH	int 1
97	11a/ M	AREB	46,XY,del(11)(q23)[4]/46,XY[20]	TCTH/ óbito	int 2
98	15a/ M	AREB	46,XY[25]	TCTH	int 1
99	18a/ F	AREB	46,XX,del(12)(p12)[12]/46,XX[13]	óbito/ TCTH	int2
100	8a/ F	AREB	46,XX,del(7)(q22)[7]/46,XX[9]	não/ transfusão	int 2
101	21m/M	AREB-t	45,XY,-7[14]/46,XY[8]	sim- LMA/ QT/ óbito	alto risco
102	12a/ M	AREB-t	45,XY,-7[18]/46,XY[2]	sim- LMA/ TCTH/ óbito	alto risco
103	5a/ M	AREB-t	46,XY,t(5;8)(q32,q22)[23]/46,XY[8]	sim- LMA/ QT/ óbito	alto risco
104	22m/ M	AREB-t	45,XY,-7[14]/46,XY[6]	sim- LMA/ QT/ óbito	alto risco
105	2a/ F	AREB-t	46,XX,t(4;7)(p16,p15)[6]/46,XX[23]	sim- LMA/ QT/ óbito	alto risco
106	4a/ F	AREB-t	49,XX, dup(1)(q12),+6,+8,+mar[4]/46,XX[16]	sim- LMA/ QT/ óbito	alto risco
107	1a/ M	AREB-t	46,XY,add(9)(q34)[5]/46,XY,inv(1)(q21),add(9)(q34)[4]/46,XY [42]	sim- LMA/ QT/ óbito	alto risco
108	12a/ M	AREB-t	45,XY,-7[24]/46,XY[3]	sim- LMA/ QT óbito	alto risco
109	13a/ F	AREB-t	47,XX,+21[6]/48,XX,+21,+mar[4]/46,XX[10]	sim- LMA/ TCTH	alto risco

110	15a/ M	AREB-t	45,XY,-7[10]/46,XY[16]	sim- LMA/óbito	alto risco
111	1a/ M	AREB-t	47,XY,+8,del(11)(q23)[9]/46,XY[13]	sim- LMA/óbito	alto risco
112	17a/ F	AREB-t	46,XX,del(12)(p12)[14]/46,XX[11]	sim-LMA/ TCTH	alto Risco
113	13a/ M	AREB-t	45,XY,-7[12]/46,XY[8]	sim- LMA/óbito	alto risco
114	12a/ M	AREB-t	45,XY,-7[18]/46,XY[4]	sim- LMA/ TCTH	alto risco
115	17a/ M	AREB-t	47,XY,+8[22]/46,XY[4]	sim- LMA/ TCTH/ óbito	alto risco
1	1a/ M	SD/SMD- CR	47,XY, add(7)(p?),add(15)(q?)+21c[14]/47,XY,+21c[14] Down	sim – LMA	alto risco
1 ^a	1a/ M	LMA	47,XY,t(3;5)(q21;q32), add(7)(p?),add(15)(q?)+21c[14]/ 47,XY,add(7)(p?),add(15)(q?)+21c[5]/47,XY,+21c[1]	QT/ óbito	
2	1a/ M	SD/SMD- AREB	47,XX,+21c[25] Down	sim- LMA	int 1
2a	1a/ M	SD/SMD- AREB	47,XX,der(17)t(1;17)(q32;p13),+21c[15]/ 46,XX,+21c[6]	QT/ óbito	
3	12a/ M	SD/SMD- AREB-t	58,XY,+8,+13,+13,+14,+15,+20,+21,+21c/ 47,XY,+21c[12] Down	sim-LMA/ QT /óbito	alto risco

Legenda: **CR** - citopenia refratária; **AREB** - anemia refratária com excesso de blastos; **AREB-t** - anemia refratária com excesso de blastos em transformação; **LMMJ**- leucemia mielomonocítica juvenil; **LMA**- leucemia mielóide aguda; **a** - ano(s), **m**- meses, **F**- feminino, **M**- masculino, **TCTH**- transplante de célula tronco hematopoético, **TCTCU**- transplante de células tronco de cordão umbilical, **QT**- quimioterapia; **GM-CSF** - fator de estimulação de colônias granulócito-macrófago, **Epo**- eritropoetina; **int-1**- intermediário 1; **int-2**- intermediário 2.

APÊNDICE B – Cytogenetic biclonality in a child with hypocellular primary myelodysplastic syndrome (Artigo publicado).



Cancer Genetics and Cytogenetics 178 (2007) 70–72

CANCER GENETICS
AND
CYTOGENETICS

Short communication

Cytogenetic biclonality in a child with hypocellular primary myelodysplastic syndrome

Eliane Ferreira Rodrigues^a, Daiane Corrêa de Souza^{a,b}, Adriana Camargo^{b,c},
Rita de Cássia Tavares^a, Luiz Fernando Bouzas^a, Maria Helena Ornellas^{a,b},
Teresa de Souza Fernandez^{a,b,*}

^aCytogenetic Laboratory, Bone Marrow Transplant Center, National Cancer Institute (INCA), Praça Cruz Vermelha, 6^o andar, CEP 20230-130, Rio de Janeiro, RJ, Brazil

^bFaculty of Medical Sciences, State University of Rio de Janeiro (UERJ), Rio de Janeiro, Brazil

^cArthur Siqueira Cavalcanti Hematology Institute, Rio de Janeiro, Brazil

Received 12 February 2007; received in revised form 21 May 2007; accepted 31 May 2007

Abstract

A 13-year-old boy with hypocellular primary myelodysplastic syndrome, classified as refractory cytopenia, underwent umbilical cord blood transplantation. Cytogenetic analysis revealed two rare biclonal chromosomal aberrations, del(17)(p12) and del(11)(q23). Cytogenetic analysis was a valuable tool in diagnosis, in clinical decision-making, and in treatment and follow-up. To our knowledge, this is the first reported case of cytogenetic biclonality involving chromosomes 17 and 11. © 2007 Elsevier Inc. All rights reserved.

1. Introduction

Myelodysplastic syndromes (MDS) comprise a heterogeneous group of clonal bone marrow disorders characterized by varying degrees of pancytopenia and morphological and functional abnormalities of hematopoietic cells, and an increased risk of transformation into acute myeloid leukemia [1]. MDS typically occurs in elderly people, and in the great majority of cases the bone marrow presents hypercellular or normocellular patterns. Hypocellular patterns occur in a lower frequency [2].

Cytogenetic studies have been extremely useful for identifying clonality in primary MDS and for defining specific clinicopathological entities [3]. Nevertheless, the prognostic and therapeutic significance of cytogenetically independent clones remains to be determined. The frequency of unrelated clones detected by cytogenetic analysis in MDS has been reported as between 4.3 and 6.5% [4]. Because of the relative rarity of MDS in children, the cytogenetic findings reported in childhood MDS are limited, compared with those reported in adults.

Here, we describe a rare case of biclonal chromosomal alterations in a child with hypocellular primary MDS, classified as refractory cytopenia (RC), who underwent umbilical cord blood transplantation. We consider also the value

of cytogenetic analysis in diagnosis, prognosis, and guidelines for therapy.

2. Case report

A 13-year-old boy was referred in April 2005 to the National Cancer Institute Bone Marrow Transplant Center (CEMO–INCA), Rio de Janeiro, with suspicion of MDS. He presented with pancytopenia. Peripheral blood count values were hemoglobin 7.5g/dL, platelets $38 \times 10^9/L$, and leucocytes $3.0 \times 10^9/L$. Bone marrow examination showed hypocellularity with moderate megaloblastic features and no fibrosis; abnormal localization of immature precursors was absent, as were blast cells.

Treatment was initiated with supportive care only (blood transfusions), but the pancytopenia persisted. The choice of appropriate protocols of treatment was discussed, and the hypothesis of aplastic anemia was proposed. Cytogenetic analysis of bone marrow cells after GTG banding showed 46,XY,del(17)(p12)[9]/46,XY,del(17)(p12),del(12)(p12)[5]/46,XY,del(11)(q23)[3]/46,XY[34] (Fig. 1). Karyotype description is according to ISCN 1995 [5].

Fluorescence in situ hybridization (FISH) analysis was performed using a *TP53* gene probe (LSI p53, SpectrumOrange; Abbott Molecular/Vysis, Des Plaines, IL) to confirm the 17 chromosome short arm deletion and an *MLL* gene probe (LSI *MLL* dual-color, break-apart rearrangement

* Corresponding author.

E-mail address: teresafernandez@inca.gov.br (T. de Souza Fernandez).



Fig. 1. Partial karyogram of the patient by G-banding. (A) $\text{del}(17)(p12)$ as mainline, and $\text{del}(17)(p12)$ and $\text{del}(12)(p12)$ as clonal evolution. (B) Unrelated clone showing $\text{del}(11)(q23)$.

probe; Abbott Molecular/Vysis) to confirm the deletion of the 11q23 region (Fig. 2). Immunophenotyping was performed with a panel of directly conjugated antibodies: CD45, CD4, CD8, CD2, CD3, CD19, CD10, CD33, CD34, CD61, CD7, and anti-HLA-Dr (BD Biosciences, San Jose, CA).

The immunophenotypic analysis revealed the following abnormalities: hypogranular neutrophils demonstrated by CD45 versus side light scatter, CD10⁺ granulocytes and myeloid lineage expressing nonmyeloid antigens such as

CD2. Based on morphological, immunophenotypic, and cytogenetic studies, the final diagnosis was MDS-RC (according to Hasle et al. [6]).

The patient was referred for bone marrow transplantation, but no histocompatible bone marrow donor was available. In November 2005, he underwent umbilical cord blood transplantation. Prior to the transplant he was transfused with more than 15 units (red blood cells). He underwent 4/6 umbilical cord blood transplantation from a female donor with $4.6 \times 10^7/\text{kg}$ nucleated cells; cyclophosphamide, antithymocyte globulin, and total body irradiation were used as conditioning. Prophylaxis for graft-versus-host disease (GVHD) was cyclosporine, prednisolone, and human immunoglobulin.

By day 32, the patient had developed a grade II acute GVHD, with good partial response to prednisolone. At day 34, he was discharged from the hospital. The corticosteroid dose was gradually tapered, but skin GVHD flared and cyclosporine was replaced by tacrolimus. At this time, bone marrow examination showed normal morphology pattern, with 100% donor chimerism according to variable-number tandem repeats and cytogenetic analysis (46,XX[40]). As of writing, at 17 months after transplantation, the patient was in cytogenetic and molecular remission; he is still using the immunosuppression treatment because a moderate skin GVHD.

3. Discussion

Cytogenetically unrelated clones are uncommon findings in hematologic disorders. In MDS, the frequency is 4.3–6.5% [4]. Our group have been studying clinical and biological characteristics in MDS since 1991, and out of a cohort of 313 patients this is the first case showing biclonality chromosomal alterations, representing a frequency of 0.3%.

It is unclear if the cytogenetically unrelated clones indicate true biclonality of malignancy or represent the result of clonal evolution from a common precursor. We believe in the hypothesis that the karyotypically unrelated clones originate from the common malignant clone through submicroscopic molecular genetic changes and evolutionary process as suggested by some authors [4]. The present case showed two karyotypically unrelated clones, $\text{del}(17)(p12)$ and $\text{del}(11)(q23)$, with deletion of the *TP53* and *MLL* genes, respectively, confirmed by FISH analysis. The clone with

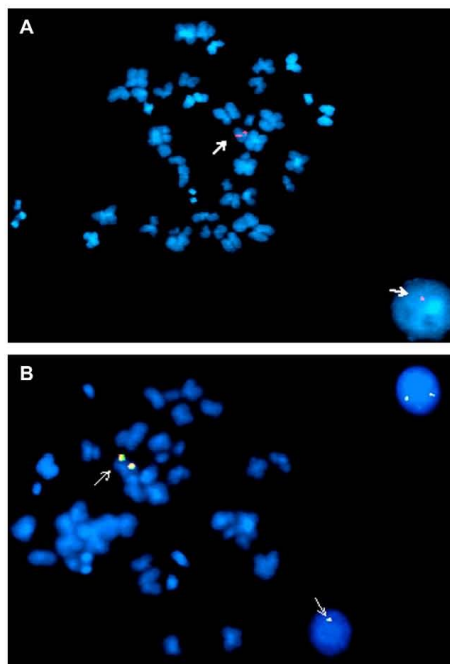


Fig. 2. Fluorescence in situ hybridization analysis of bone marrow cells. (A) *TP53* gene probe (LSI p53, SpectrumOrange), showing only one signal in metaphase and interphase nuclei, confirming the deletion of the *TP53* gene. (B) *MLL* gene probe (LSI MLL dual-color, break-apart rearrangement probe), showing one fusion signal in metaphase and interphase nuclei; the absence of the other fusion signal corresponds to the deletion of the *MLL* gene.

del(17p) acquired a second chromosomal abnormality, del(12p), suggesting the evolution of the disease.

The most frequent chromosome abnormalities involved in unrelated clones were del(5q), +8, del(20q), del(7q), +11, +21, and -22 [4]. From our review of the literature, this case represents the first case of pediatric MDS showing the involvement of these chromosomes alterations in a hypocellular MDS-RC. In some cases the hypocellular bone marrow makes the diagnosis between MDS and aplastic anemia a difficult process, and the cytogenetic and immunophenotypic studies may be considered valuable tools for differential diagnosis. We note that clinically aplastic anemia and MDS patients with hypocellular marrow show great similarities and, in some cases, cytogenetic analysis is considered the only way to distinguish between the two diseases [7,8].

In the present case, cytogenetic analysis was a valuable tool for diagnosis, in clinical decision-making, and in treatment and follow-up. In the International Prognostic Scoring System, alterations involving chromosomes 11, 12, and 17 are considered intermediate risk [9]. Nevertheless, some studies suggest that chromosomes 11 and 17 are involved with disease evolution [1,10]. Our patient was at initial phase of disease (refractory cytopenia), but already had a clonal evolution chromosomal pattern.

Based on cytogenetic and clinical studies, the child was referred for bone marrow transplantation; in the absence of a histocompatible bone marrow donor, the stem cell source used was the umbilical cord blood. Umbilical cord blood is a valuable alternative source of hematopoietic stem cell for transplantation of patients who need an allogeneic transplant but lack a suitable sibling donor [11], and it has been shown to be a curative therapy for several hematologic malignancies [12]. In the present case, the patient showed a favorable clinical response and was, at writing, in cytogenetic and molecular remission. Because stem cell transplantation is the only modality demonstrated to cure patients with MDS, a larger number of cases with these characteristics is necessary to establish the prognostic and therapeutic significance of finding cytogenetically independent clones.

References

- [1] Fernandez TS, Ornellas MH, Carvalho LO, Tabak D, Abdelhay E. Chromosomal alterations associated with evolution from myelodysplastic syndrome to acute myeloid leukemia. *Leuk Res* 2000;24:839–48.
- [2] Tomonaga M, Nagai K. Hypocellular myelodysplastic syndromes and hypocellular acute myeloid leukemia: relationship to aplastic anemia. In: Bennett JM, editor. *The myelodysplastic syndromes: pathobiology and clinical management*. New York: Marcel Dekker, 2002. pp. 121–38.
- [3] Schmetzer HM, Poleck B, Duell T, Gerhartz HH, Mittermuller J. Cytogenetic and Southern blot analysis to demonstrate clonality and to estimate prognosis in patients with myelodysplastic syndromes. *Ann Hematol* 2000;79:20–9.
- [4] Han JY, Theil KS, Hoeltge G. Frequencies and characterization of cytogenetically unrelated clones in various hematologic malignancies: seven years of experiences in a single institution. *Cancer Genet Cytogenet* 2006;164:128–32.
- [5] ISCN 1995: an international system for human cytogenetic nomenclature (1995). In: Mitelman F, editor. Basel: S. Karger, 1995.
- [6] Hasle H, Niemeyer CM, Chessells JM, Baumann I, Bennett JM, Kernstrup G, Head DR. A pediatric approach to the WHO classification of myelodysplastic and myeloproliferative disease. *Leukemia* 2003;17:277–82.
- [7] Appelbaum FR, Barral J, Storb R, Ramberg R, Doney K, Sale GE, Thomas ED. Clonal cytogenetic abnormalities in patients with otherwise typical aplastic anemia. *Exp Hematol* 1987;15:1134–9.
- [8] Martínez-Jaramillo G, Flores-Figueroa E, Sánchez-Valle E, Gutiérrez-Espíndola G, Gómez-Morales E, Montesinos J, Flores-Guzmán, Chávez-González A, Alvarado-Moreno JA, Mayani H. Comparative analysis of the in vitro proliferation and expansion of hematopoietic progenitors from patients with aplastic anemia and myelodysplastic syndrome. *Leuk Res* 2002;26:955–63.
- [9] Greenberg P, Cox C, LeBeau MM, Fenaux P, Morel P, Sanz G, Sanz M, Vallespi T, Hamblin T, Oscier D, Ohyashiki K, Toyama K, Aul C, Mufti G, Bennett J. International scoring system for evaluating prognosis in myelodysplastic syndromes. *Blood* 1997;89:2079–88. [Erratum in: *Blood* 1998;91:1100].
- [10] Bain BJ, Moorman AV, Johansson B, Mehta AB, Secker-Walker LM. European 11q23 Workshop participants. Myelodysplastic syndromes associated with 11q23 abnormalities. *Leukemia* 1998;12:834–9.
- [11] Brunstein CG, Baker KS, Wagner JE. Umbilical cord blood transplantation for myeloid malignancies. *Curr Opin Hematol* 2007;14:162–9.
- [12] Ballen KK, Haley R, Kurtzberg J, Lane TA, Lindgren BR, Miller JP, Newman B, McCullough J. Outcomes of 112 diverse adult and pediatric cord blood transplant recipients from a large cord blood bank. *Transfusion* 2006;46:2063–70.

APÊNDICE C – Transient myelodysplasia in an infant with Down syndrome preceding acute megakaryoblastic leukemia: cytogenetic and immunophenotypic findings (Artigo publicado)



Cancer Genetics and CytoGenetics 188 (2009) 54–56

CANCER GENETICS
AND
CYTOGENETICS

Letter to the editor

Transient myelodysplasia in an infant with Down syndrome preceding acute megakaryoblastic leukemia: cytogenetic and immunophenotypic findings

The incidence of leukemia in children with Down syndrome is 10- to 20-fold higher than in other children. The Down syndrome group exhibit a 46-fold excess incidence of acute myeloid leukemia (AML), with acute megakaryoblastic leukemia (AML-M7) accounting for at least 50% of these cases. A myelodysplastic syndrome (MDS) generally precedes this malignancy [1,2]. The clinical course of MDS can vary from stable disease to rapid progression into acute leukemia. Spontaneous remission of MDS has rarely been observed. This phenomenon is extremely heterogeneous, perhaps related to differing pathogenesis of disease [3,4]. Here, we describe an uncommon case of evolution from primary MDS to AML-M7 in an infant with Down syndrome who showed spontaneous remission during MDS phase.

An 8-month-old girl with Down syndrome, interventricular cleft and patent arteriosus duct was referred to our center because of thrombocytopenia in a preoperative blood count (platelet count, $46 \times 10^9/L$). The white blood cell count was $4 \times 10^9/L$, hemoglobin level was 11.7 g/dL. Analysis of bone marrow (BM) smear and histopathologic examination of BM fragment revealed a hypocellular morphology with dysplastic features. Cytogenetic analysis of bone marrow cells with GTG banding revealed the karyotype as 47,XX,+21c[20]. Analysis of a peripheral blood cell culture stimulated by phytohemagglutinin confirmed the constitutional abnormality, with trisomy 21 observed in 25 cells. Chromosomes were identified and analyzed in accordance with ISCN 2005 [5].

Thrombocytopenia was maintained (platelet count, $49 \times 10^9/L$), and white blood cell count and hemoglobin levels had decreased to $2 \times 10^9/L$ and 9 g/dL, respectively. Analysis of a new BM aspirate revealed an increased cellularity, with 12% myeloblasts, compatible with refractory anemia with excess of blasts (RAEB). Cytogenetic analysis of bone marrow cells with GTG banding showed trisomy of chromosome 21 in 25 metaphases as the sole anomaly. Flow cytometry showed 8% blasts positive for CD34, CD7, CD117, and CD33, with CD10 negative granulocytes.

After a 10-month history of MDS, the patient presented spontaneous remission and the hemogram normalized, with $300 \times 10^9/L$ platelets. She was submitted to cardiac surgery under extracorporeal circulation with success and without

transfusion. Eight months later, the patient presented splenomegaly and leukocytosis ($44 \times 10^9/L$), with 58% myeloblasts. The hemoglobin level was 9.9 g/dL and the platelet count had decreased to $31 \times 10^9/L$. Her BM smears showed 60% myeloblasts, compatible with M7 in the French–American–British (FAB) classification, and immunophenotyping showed blasts positive for CD61, CD41, CD34, and CD117.

Cytogenetic study of bone marrow cells revealed the karyotype as 47,XX,der(17)t(1;17)(q32;p13),+21c[15]/47,XX,+21c[6] (Fig. 1A). Fluorescence in situ hybridization analysis (FISH) was performed using a probe for the *TP53* gene (Vysis LSI p53, SpectrumOrange; Abbott Molecular, Des Plaines, IL) to investigate the involvement of this tumor suppressor gene. We observed that *TP53* is not involved in this chromosomal abnormality (Fig. 1B). The patient was treated with the AML-BFM-2004 protocol. At day 15 of induction therapy, another BM aspirate study was performed, showing aplasia. At day 29, complete morphological, cytogenetic, and immunophenotypic remission was obtained, and as of writing the patient had remained in such remission continuously for an overall follow-up period of 30 months.

The present case shows an uncommon evolution from primary MDS to AML-M7 with spontaneous remission in MDS-RAEB phase in an infant with Down syndrome. This rare phenomenon has been described in some children with MDS and monosomy 7/del(7q), suggesting that these chromosomal alteration are insufficient to produce full leukemic transformation [6]. Petti et al. [3] related spontaneous remission in adults as being likewise a rare event. Spontaneous remission is an unexpected hematologic improvement without concomitant treatments other than vitamins or low levels of steroids and anti-thymocyte globulin [3]. The case reported here involved no infections between diagnosis and spontaneous remission assessment, nor had the patient received any treatment.

To our knowledge, a period of spontaneous remission in a patient with both MDS and Down syndrome has not been previously reported. A transient myeloproliferative disorder or transient leukemia that resolves spontaneously within 3 months after birth has been reported in ~10% of neonates with Down syndrome, but in ~20% of these cases MDS

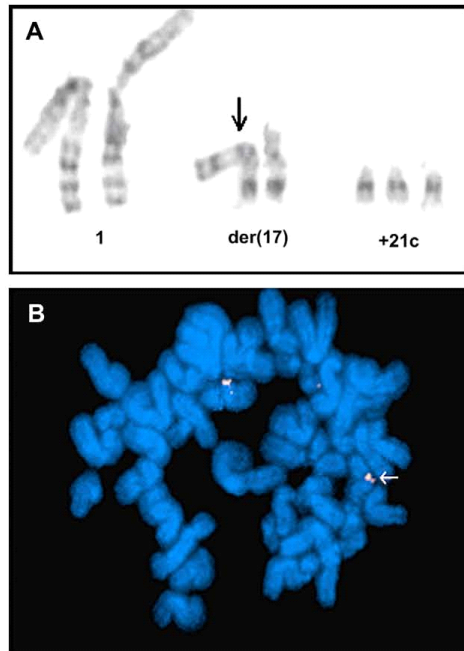


Fig. 1. (A) Partial G-banding karyogram of a bone marrow cell showing the $\text{der}(17)t(1;17)(q32;p13)$ and $+21c$ chromosomal anomalies. (B) FISH analysis of bone marrow cell using a probe for the *TP53* gene (Vysis LSI p53, SpectrumOrange), showing two signals in metaphase, confirming the presence of two alleles, without translocation or deletion of *TP53* in $\text{der}(17)$ (arrow).

and AML-M7 develop during the first 4 years of life [1]. In the present case, the MDS-RAEB phase was characterized in terms of the myelogram, bone marrow biopsy, and flow cytometry findings. Flow cytometry confirmed the percentage of blasts positive for CD34, CD7, CD117 and CD33.

A literature review identified only two cases of coexisting Down syndrome and MDS with CD34 and CD117 positivity. Henderson and Spence [2] described the case of a 22-month-old girl with Down syndrome and MDS of megakaryoblastic lineage and low blast percentage (2%). Cytogenetic study revealed the constitutional abnormality of chromosome 21, and revealed the isochromosome 8q, resulting in 8q tetrasomy, in 7 of 20 cells; this patient was treated with chemotherapy and was associated with a good prognosis [2]. Nevertheless, Tavit et al. [7] described a case of 22-month-old girl with MDS-RAEB and Down syndrome who presented severe anemia and thrombocytosis at diagnosis, with subsequent transformation to AML-M7 with 87% blasts. Cytogenetic analysis at MDS diagnosis showed only the trisomy of chromosome 21. The patient was treated with chemotherapy, but remission was not achieved and she died. The authors suggested that BM blast

cells positive for CD34 and CD117 may be associated with a higher risk of leukemic transformation [7]. (Note that the percentage of blasts was an important prognostic factor in these two cases.)

In the present case, although the patient had spontaneous remission in the MDS phase, after 8 months she experienced transformation to AML-M7, and leukemic blasts in this phase shared the same immunophenotype as in MDS. An abnormal cytogenetic clone with unbalanced translocation resulting in $\text{der}(17)t(1;17)(q32;p13)$ was detected only in the AML-M7 phase. Partial trisomy of the long arm of chromosome 1 as a result of duplication or, more commonly, of unbalanced translocations has been reported by several authors and appears to represent a nonrandom chromosomal anomaly in patients with MDS or AML and Down syndrome [8,9]. Nevertheless, to our knowledge the chromosomal rearrangement resulting in $\text{der}(17)t(1;17)(q32;p13)$ has not previously been described in an infant with Down syndrome and AML-M7.

Because it is strongly suspected that the *TP53* tumor suppressor gene plays a role in leukemogenesis in MDS and AML, we used FISH analysis to look for possible involvement of *TP53* in this chromosomal rearrangement. No translocation or deletion in this gene was detected.

The present case was related to favorable outcomes. Taking together the immunophenotype, and the cytogenetic and the clinical features, it seems that neoplastic clone in MDS is related to AML-M7 and that the acquisition of cytogenetic abnormality may play a pivotal role in leukemogenesis. This case illustrates the importance of close follow-up in a child with Down syndrome presenting MDS, to monitor for spontaneous remission, evolution of the disease, or both. Further data are needed to characterize this course of disease.

Acknowledgments

This work was supported by the Brazilian Ministry of Health (National Institute of Cancer/INCA, Brazil) and Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro/FAPERJ, Brazil.

Eliane Ferreira Rodrigues
Bone Marrow Transplant Center
National Cancer Institute (INCA)
Rio de Janeiro, Brazil

Elaine Sobral da Costa
Marcelo Gerardin Land
Martagão Gesteira Institute of Pediatrics and Child
Development, Federal University of Rio de Janeiro
Rio de Janeiro, Brazil

Hilda Rachel Diamond
Bone Marrow Transplant Center
National Cancer Institute (INCA)
Rio de Janeiro, Brazil

Maria Helena Ornellas
*Bone Marrow Transplant Center
 National Cancer Institute (INCA)
 Rio de Janeiro, Brazil
 and
 Faculty of Medical Sciences
 State University of Rio de Janeiro
 Rio de Janeiro, Brazil*

Eliana Abdelhay
*Bone Marrow Transplant Center
 National Cancer Institute (INCA)
 Rio de Janeiro, Brazil*

Teresa de Souza Fernandez
*Bone Marrow Transplant Center
 National Cancer Institute (INCA)
 Rio de Janeiro, Brazil
 and
 Faculty of Medical Sciences
 State University of Rio de Janeiro
 Rio de Janeiro, Brazil*

E-mail address: teresafernandez@inca.gov.br (T. de Souza Fernandez)

References

- [1] Hitzler JK, Zipursky A. Origins of leukaemia in children with Down syndrome. *Nat Rev Cancer* 2005;5:11–20.
- [2] Henderson R, Spence L. Down syndrome with myelodysplasia of megakaryoblastic lineage. *Clin Lab Sci* 2006;19:161–4.
- [3] Petti MC, Latagliata R, Breccia M, Alimena G, Spadea A, D'Andrea M, Mancini M, Aloe Spiriti MA, Mandelli F. Spontaneous remission in adult patients with de novo myelodysplastic syndrome: a possible event. *Haematologica* 2001;86:1277–80.
- [4] Leung EW, Woodman RC, Roland B, Abdelhaleem M, Freedman MH, Dror Y. Transient myelodysplastic syndrome associated with isochromosome 7q abnormality. *Pediatr Hematol Oncol* 2003;20:539–45.
- [5] ISCN2005: an international system for human cytogenetic nomenclature (2005). In: Shaffer LG, Tommerup N, editors. Basel: S. Karger, 2005.
- [6] Parker TM, Klaassen RJ, Johnston DL. Spontaneous remission of myelodysplastic syndrome with monosomy 7 in a young boy. *Cancer Genet Cytogenet* 2008;182:122–5.
- [7] Tavit B, Çetin M, Tuncer M. CD34/CD117 positivity in assessment of prognosis in children with myelodysplastic syndrome. *Leuk Res* 2006;30:222–4.
- [8] Blann MM, Morgan DL, Oblender M, Heinen B, Williams J, Tonk VS. Duplication of 1q in a child with Down syndrome and myelodysplastic syndrome. *Cancer Genet Cytogenet* 2000;119:74–6.
- [9] Forestier E, Izraeli S, Beverloo B, Haas O, Pession A, Michalová K, Stark B, Harrison CJ, Teigler-Schlegel A, Johansson B. Cytogenetic features of acute lymphoblastic and myeloid leukemias in pediatric patients with Down syndrome: an iBFM-SG study. *Blood* 2008;111:1575–83.

APÊNDICE D - Tabela 2: Correlação entre a presença de metilação nos genes *p15^{INK4b}* e *p16^{INK4a}* com o padrão cromossômico em SMD primária na infância

Nº	Idade/ Sexo	Subtipo	Cariótipo	Metilação nos genes		Evolução da doença
				<i>p15^{INK4b}</i>	<i>p16^{INK4a}</i>	
1	12a/ M	CR	46,XY,-7,+20[13]/ 46,XY[7]	+	+	não
2	7a/ M	CR	46,XY,del(12)(p12)[6]/46,XY[37]	+	-	não
3	8a/ F	CR	46,XX[30]	-	-	não
4	18a/ F	CR	46,XX,del(6)(q21)[3]/46,XX[35]	+	-	sim
5	7a/ M	CR	46,XY[32]	-	-	não
6	15a/ F	CR	46,XX[36]	-	-	não
7	16a/ F	CR	47,XX,+mar[2]/46,XX[27]	+	-	não
8	7a/ F	CR	46,XX[30]	-	-	não
9	6a/ F	CR	46,XX[32]	-	-	não
10	14a/ M	CR	46,XY,del(17)(p12)[15]/46,XY[28]	+	-	não
11	8 a/ F	CR	46,XX,del(9)(p12)[3]/46,XX[19]	-	-	não
12	13a/ M	CR	46,XY,del(17)(p12)[9]/46,XY,del(17)(p12), del(12)(p13)[5]/46,XY,del(11)(q23)[3]/ 46,XY[34]	-	-	não
13	9a/ M	CR	46,XY,del(3)(p23)[5]/46,XY[38]	-	-	sim
14	1a/ M	CR	46,XY[32]	-	-	não
15	3a/ M	CR	46,XY,+der(3)del(3)(q21),-7,-9,+mar[2]/ 46,XY[27]	-	-	sim
16	13a/ F	CR	46,XX,del(5)(q14q31)[15]/ 46,XX[28]	-	-	não
17	14a/ M	CR	46,XY,del(11)(q23)[5]/ 46,XY[17]	-	-	não
18	7a/ F	CR	46,XX,del(12)(p13)[10]/46,XX[28]	-	-	não
20	15a/ F	CR	46,XX[22]	+	-	não
21	7a/ F	CR	46,XX[25]	-	-	não
22	2a/ F	CR	46,XX,del(4)(q22)[6]/46,XX[28]	-	-	não
23	4a/ M	CR	47,XY,+mar[4]/ 46,XY[49]	-	-	não
24a	2a/ M	AREB-t	46,XY[20]	-	-	sim
25	7m/ M	CR	46,XY[34]	-	-	sim
26	2a/ F	CR	46,XX,del(17)(p12)[5]/46,XX[45]	+	-	não
30	18a/ M	CR	46,XY[46]	-	-	não
32	4a/ M	CR	46,XY,del(11)(q23)[5]/46,XY[31]	-	-	sim
33	7a/ M	CR	45,XY,-21[5]/46,XY[42]	-	-	não
34	6a/ M	CR	46,XY[38]	-	-	não
35	2a/ F	CR	46,XX,del(11)(q23)[3]/46,XX[12]	-	-	sim
36	9m/ F	CR	46,XX[33]	-	-	não
37	9a/ F	CR	46,XX[22]	-	-	não
38	7m/ M	CR	46,XY[32]	-	-	não
39	11a/ F	CR	46,XX,i(9)(q10)[14]/46,XX[6]	-	-	não
40	11m/ M	CR	46,XY[42]	-	-	não

42	4a/ F	CR	46,XX,del(9)(q22;q32)[2]/46,XX[22] *	-	-	não
43	3a/ M	CR	46,XY[29]	-	-	não
44	17a/ F	CR	46, XX [20]	-	-	não
45	13a/ M	CR	46,XY[28]	-	-	não
46	2a/ M	CR	46,XY[26]	-	-	não
47	5m/ F	CR	46,XX[38]**	-	-	não
48	9a/ F	CR	46,XX[30]	-	-	não
50	8a/ M	CR	46,XY[31]	-	-	não
51	3m/ F	CR	45,XX,-7[24]/46,XX[2]	-	-	não
52a	9a/ M	LLA	49,XY,+12,+16,+22[3]/51,XY,del(6)(q14), +12,+16,+20,+21,+22[3]/52,XY,+5, del(6)(q14),+12,+16,+20,+21,+22[2]/ 51,XY,+12,+16,+18,+21,+22[2]/46,XY[14]	+	-	sim
53	16a/ M	CR	46,XY[27]	+	-	não
54	2a/ F	CR	46,XX[35]	-	-	sim
55	13a/ M	CR	47,XY,+Y[12]/46,XY[8]	-	-	não
58	17a/ M	CR	46,XY[28]	-	-	não
59	11a/ M	CR	46,XY[30]	-	-	não
62	7a/ M	CR	46,XY,del(11)(q23)[4]/46,XY[48]	-	-	não
77	10a/ M	CR	45,XY,-7[26]	+	+	sim
79	18m/ F	AREB	46,XX,del(11)(q23)[8]/46,XX[14]	-	-	sim
80	10a/ F	AREB	46,XX,del(6)(q24)[3]/46,XX[15]	-	-	sim
81	7 a/F	AREB	46,XX,del(6)(q23)[8]/46,XX[18]	-	-	não
82	2a/F	AREB	46,XX,del(11)(q23)[5]/46,XX[18]	-	+	sim
83	16a/ M	AREB	47,XY,+8[30]/46,XY[25]	-	-	sim
84	7a/ F	AREB	46,XX,i(9)q10)[15]/46,XX[7]	+	-	sim
85	14a/ F	AREB	46,XX,del(11)(q23)[4]/46,XX[23]	-	+	sim
86	13a/ F	AREB	46,XX,del(7)(q22)[10]/46,XX[12]	+	-	não
87	12a/ M	AREB	46,XY,del(11)(q23)[12]/46,XY[8]	+	-	sim
88	6a/ F	AREB	58,XX,+X,+3,+5,+6,+8,+10,+11,+12,+13, +18,+20,+21[5]/58,XX,idem, dup(1)(q21q31)[14]/46,XX[21]	-	-	sim
89	14a/ M	AREB	46,XY,del(7)(q22)[10]/46,XY,del(7)(q22), del(12)(p12)[3]/46,XY[7]	+	-	sim
90	9a/ F	AREB	47,XX,+6[26]/46,XX[16]	-	+	não
92	3a/M	AREB	46,XY[34]	-	-	não
93	4a/M	AREB	46,XY[30]	-	-	não
95	3m/ M	AREB	46,XY[33]	-	-	não
100	8a/ F	AREB	46,XX,del(7)(q22)[7]/46,XX[9]	+	-	não
101	21m/M	AREB-t	45,XX,-7[14]/46,XX[8]	+	-	sim
102	12a/ M	AREB-t	45,XY,-7[18]/46,XY[2]	+	-	sim
103	5a/ M	AREB-t	46,XY,t(5;8)(q32,q22)[23]/46,XY[8]	+	+	sim
104	22m/ M	AREB-t	45,XY,-7[14]/46,XY[6]	+	-	sim
108	12a/ M	AREB-t	45,XY,-7[24]/46,XY[1]	+	-	sim
109	13a/ F	AREB-t	47,XX,+21[6]/48,XX,+21,+mar[4]/ 46,XX[10]	+	-	sim
110	15a/ M	AREB-t	45,XY,-7[10]/46,XY[16]	-	-	sim

111	1a/ M	AREB-t	47,XY,+8,del(11)(q23)[9]/46,XY[13]	-	-	sim
113	13a/ M	AREB-t	45,XY,-7[12]/46,XY[8]	+	-	sim
2	1a/ M	AREB	47,XX,+21c[25] ***	-	-	sim
3	12a/ M	AREB-t	58,XY,+8,+13,+13,+14,+15,+20,+21,+21c/ 47,XY,+21c[12] Down	-	-	sim

APÊNDICE E - Epigenetic alterations of $p15^{INK4B}$ and $p16^{INK4A}$ genes in pediatric primary myelodysplastic syndrome (Artigo publicado)

Leukemia & Lymphoma, October 2010; 51(10): 1887–1894

informa
healthcare

ORIGINAL ARTICLE: RESEARCH

Epigenetic alterations of $p15^{INK4B}$ and $p16^{INK4A}$ genes in pediatric primary myelodysplastic syndrome

ELIANE F. RODRIGUES^{1,2}, CÍNTIA B. SANTOS-REBOUÇAS³, MÁRCIA M. GONÇALVES PIMENTEL³, ANDRE L. MENCALHA¹, JANE DOBBIN⁴, ELAINE S. DA COSTA⁵, CECÍLIA DE SOUZA FERNANDEZ⁶, LUIS F. BOUZAS¹, ELIANA ABDELHAY¹, & TERESA DE SOUZA FERNANDEZ^{1,2}

¹Bone Marrow Transplant Center, National Cancer Institute (INCA), Rio de Janeiro, Brazil, ²Faculty of Medical Sciences, State University of Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil, ³Human Genetics Service, Department of Genetics, State University of Rio de Janeiro, Brazil, ⁴Hematology Service, National Cancer Institute (INCA), Rio de Janeiro, Brazil, ⁵Martagão Gesteira Institute of Pediatrics and Child Development, Federal University of Rio de Janeiro, Brazil, and ⁶Institute of Mathematics, Federal Fluminense University, Rio de Janeiro, Brazil

(Received 1 April 2010; revised 12 June 2010; accepted 27 June 2010)

Abstract

We studied the methylation status of the $p15^{INK4B}$ and $p16^{INK4A}$ genes in 47 pediatric patients with primary MDS, its correlation with subtype, and the role of $p15^{INK4B}$ and $p16^{INK4A}$ in the evolution of MDS toward AML. Aberrant methylation of the $p15^{INK4B}$ gene was detected in 15 of 47 patients (32%), whereas only four patients demonstrated methylation of the $p16^{INK4A}$ gene (8%). The frequency of $p15^{INK4B}$ methylation was significantly higher in RAEB and RAEB-t subtypes ($p < 0.003$). Aberrant methylation of the $p16^{INK4A}$ gene was also more frequent in the subtypes that characterize advanced stages of the disease ($p < 0.05$). Evolution of disease was verified in 17 (36%) of the 47 patients. The association of $p15^{INK4B}$ and $p16^{INK4A}$ methylation status with evolution of disease was clearly significant ($p < 0.008$ and $p < 0.05$, respectively). These results suggest that methylation of the $p15^{INK4B}$ and $p16^{INK4A}$ genes is an epigenetic biomarker of pediatric disease evolution.

Keywords: $p15^{INK4B}$ gene, $p16^{INK4A}$ gene, pediatric myelodysplastic syndrome, epigenetic, methylation

Introduction

Myelodysplastic syndrome (MDS) comprises a heterogeneous group of clonal bone marrow disorders characterized by varying degrees of pancytopenia, morphological and functional abnormalities of hematopoietic cells, and an increased risk of transformation into acute myeloid leukemia (AML) [1]. MDS is viewed as a disease of adults, particularly the elderly. Pediatric MDS is an uncommon disorder, accounting for fewer than 5% of hematopoietic malignancies [2,3]. The rarity of childhood MDS as well as its heterogeneous nature have further contributed to the difficulties in classifying this

disease. Hasle and colleagues proposed a pediatric approach to the World Health Organization (WHO) classification of myelodysplastic syndrome: (1) MDS occurring both *de novo* and secondarily, including the subtypes refractory cytopenia (RC), refractory anemia with excess of blasts (RAEB), and refractory anemia with excess of blasts in transformation (RAEB-t); (2) a group of myelodysplastic/myeloproliferative disorders with juvenile myelomonocytic leukemia (JMML) as the most common disorder of this category; and (3) myeloid leukemia of Down syndrome (DS), a disease with distinct clinical and biological features, encompassing both MDS and AML [4].

Correspondence: Dra. Teresa de Souza Fernandez, Instituto Nacional de Câncer (INCA), Centro de Transplante de Medula Óssea, Laboratório de Citogenética, Praça Cruz Vermelha n° 23, 6° andar, Centro, Rio de Janeiro, RJ, CEP 20230-130, Brazil. Tel: +55-21-2506-6701. E-mail: teresafernandez@inca.gov.br

ISSN 1042-8194 print/ISSN 1029-2403 online © 2010 Informa UK, Ltd.
DOI: 10.3109/10428194.2010.505820

In children, MDS appears with distinct clinical and laboratory characteristics, when compared with adults, which may reflect special biological features of MDS during childhood. Due to its variety, the pathogenesis of pediatric MDS has not been adequately studied [5]. Very little is known about the molecular basis of pediatric MDS development and its transformation to AML [2]. Epigenetic alterations such as the aberrant methylation of CpG islands in the promoter regions of genes have been reported to inactivate tumor-suppressor genes and to contribute to tumorigenesis and tumor progression, and, for this reason, could be considered a potential marker of disease [6,7]. Hypermethylation of the promoter region was found to be an abnormal mechanism of *p15^{INK4B}* and *p16^{INK4A}* gene inactivation in hematological malignancies [8,9]. In AML, methylation of *p15^{INK4B}* is independently correlated with poor prognosis [10]. The *p15^{INK4B}* and *p16^{INK4A}* genes are members of the cyclin-dependent kinase (CDK) inhibitor family, which controls progression of the cell cycle from G1 to S phase. The products of these genes regulate retinoblastoma (RB) protein function by modulating the complex cyclin D-CDK4/6, which can phosphorylate and inactivate the RB protein and set up an important pathway for inhibiting cell growth [10,11]. In MDS, aberrant methylation of the *p15^{INK4B}* gene has been related to more aggressive subtypes of the disease; however, some studies have shown that it can occur in early or later stages of MDS [12–14]. The majority of these studies focused on adult MDS. Few studies have investigated the methylation status of genes, including *p15^{INK4B}* and *p16^{INK4A}*, in pediatric MDS [15,16]. The aim of this study, therefore, was to determine the methylation status of *p15^{INK4B}* and *p16^{INK4A}* in pediatric primary MDS, its correlation with the different subtypes, and the role of *p15^{INK4B}* and *p16^{INK4A}* genes in the development and evolution of MDS toward AML.

Materials and methods

Patients and controls

Bone marrow cells were obtained from 47 patients with pediatric primary MDS between August 1991 and March 2008. These patients included 29 boys and 18 girls, with ages between 5 months and 18 years (mean 9 years). The patients were diagnosed at the Hematology/Oncology Units of several hospitals in Rio de Janeiro, Brazil: (1) National Cancer Institute (INCA-RJ); (2) Pedro Ernesto Hospital (HUPE-UERJ); (3) Martagão Gesteira Institute of Pediatrics and Child Development (UFRJ); and (4) Arthur Siqueira Cavalcanti Hematology Institute

(HEMORIO). Diagnosis and classification was done according to the criteria of Hasle and colleagues [4]. Thirty patients were classified as RC (bone marrow [BM] blasts < 5%, with mean 2%), nine as RAEB (BM blasts 5–19%, with mean 14%), and eight as RAEB-t (BM blasts 20–29%, with mean 24%). None of the patients had been previously treated for a malignancy. Normal bone marrow samples were also obtained from 10 bone marrow transplant donors, and used as non-methylated controls. These bone marrow samples were obtained from children aged between 10 and 18 years, and were collected from our Bone Marrow Transplant Center (CEMO-INCA). As methylated controls, we used DNA of cell lines Raji, derived from Burkitt lymphoma, and DLD-1, derived from colorectal adenocarcinoma. We also used EpiTect Control DNA (completely methylated bisulfite-converted DNA; Qiagen). This study was reviewed and approved by the Ethical Committee of the National Cancer Institute and was conducted in accordance with the Declaration of Helsinki.

Methylation-specific polymerase chain reaction

Analyses of the methylation status of promoter regions of the *p15^{INK4B}* and *p16^{INK4A}* genes were performed by methylation-specific polymerase chain reaction (MSP), as described by Herman and colleagues [17]. Mononuclear cells were isolated from bone marrow aspirates by Ficoll-Hypaque gradient centrifugation. Genomic DNA was extracted using DNAzol (Invitrogen) according to the manufacturer's protocol. DNA (2 µg) was denatured by the addition of NaOH (0.2 mol/L) for 10 min at 37°C. Hydroquinone (10 mM) (Sigma) and sodium bisulfite (3 M) (Sigma) at pH 5.0 were added, and samples of the mixture were incubated under mineral oil at 50°C for 16 h. Modified DNA was purified using Wizard DNA Purification Resin according to the manufacturer's instructions (Promega) and then eluted into 50 µL of water. Final desulfonation was achieved by treatment with NaOH (0.3 mol/L) at room temperature for 5 min, followed by ethanol precipitation with glycogen as carrier. The DNA was resuspended in 20 µL of water. Bisulfite-modified DNA was amplified by polymerase chain reaction (PCR) using primer sets designed by Herman and colleagues [17]. Each PCR was carried out in a 50 µL volume containing 3 µL of bisulfite-modified DNA, 6.7 mM MgCl₂, 1 × PCR buffer, 1.25 mM dATP, 1.25 mM dTTP, 1.25 mM dCTP, and 1.25 mM dGTP (Invitrogen), and 1 nmol of primer U or primer M. The PCR conditions were as follows: 95°C for 10 min, after which 1

U of Taq polymerase (Invitrogen) was added, then 35 cycles at 94°C for 1 min, 60°C for 30 s, 72°C for 30 s, and a final extension of 10 min at 72°C. Positive controls (DNA samples from cell lines) as well as negative controls (DNA samples from bone marrow transplant donors) were included in each set of reactions. PCR products were loaded on 5% acrylamide gel and visualized by silver staining.

Sequencing

To confirm the abnormal methylation patterns seen in MSP, samples of PCR products were sequenced. Ampligens purified using GFX™ PCR (DNA and Gel Band Purification Kit; Amersham Biosciences) were sequenced with the ABI PRISM 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) using the BigDye Terminator v.3.0 kit, under conditions specified by the manufacturer. Resulting sequences were compared with the wild-type sequence (Genbank) using BioEdit software (v.7.0.9; Ibis Biosciences).

Quantitative methylation analysis of $p15^{INK4B}$ and $p16^{INK4A}$ genes

We used two methods for analysis of the percentage of methylation of $p15^{INK4B}$ and $p16^{INK4A}$ genes in the DNA samples as found by MSP and sequencing: combined bisulfite restriction analysis (COBRA) [18] and quantitative methylation-specific PCR (QMS-PCR) [19].

COBRA. PCR reactions were performed using 3 μ L of DNA modified by bisulfite, 6.7 mM MgCl₂ (Invitrogen), 5 μ L of reaction buffer (Invitrogen), 1.25 mM each of the deoxyribonucleotide triphosphates (dNTPs) (Invitrogen), 1 nmol primers, and 1 U of Taq polymerase (Invitrogen), to a final volume of 50 μ L. Before the addition of Taq polymerase, the samples were denatured at 95°C for 10 min. The reaction was performed using the PTC-150 Thermocycler (MJ Research). The oligonucleotides used for each gene were: $p15^{INK4B}$, 5'GGTTTTGGYGAGGGTTGTTT3' (forward) and 5'ACCCTATCCCTCAAATCCTCTAAAA3' (reverse); and $p16^{INK4A}$, 5'GGAGTTTAAGGGGGTGGG3' (forward) and 5'CCTAAATTACTTCTAAAAAAAAC3' (reverse). The conditions for cycling were according to Toyota and colleagues [9]. After amplification, products were visualized on 5% polyacrylamide gel stained with silver nitrate. Subsequently, the amplified samples were digested using restriction endonucleases NruI ($p15^{INK4B}$) and TaqI ($p16^{INK4A}$) (Invitrogen). After digestion, products were visualized on 10% polyacrylamide gel stained with silver nitrate. Samples positive for methylation

were digested by enzyme and negative samples remained unchanged. Quantification of the DNA in polyacrylamide gel was performed by densitometry.

QMS-PCR. We used QMS-PCR to analyze the levels of $p15^{INK4B}$ and $p16^{INK4A}$ methylation. Bisulfite-modified DNA from bone marrow cells of patients with MDS were prepared as described previously. As control samples, we used methylated and bisulfite-converted human control DNA (fully methylated DNA reference; EpiTect Control DNA, Qiagen), bisulfite-converted DNA from Raji and DLD-1 cell lines, and bisulfite-converted DNA from bone marrow donors (non-methylated reference DNA). The reactions were carried out using primer pairs specifically designed to bind bisulfite-converted sequences of CpG islands in the promoter region of each gene. The primer sequences were as follows: $p15^{INK4B}$, Mf 5'GCGTTTCGTATTTTGCGTT3'/Mr 5'CGTACAATAACCGAACGACCGA3'; $p16^{INK4A}$, Mf 5'TTATTAGAGGGTGGGC GGATCGC3'/Mr 5'GACCCCGAACCCGACCGTAA3'. The β -actin gene (ACTNB) was amplified and used as an internal control for PCR normalization: ACTNB, 5'CGCCAACACAGTGCTGTCT3'/5'CACGGAGTACTTGCCTCAG3'. The methylation percentages were assessed by extrapolation of a standard curve performed with combinatorial serial dilution between methylated and non-methylated DNA (100%, 50%, 10%, and 0% methylation). All tests were run in duplicate, and the average cycle threshold (*Ct*) value was used for quantification. Each PCR mixture contained 500 nM each primer, 100 ng of DNA, and 1 \times Fast EvaGreen qPCR Master Mix (Biotium, Inc.). Reactions were performed in a Rotor-Gene 6000 (Corbett) using the following profile: 95°C for 5 min, 45 cycles at 95°C for 20 s, and 60°C for 1 min.

Statistical analysis

The correlation between $p15^{INK4B}$ gene methylation status and subtypes of pediatric primary MDS, considering initial stage RC and later stages RAEB and RAEB-t, was assessed by the χ^2 test. The association between disease evolution and aberrant methylation in $p15^{INK4B}$ in bone marrow samples was also performed by χ^2 test. Similar analyses were done for methylation in the $p16^{INK4A}$ gene. The χ^2 test was used in conjunction with the Yates correction for continuity. The correlation of methylation levels in the different MDS subtypes was calculated using analysis of variance (ANOVA). We calculated the arithmetical mean time of evolution in patients who had $p15^{INK4B}$ methylation, patients who had $p16^{INK4A}$ methylation, and those who had no

methylation on each of these genes. We used the Mann-Whitney test to analyze the times of disease transformation from MDS to AML for patients who did or did not have methylation of $p15^{INK4B}$ or $p16^{INK4A}$ genes. A value of $p < 0.05$ was considered significant in all analyses.

Results

Analysis of methylation status of $p15^{INK4B}$ and $p16^{INK4A}$ genes in pediatric primary MDS

We analyzed the methylation status of the promoter region of the cell cycle regulatory genes, $p15^{INK4B}$ and $p16^{INK4A}$, in 47 children with primary MDS. We found that in 17 of 47 cases (36%), at least one of the two genes was methylated. Aberrant methylation of $p15^{INK4B}$ was detected in 15 of 47 patients (32%), whereas only four patients demonstrated methylation of $p16^{INK4A}$ (8%). All patients also showed amplification with non-methylated primer pairs, including those patients positive for methylation. Both $p15^{INK4B}$ and $p16^{INK4A}$ genes were found to be non-methylated in all samples from bone marrow transplant donors (negative controls). Raji and DLD-1 cell lines (positive controls) showed strong amplification with p15M and p16M primer pairs. However, the Raji cell line showed a little amplification with non-methylated primer pairs. This result was also observed by Herman *et al.* [17]. Two patients (4%) of 47 analyzed showed aberrant methylation in both genes. Sequencing of the 17 p15M and four p16M PCR products from patients with pediatric primary MDS confirmed that all cytosines had been converted to thymidines except in methylated CpG dinucleotides, where cytosines remained unchanged. Representative methylation-specific PCR results for $p15^{INK4B}$ and $p16^{INK4A}$ genes and sequencing analyses are shown in Figure 1.

Correlation of aberrant methylation in $p15^{INK4B}$ and $p16^{INK4A}$ genes with subtypes of pediatric primary MDS and disease evolution

The distribution of $p15^{INK4B}$ methylation among the different subtypes was 5/30 (16%) in patients with RC, 5/9 (55%) in patients with RAEB, and 5/8 (62%) in patients with RAEB-t (Table I). The frequency of $p15^{INK4B}$ gene methylation was significantly higher in later stages of disease (RAEB and RAEB-t) compared with the initial stage (RC) of primary MDS ($p < 0.003$). Methylation of the $p16^{INK4A}$ gene was present in 2/9 with RAEB (22%) and in 2/8 with RAEB-t (25%). Among 30 children with the RC subtype, none presented $p16^{INK4A}$ methylation, and among 17 children with later stages of disease (RAEB

and RAEB-t), four presented methylation of $p16^{INK4A}$. Aberrant methylation in the $p16^{INK4A}$ gene was found more frequently in subtypes characterizing the advanced stages of MDS ($p < 0.05$).

Evolution of disease was verified in 17 (36%) of the 47 patients. Aberrant methylation of the $p15^{INK4B}$ gene was detected in 53% (9/17) of patients who had evolution of disease. In contrast, the disease did not evolve from MDS toward AML in 75% (24/32) of patients without methylation of $p15^{INK4B}$. In fact, the association of $p15^{INK4B}$ methylation status with evolution of the disease was highly significant ($p < 0.008$). Among four children with methylation of the $p16^{INK4A}$ gene, the disease evolved in all (100%). In contrast, among 43 children with no methylation of the $p16^{INK4A}$ gene, 30 (70%) did not show evolution of the disease. Therefore, statistical analysis suggests that the presence of $p16^{INK4A}$ methylation is related to evolution of the disease ($p < 0.05$). The correlation of $p15^{INK4B}$ and $p16^{INK4A}$ methylation with clinical features is shown in Table II. Studying the status of $p15^{INK4B}$, we did not find statistically significant correlation with age and sex of the patients, but there was a correlation with percentage of blasts, cytogenetics, subtypes of disease, and evolution of disease. Also, studying the status of $p16^{INK4A}$, we found that correlation with age, sex, and cytogenetics was not significant.

The mean time of disease evolution in patients who had $p15^{INK4B}$ methylation was 4.6 months and in patients with no $p15^{INK4B}$ methylation was 14.6 months. The mean time of disease evolution for patients who had $p15^{INK4B}$ methylation, therefore, was three times less than the mean time of evolution for patients who had no $p15^{INK4B}$ methylation. We analyzed the statistical significance of this using the Mann-Whitney test, and the result was $p < 0.02$. Patients with no $p16^{INK4A}$ methylation had 11.5 months as mean time of disease evolution, and the mean time of disease evolution in patients with $p16^{INK4A}$ methylation was 2.75 months ($p < 0.01$).

We performed quantitative analysis to evaluate whether there was a correlation between percentage of $p15^{INK4B}$ methylation and MDS subtypes. The percentage of $p15^{INK4B}$ methylation was higher in RAEB and RAEB-t compared to RC ($p < 0.0001$). The same result was observed for the $p16^{INK4A}$ gene ($p < 0.0001$) (Figure 2). Hence, our results suggest that there is a direct correlation between the level of methylation in $p15^{INK4B}$ and $p16^{INK4A}$ genes in pediatric MDS and the percentage of bone marrow blasts ($p < 0.0001$). Both methods were accurate in showing a correlation between the subtypes of disease and the level of methylation, but the QMS-PCR method was more sensitive than COBRA ($p < 0.0001$).

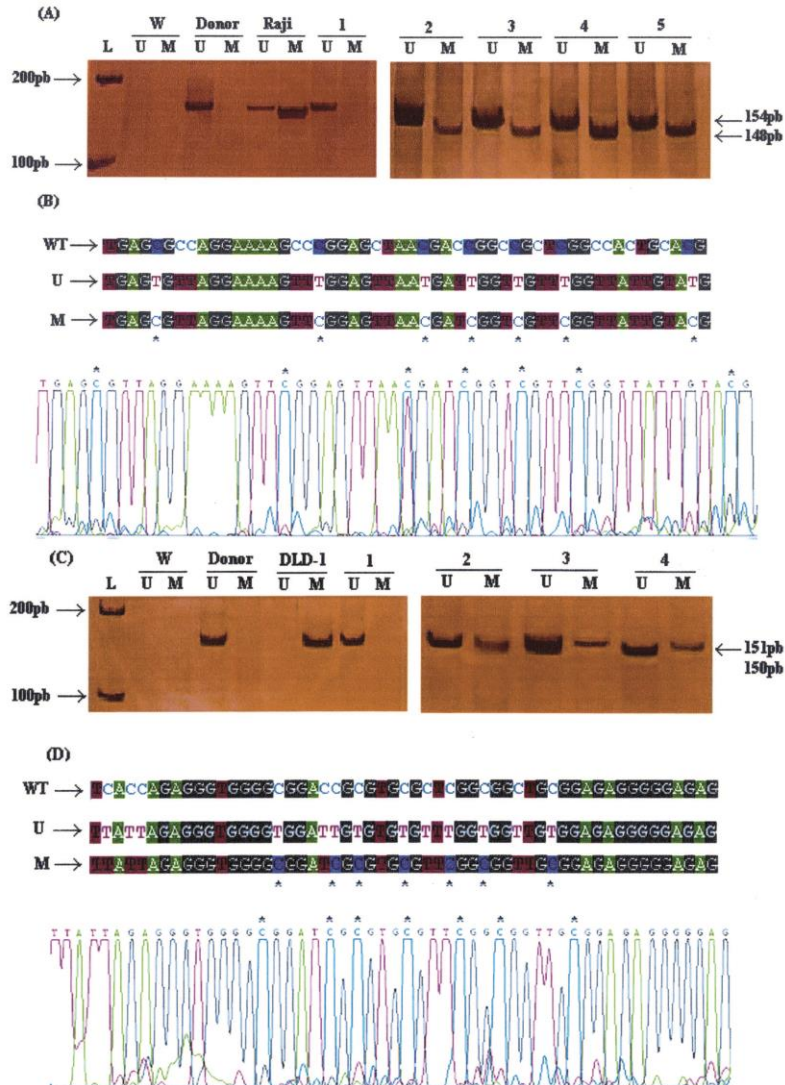


Figure 1. (A) Representative MSP for $p15^{INK4B}$ gene using $p15$ U primers, specific for non-methylated DNA (U) and $p15$ M primers, specific for methylated DNA (M). W (water, negative control), Donor (negative control), Raji (positive control); 1: patient without $p15$ methylation, 2–5: patients with $p15$ methylated and non-methylated cells. (B) Samples methylated in PCR products were sequenced with ABI PRISM 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems). Resulting sequences (M) were compared with wild-type sequence (WT) (Genbank) and non-methylated sequence (U) using BioEdit software (v.7.0.9; Ibis Biosciences). (C, D) Similar analyses for $p16^{INK4A}$ gene.

Discussion

The progressive increase of bone marrow blast involvement in MDS suggests that a fraction of clonal dysplastic cells lose cell cycle regulation and

differentiation during evolution of the disease. Previous studies have investigated methylation patterns in the $p15^{INK4B}$ and $p16^{INK4A}$ genes to clarify their roles in the pathogenesis of MDS. Most of these studies were carried out in adult patients. Some of

these showed that the $p15^{INK4B}$ gene was frequently methylated in patients with high-risk MDS (RAEB, RAEB-t) and that overt leukemia evolved from MDS, compared with patients with low-risk MDS (refractory anemia [RA] and RA with ringed sideroblasts [RARS]). In contrast, none of the patients with MDS showed hypermethylation of the $p16^{INK4A}$ gene [12,14,20]. On the other hand, Solomon and colleagues demonstrated the presence of aberrant methylation in $p15^{INK4B}$ and $p16^{INK4A}$ genes in 61% (25/41) and 37% (15/41) of adult patients with MDS, respectively [21]. Thus, there is some

controversy about the frequency of methylation in $p15^{INK4B}$ and $p16^{INK4A}$ even in adult MDS.

Because of the rarity of MDS in children, very little is known about the molecular basis of its development and transformation to AML. Flotho noted it should be emphasized that MDS in children is not simply a counterpart of the adult disease in a different age group [22]. Although MDS in children and adults shares morphologic features, peripheral cytopenias, and eventual transformation to myeloid leukemia, the clinical course in childhood MDS is much more heterogeneous. Looking at this aspect, some studies showed that genes that are mutated in adult patients with MDS and have an important role during development of the disease do not have this characteristic in pediatric MDS, such as *N-ras* point mutation [23–25].

The methylation status of $p15^{INK4B}$ and $p16^{INK4A}$ genes in pediatric MDS was analyzed in two studies. Hasegawa and colleagues described the first study investigating the methylation status of $p15^{INK4B}$ and $p16^{INK4A}$ in nine pediatric patients with MDS, using the MSP method [15]. Only one of these patients presented with the initial stage of MDS. The frequency of methylation in the $p15^{INK4B}$ gene was 78%. Methylation of the $p16^{INK4A}$ gene was not detected [15]. Vidal and colleagues examined the

Table I. Frequency of $p15^{INK4B}$ and $p16^{INK4A}$ gene methylation in subtypes of primary MDS in childhood.

Subtype	Number of patients	Number of patients with $p15^{INK4B}$ methylation	Number of patients with $p16^{INK4A}$ methylation
RC	30	5 (16%)	0
RAEB	9	5 (55%)	2 (22%)
RAEB-t	8	5 (62%)	2 (25%)
Total	47	15 (32%)	4 (8%)

MDS, myelodysplastic syndrome; RC, refractory cytopenia; RAEB, refractory anemia with excess of blasts; RAEB-t, refractory anemia with excess of blasts in transformation.

Table II. Correlation of $p15^{INK4B}$ and $p16^{INK4A}$ gene methylation with clinical features.

Patient parameter	Status of methylation of $p15^{INK4B}$		Status of methylation of $p16^{INK4A}$		<i>p</i> -Value	
	Methylated (<i>n</i> = 15)	Non-methylated (<i>n</i> = 32)	Methylated (<i>n</i> = 4)	Non-methylated (<i>n</i> = 43)	$p15^{INK4B}$	$p16^{INK4A}$
Age					χ^2 no significance	χ^2 no significance
<12 years (children) (<i>n</i> = 29)	8	21	1	28		
≥12 years (adolescents) (<i>n</i> = 18)	7	11	3	15		
Sex					χ^2 no significance	χ^2 no significance
Male (<i>n</i> = 29)	7	22	2	27		
Female (<i>n</i> = 18)	8	10	2	16		
Cytogenetics					$\chi^2 p < 0.01$	χ^2 no significance
Normal (<i>n</i> = 17)	1	16	0	17		
Abnormal (<i>n</i> = 30)	14	16	4	26		
MDS subtypes					$\chi^2 p < 0.003$	$\chi^2 p < 0.05$
Initial subtype RC (<i>n</i> = 30)	5	25	0	30		
Advanced subtypes:	10	7	4	13		
RAEB (<i>n</i> = 9), RAEB-t (<i>n</i> = 8)						
Bone marrow blasts					$\chi^2 p \ll 0.001$	$\chi^2 p \ll 0.001$
<5%	5	25	0	30		
5–19%	5	4	2	7		
20–29%	5	3	2	6		
Evolution of disease (MDS→AML)					$\chi^2 p < 0.008$	$\chi^2 p < 0.05$
Yes (<i>n</i> = 17)	9	8	4	13		
No (<i>n</i> = 30)	6	24	0	30		

MDS, myelodysplastic syndrome; RAEB, refractory anemia with excess of blasts; RAEB-t, refractory anemia with excess of blasts in transformation; AML, acute myeloid leukemia.

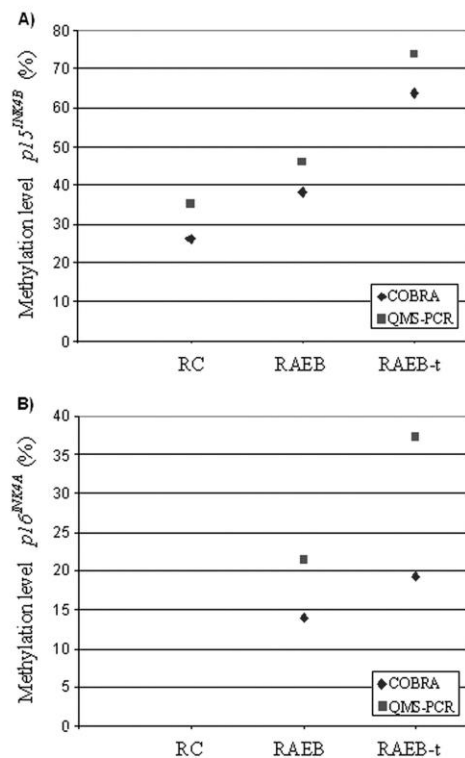


Figure 2. Distribution of methylation level (%) using COBRA and QMS-PCR in primary pediatric MDS: (A) in $p15^{INK4B}$ gene and (B) in $p16^{INK4A}$ gene.

promoter methylation status of 13 genes, including $p15^{INK4B}$, in 12 children with MDS, all patients with more advanced stages of disease (RAEB and RAEB-t), also using the MSP method [16]. They detected 50% methylation in the $p15^{INK4B}$ gene. The authors suggested that aberrant methylation in pediatric MDS seems to be similar to that in adult MDS [16]. In the present work, we analyzed the methylation status of $p15^{INK4B}$ and $p16^{INK4A}$ genes qualitatively (MSP and sequencing methods) and quantitatively (COBRA and QMS-PCR) in 47 children with primary MDS. We observed a higher incidence of methylation in the $p15^{INK4B}$ gene at 32% (15/47) than in the $p16^{INK4A}$ gene at 8% (4/47). Interestingly, two patients had aberrant methylation in the two genes simultaneously. It is important to highlight that in our study we included a larger cohort of pediatric patients with MDS, including 30 patients with the initial stage of disease (RC) and 17 with advanced stages of MDS (nine with RAEB and eight with RAEB-t). We found a statistical significance

for the presence of methylation of the $p15^{INK4B}$ gene in the advanced stages (RAEB and RAEB-t) compared with the initial stage of primary MDS (RC) ($p < 0.003$). Among 30 children with the RC subtype, none presented $p16^{INK4A}$ methylation, and among 17 children with later stages of disease (RAEB and RAEB-t), four presented methylation of $p16^{INK4A}$. Thus it seems that, although rare, aberrant methylation in the $p16^{INK4A}$ gene is more frequently found in subtypes that characterize the advanced stages of MDS ($p < 0.05$).

Recently, Jiang and colleagues showed that aberrant DNA methylation is the dominant mechanism for tumor suppressor gene silencing and clonal variation in MDS evolution to AML [26]. The present study is the first correlating the methylation status of $p15^{INK4B}$ and $p16^{INK4A}$ genes in pediatric primary MDS and evolution of the disease. Analyzing our results, the association of $p15^{INK4B}$ methylation status with evolution of the disease was highly significant ($p < 0.008$). Statistical analysis also suggested that the presence of $p16^{INK4A}$ gene methylation was related to evolution of the disease ($p < 0.05$). We observed a direct correlation of the level of methylation in $p15^{INK4B}$ and $p16^{INK4A}$ in pediatric MDS and the percentage of bone marrow blasts ($p < 0.0001$). This suggests that proliferation of the MDS clone and its evolution toward AML requires escape from the G1 phase of the cell cycle, and aberrant methylation of $p15^{INK4B}$ and $p16^{INK4A}$ genes seems to play an important role in this process. This observation was also made by Quesnel and colleagues for methylation of the $p15^{INK4B}$ gene in adult patients with MDS [12]. Therefore, our results suggest that the methylation of $p15^{INK4B}$ and $p16^{INK4A}$ is a possible epigenetic biomarker of disease evolution. It also seems that these epigenetic alterations in pediatric patients with MDS, as in adult patients, are later events associated with the leukemogenesis process in MDS.

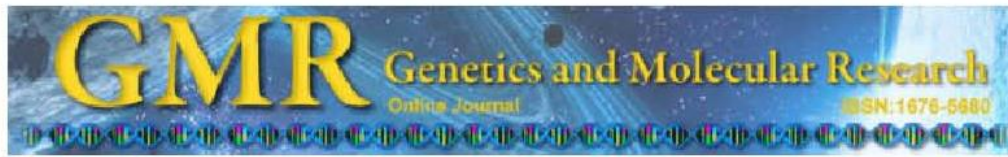
Declaration of interest: This work was supported by Brazilian Ministry of Health (National Institute of Cancer/INCA, Brazil) and Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro/FAPERJ, Brazil (E-26/102.235/2009).

References

1. Nimer SD. Myelodysplastic syndromes. *Blood* 2008;111:4841–4851.
2. Niemeyer CM, Baumann I. Myelodysplastic syndrome in children and adolescents. *Semin Hematol* 2008;45:60–70.
3. Elghetany MT. Myelodysplastic syndromes in children: a critical review of issues in the diagnosis and classification of 887 cases from 13 published series. *Arch Pathol Lab Med* 2007;131:1110–1116.

4. Hasle H, Niemeyer CM, Chessels JM, et al. A pediatric approach to the WHO classification of myelodysplastic and myeloproliferative diseases. *Leukemia* 2003;17:277-282.
5. Polychronopoulou S, Panagiotou JP, Kossiva L, Mavrou A, Anagnostou D, Haidas S. Clinical and morphological features of paediatric myelodysplastic syndromes: a review of 34 cases. *Acta Paediatr* 2004;93:1015-1023.
6. Paluszczak J, Baer-Dubowska W. Epigenetic diagnostics of cancer - the application of DNA methylation markers. *J Appl Genet* 2006;47:365-375.
7. Mulero-Navarro S, Esteller M. Epigenetic biomarkers for human cancer: the time is now. *Crit Rev Oncol Hematol* 2008;68:1-11.
8. Herman JG, Civin CI, Issa JP, Collector MI, Sharkis SJ, Baylin SB. Distinct patterns of inactivation of p15^{INK4B} and p16^{INK4A} characterize the major types of hematological malignancies. *Cancer Res* 1997;57:837-841.
9. Toyota M, Koepeck KJ, Toyota MO, Jair KW, Willman CL, Issa JP. Methylation profiling in acute myeloid leukemia. *Blood* 2001;97:2823-2829.
10. Shimamoto T, Ohyashiki JH, Ohyashiki K. Methylation of p15^{INK4B} and E-cadherin genes is independently correlated with poor prognosis in acute myeloid leukemia. *Leuk Res* 2005;29:653-659.
11. Serrano M, Lee H, Chin L, Cordon-Cardo C, Beach D, DePinho RA. Role of the INK4a locus in tumor suppression and cell mortality. *Cell* 1996;85:27-37.
12. Quesnel B, Guillermin G, Vereecque R, et al. Methylation of the p15^{INK4B} gene in myelodysplastic syndromes is frequent and acquired during disease progression. *Blood* 1998;8:2985-2990.
13. Tien HF, Tang JL, Tsay W, et al. Methylation of the p15^{INK4B} gene in myelodysplastic syndrome: it can be detected early or during disease progression and is highly associated with leukaemic transformation. *Br J Haematol* 2001;112:148-154.
14. Aggerholm A, Holm MS, Guldborg P, Olesen LH, Hokland P. Promoter hypermethylation of p15^{INK4B}, HIC1, CDH1 and ER is frequent in myelodysplastic syndrome and predicts poor prognosis in early-stage patients. *Eur J Haematol* 2006;76:23-32.
15. Hasegawa D, Manabe A, Kubota T, et al. Methylation status of the p15 and p16 genes in paediatric myelodysplastic syndrome and juvenile myelomonocytic leukaemia. *Br J Haematol* 2005;128:805-812.
16. Vidal DO, Paixão VA, Brait M, et al. Aberrant methylation in pediatric myelodysplastic syndrome. *Leuk Res* 2007;31:175-181.
17. Herman J, Graff JR, Myöhänen S, Nelkin BD, Baylin SB. Methylation-specific PCR: a novel PCR assay for methylation status of CpG islands. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996;93:9821-9826.
18. Xiong Z, Laird PW. COBRA: a sensitive and quantitative DNA methylation assay. *Nucleic Acids Res* 1997;25:2532-2534.
19. Brakensiek K, Länger F, Schlegelberger B, Kreipe H, Lehmann U. Hypermethylation of the suppressor of cytokine signalling-1 (SOCS-1) in myelodysplastic syndrome. *Br J Haematol* 2005;130:209-217.
20. Uchida T, Kinoshita T, Nagai H, et al. Hypermethylation of the p15^{INK4B} gene in myelodysplastic syndromes. *Blood* 1997;90:1403-1409.
21. Solomon PR, Munirajan AK, Tsuchida N, et al. Promoter hypermethylation analysis in myelodysplastic syndromes: diagnostic and prognostic implications. *Indian J Med Res* 2008;127:52-57.
22. Flotho C. Is childhood MDS an epigenetic disease? *Leuk Res* 2007;31:743.
23. Sheng XM, Kawamura M, Ohnishi H, et al. Mutations of the RAS genes in childhood acute myeloid leukemia, myelodysplastic syndrome and juvenile chronic myelocytic leukemia. *Leuk Res* 1997;21:697-701.
24. Fernandez TS, Menezes J, Silva MLM, Tabak D, Abdelhay E. Correlation of N-ras point mutations with specific chromosomal abnormalities in primary myelodysplastic syndrome. *Leuk Res* 1998;22:125-134.
25. Jeki B, Novakovic I, Lukovic L, et al. Low frequency of NRAS and KRAS2 gene mutations in childhood myelodysplastic syndromes. *Cancer Genet Cytogenet* 2004;154:180-182.
26. Jiang Y, Dunbar A, Lukasz P, et al. Aberrant DNA methylation is a dominant mechanism in MDS progression to AML. *Blood* 2009;113:1315-1325.

APÊNDICE F - Accurate monitoring of promoter gene methylation with high-resolution melting polymerase chain reaction using the *ABCB1* gene as a model (artigo publicado).



Accurate monitoring of promoter gene methylation with high-resolution melting polymerase chain reaction using the *ABCB1* gene as a model

A.L. Mencalha^{1,2}, E.F. Rodrigues¹, E. Abdelhay¹ and T.S. Fernandez¹

¹Centro de Estudos de Medula Óssea, Instituto Nacional de Câncer, Rio de Janeiro, RJ, Brasil

²Departamento de Biofísica e Biometria, Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ, Brasil

Corresponding authors: A.L. Mencalha / T.S. Fernandez
E-mail: amencalha@inca.gov.br / teresafernandez@inca.gov.br

Genet. Mol. Res. 12 (1): 714-722 (2013)

Received August 21, 2012

Accepted December 21, 2012

Published March 11, 2013

DOI <http://dx.doi.org/10.4238/2013.March.11.20>

ABSTRACT. Multidrug resistance is the major cause of cancer chemotherapy failure. This phenotype is mainly due to the overexpression of the human *ABCB1* gene. Several studies have shown that the transcriptional regulation of this gene is complex. Yet, the impact of this transcriptional regulation has not been well studied in a clinical setting. The acquired expression of *ABCB1* is associated with the genomic instability of cancer cells. This includes the occurrence of mutational events that alter chromatin structures through epigenetic modifications such as promoter methylation. Therefore, it is important to introduce new clinical methods to monitor the methylation status of *ABCB1* and determine its association with gene expression in order to be able to predict response to therapies. The high-resolution melting (HRM) method has emerged as a highly accurate and sensitive

method to quantify methylation status at specific sites of DNA. Here, we established HRM parameters to evaluate the promoter methylation status of the *ABCBI* gene. Our study is the first to standardize the HRM dissociation curve to evaluate *ABCBI* gene methylation. The association between *ABCBI* methylation status and gene expression in established cancer cell lines shows that this method is accurate and reliable.

Key words: *ABCBI*; HRM-PCR; Methylation; Epigenetics

INTRODUCTION

ATP-binding cassette (ABC) transporter family genes function through a common mechanism to drive multidrug resistance (MDR). Among them is the *ABCBI* gene, also known as *MDR-1*, which encodes a P-glycoprotein (Pgp) that it is universally accepted as a drug resistance biomarker (Ueda et al., 1987; Wise, 2012). Pgp is a trans-membrane protein that is responsible for the active efflux of anticancer drugs from cells (Ueda et al., 1987). In cancer cells, Pgp is frequently overexpressed (Goldie and Coldman, 1984). Primary or acquired overexpression of *ABCBI* is the major cause of resistance to chemotherapy and is associated with reduced patient survival (Abolhoda et al., 1999). The overexpression of the *ABCBI* gene is negatively correlated with disease prognosis and quality of life (Baker et al., 2005). Therefore, strategies to overcome drug resistance have been actively sought for years. However, currently, no efficient clinical solutions exist to counter drug resistance.

The acquired expression of *ABCBI* is associated with the genomic instability of cancer cells. This includes mutational events that alter chromatin structures and cause gene rearrangements and mutations in tumor suppressor proteins like *P53* (Kuo et al., 1994). In addition, epigenetic modifications of the *ABCBI* proximal and upstream promoters, either through DNA demethylation or through histone H3 acetylation, play a pivotal role in inducing *ABCBI* expression (Chen and Sikic, 2012). Therefore, a better understanding of *ABCBI* methylation status can improve the management of therapies in an effort to increase treatment efficacy.

The proximal promoter region directly upstream of the *ABCBI* transcription start site contains several important consensus regulatory sequences, including CAAT motifs and CpG islands, which are implicated in gene expression in response to different stimuli (Ueda et al., 1987; El-Osta et al., 2002). Several lines of evidence suggest that the methylation of the CpG dinucleotides in the *ABCBI* gene plays a major role in regulating its expression. The *ABCBI* gene-regulatory region extends from the start of exon 1 to a few base pairs upstream of the transcriptional start site (Baker et al., 2005). The up-regulation of *ABCBI* mRNA has been associated with the hypomethylation of the promoter region, whereas the down-regulation of *ABCBI* expression is associated with the hypermethylation of the CpG dinucleotides (Kantharidis et al., 1997; Nakayama et al., 1998; Kusaba et al., 1999). Although promoter methylation of *ABCBI* is associated with its expression level, no molecular methods have shown the relationship between the level of promoter methylation of this gene and gene expression.

In 2003, a highly sensitive method to identify a single nucleotide change in a specific DNA sequence was described (Wittwer et al., 2003). This method determines DNA changes based on the fine melting temperature properties of an amplicon of the sequence of interest. This method is called high-resolution melting (HRM). HRM requires specific thermocycler platforms and a

saturating DNA intercalating dye. This method has been used to quantify methylation in CpG islands (Wojdacz and Dobrovic, 2007). The difference between methylated and unmethylated DNA is determined by bisulfite sodium treatment. Whereas non-methylated cytosines are converted into uracil nucleotides upon bisulfite treatment and are substituted by thymidine nucleotides in polymerase chain reaction (PCR), the 5-methyl-cytosines are not converted, thus are read as cytosine. The cytosines in CpG dinucleotides cause differences in melting temperature between methylated and unmethylated DNA (Wojdacz and Dobrovic, 2007). Unlike other methods used for the quantification of methylation levels, HRM is faster, less expensive, highly accurate, and sensitive.

In the present study, we established a strategy to quantify DNA methylation using the HRM method. We used the *ABCB1* gene as a model because of its importance in the MDR phenotype. We first identified the CpG islands in the DNA upstream of the *ABCB1* gene and determined parameters to accurately quantify methylation status in this region by HRM. We also analyzed the association between the methylation status and the mRNA expression level of the *ABCB1* gene in different neoplastic cell lines. We observed an inverse correlation between the level of methylation and gene expression.

MATERIAL AND METHODS

Cell lines

The cell lines used in this study were as follows: the K562 cell line, established from a chronic myeloid leukemia patient in blast crisis; the DLD-1 cell line, established from colorectal adenocarcinoma; the Raji cell line, established from Burkitt's lymphoma; the HCC-1954 cell line, established from breast ductal carcinoma, and the MCF-7 cell line, isolated and established from breast cancer. The K562 and Raji cells were cultured in Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640 medium (Invitrogen, USA). The DLD-1, MCF-7, and HCC-1954 cells were cultured with Dulbecco's modified Eagle's medium (Invitrogen). All cultures were supplemented with 10% fetal bovine serum (Hyclone, USA), 100 U/mL penicillin (Invitrogen), and 100 mg/mL streptomycin (Invitrogen) and cultured at 37°C in 5% CO₂.

DNA sequence analysis

The *ABCB1* gene sequence was obtained from the National Center for Biotechnology Information (accession No. NG_011513). CpG islands were predicted using the online tool MethPrimer using default parameters (Li and Dahiya, 2002).

DNA extraction and bisulfite treatment

The cell lines were washed 3 times in 1X phosphate-buffered saline and subsequently the cell lysates were used for genomic DNA extraction using DNAzol (Invitrogen) according to the manufacturer protocol. A total of 2 µg genomic DNA was used for bisulfite modification using the Epiect Bisulfite kit (Qiagen, USA) according to manufacturer instructions. Reactions were performed in a 140-µL volume with 85 µL bisulfite mix and 35 µL DNA protection buffer. The thermal cycler conditions were: 5 min at 95°C, 25 min at 60°C, 5 min at 95°C, 85 min at 60°C, 5 min at 95°C, 75 min at 60°C, and a final hold at 20°C. After bisulfite conversion

was completed, the DNA was cleaned and eluted once in 20 μ L elution buffer. The DNA was either used immediately or stored at -70°C to avoid degradation.

High-resolution melting

PCR cycling was performed on the Rotor-Gene Q (Qiagen) HRM-enabled real-time PCR instrument. Primers were designed according to the principles of HRM from previous studies (Toyota et al., 2001; Wojdacz et al., 2009). PCR was performed in a final volume of 10 μ L, with 1 μ M of each primer, 10 ng bisulfite-converted DNA, and 1X EpiTect HRM Master Mix (Qiagen). The standard curve to quantify methylation percentages were established at 100, 75, 50, 25, 10, and 5% DNA methylation using the EpiTect control DNA set (Qiagen). PCR cycling was carried out as follows: initial denaturation at 95°C for 10 min, followed by 45 cycles of 45 s at 95°C , 45 s at 60°C , and 45 s at 72°C . After amplification, the PCR product was pre-heated for 90 s at 60°C followed by the HRM step, which involved gradually increasing the incubation temperature from 65° to 90°C at a rate of $0.1^{\circ}\text{C}/\text{s}$ and holding for 2 s after each stepwise increment. Melting curves from methylated and unmethylated DNA controls were normalized by selecting the "line of best fit" between 2 normalization regions selected before and after obtaining the raw data of the dissociation curve to generate a better profile of methylation percentages (Wojdacz and Dobrovic, 2007). The HRM analyses were performed as previously described (Wojdacz et al., 2009). The *ABCBI* DNA promoter region was amplified using primers that include CpG islands from -19 bp to +146 bp from the transcription start site: *ABCBI*-HRM-forward: 5'-GTTATAGGAAGTTTGAGTTT-3' and *ABCBI*-HRM-reverse: 5'-AAAAACTATCCATAATAAC-3'.

Quantitative PCR (qPCR)

Changes in *ABCBI* mRNA levels were measured by qPCR. Total mRNA was obtained from all cell lines using the TRIzol reagent (Invitrogen) according to the manufacturer protocol. The mRNA was stored at -70°C . Two micrograms of total RNA was subjected to genomic DNA digestion with DNase, amplification grade I (Invitrogen) to remove genomic DNA contamination. The RNA was reverse transcribed to complementary DNA (cDNA) with the Superscript II Reverse Transcriptase (Invitrogen) and Oligo-dT18 (Invitrogen) kits. Reactions were performed in 10 μ L with a final concentration of 1X Rotor-Gene SYBR Green PCR Kit (Qiagen). Forward and reverse primers were used at a concentration of 0.5 μ M each and were mixed with 2.5 μ L 5-fold diluted cDNA. Reactions were carried out in a Rotor Gene Q thermocycler (Qiagen) with a hot-start stage step of 10 min at 95°C followed by 45 cycles of 20 s at 95°C , 30 s at 60°C , and 30 s at 72°C . The dissociation curve was used to determine PCR efficiency, specificity of amplification, and primer-dimer formation. β -actin mRNA levels were used as a reference for normalization. Sequences of the primers used are as follows: *ABCBI* forward: 5'-TCGTGCCCTTGTTAGACAG-3', *ABCBI* reverse: 5'-CATTCTGGATGGTGGACAGG-3', β -actin forward: 5'-TTCCTTCCCTGGGCATGGAGTC-3', and β -actin reverse: 5'-AGACAGCACTGTGTTGGCGTA-3'.

Statistical analyses

The significance of the DNA methylation percentage was determined by comparing

the differences between curve shapes for methylated and unmethylated DNA and it was estimated by principal component analysis using a set of DNA controls as the reference. Correlation analysis between methylation and mRNA levels was performed using the Pearson test with GraphPad Prism version 5 (GraphPad Software, Inc., USA).

RESULTS

Identification of CpG islands in the *ABCB1* gene and validation of the HRM method to analyze methylation status using the *ABCB1* gene as a model

We investigated the promoter region of the *ABCB1* gene to identify CpG islands using the MethPrimer online software. We focused on approximately 2000 bp, in which -1794 bp are from the transcription start site of *ABCB1* up to the first +205 bp in exon 1. In this region, we found a CpG island near the transcription start site in exon 1. According to the MethPrimer software, this island extends from nucleotides -182 to +146. Approximately 21 CpGs were identified in this predicted island. This result is shown in Figure 1.

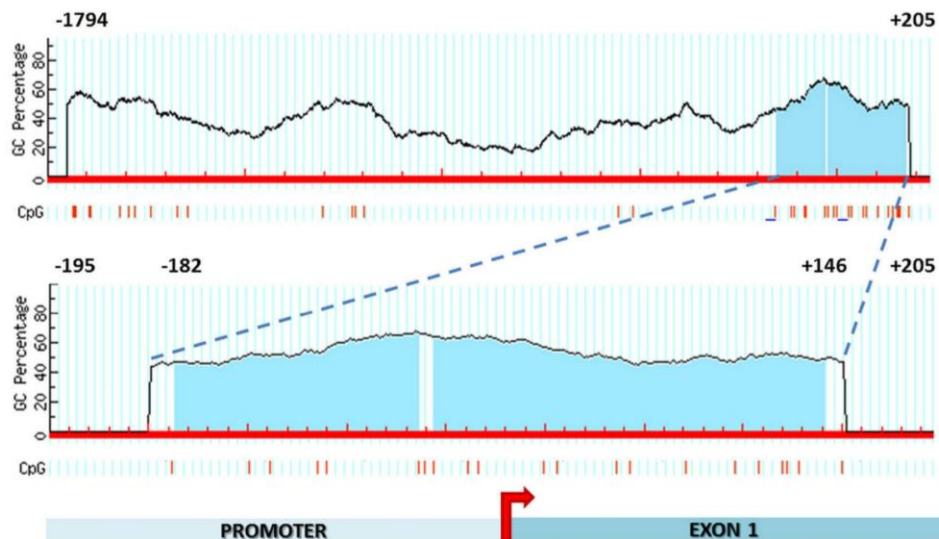


Figure 1. Determination of CpG island at 2000 bp (-1794 up to +205 bp) (upper panel) and 400 bp (-195 up to +205 bp) (lower panel) of DNA sequence near the *ABCB1* gene. Filled light blue areas indicate the predicted CpG island. The red fine bars under x-axis panels indicate the isolate CpG dinucleotide along the promoter *ABCB1* DNA region. Figure was adapted from the MethPrimer Software (Li and Dahiya, 2002).

To evaluate the association between the methylation status of the *ABCB1* gene and its mRNA level, we performed a paired analysis between the methylation percentage of *ABCB1* as determined by HMR and *ABCB1* mRNA expression as determined by qPCR analysis in established cell lines. The normalization and melting curves were generated with 100, 75, 50, 25, 10, 5, and 0% of methylated DNA. These results are shown in Figures 2 and 3. With this

standard curve, it is possible to estimate the percentage of *ABCBI* methylation in any cellular sample derived from human cell lines or directly from patients. Our HRM results showed that the K562 cells had a low percentage of *ABCBI* gene methylation, approximately 5%, and that the *ABCBI* downstream promoter was unmethylated in DLD-1 cells. On the other hand, the cell lines Raji, HCC-1954, and MCF-7 showed approximately 50, 50-75, and 75-100% *ABCBI* CpG island methylation, respectively. These results are shown in Figures 2 and 3.

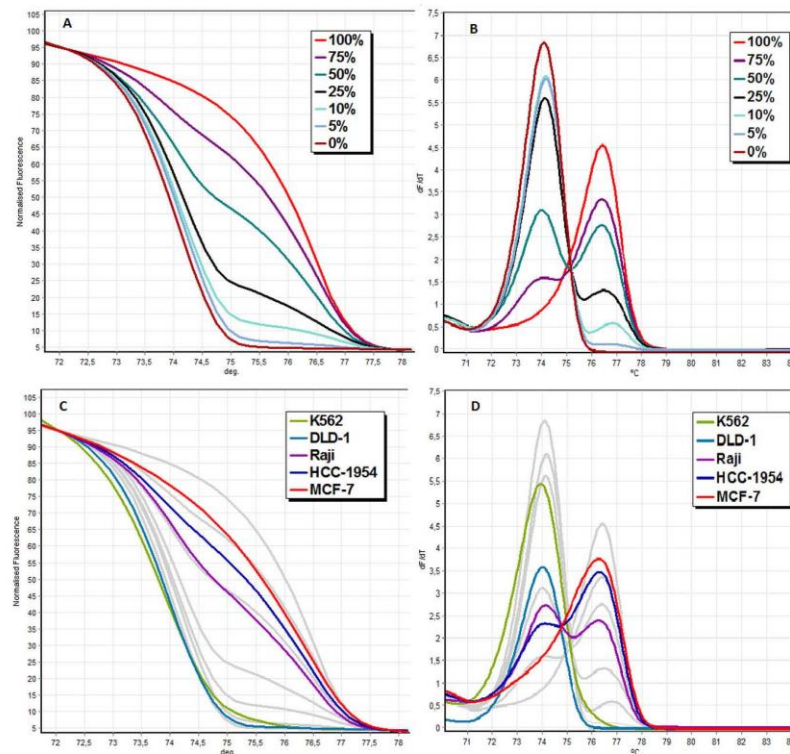


Figure 2. A. High-resolution melting analysis: normalized standard curves from 100, 75, 50, 25, 10, 5, and 0% methylation using DNA standard set. B. Dissociation curves from 100, 75, 50, 25, 10, 5, and 0% methylation using DNA standard set. C. and D. Methylation estimates of K562, DLD-1, Raji, HCC-1952, and MCF-7 cell lines are represented by colored curves and the standard DNA. In all panels the normalized and dissociation set curves from methylation DNA controls are represented in gray curves. Data were edited in TeeChart Office 2.0, Steema Software data.

The expression analyses by qPCR of the *ABCBI* gene in K562 and DLD-1 cells showed elevated mRNA levels in both cells: 9024 ± 555 and $13,113 \pm 577$ copies, respectively. However, the analysis of *ABCBI* mRNA expression in Raji, HCC-1954, and MCF-7 cells showed low levels of *ABCBI* mRNA: 842 ± 154 , 261 ± 27 , and 42 ± 7 copies, respectively. Pearson's correlation analysis, comparing the percentage of DNA methylation with mRNA expression levels in the cell lines, indicated a strong

inverse correlation (-0.945 , $P = 0.015$) between the two measures. These results are shown in Figure 3.

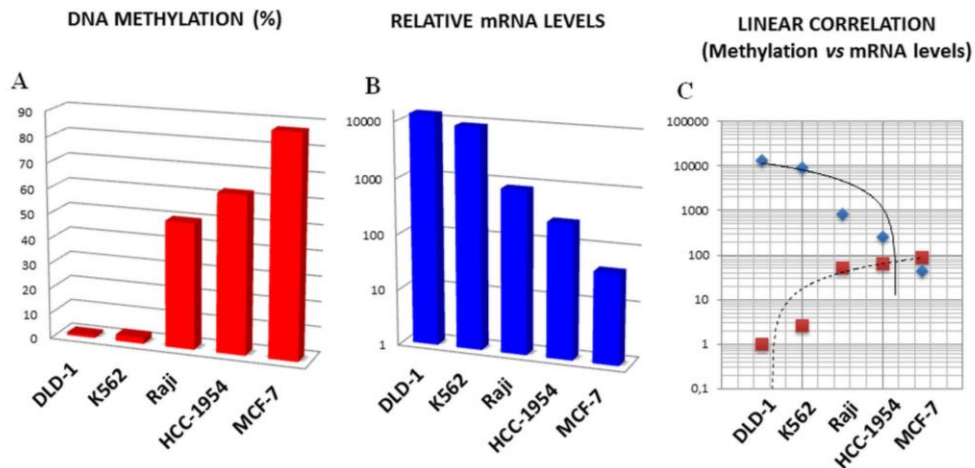


Figure 3. Comparison between the percent of *ABCB1* DNA promoter methylation and *ABCB1* mRNA relative levels. **A.** Methylation percentage. **B.** Relative units of mRNA level. **C.** Linear correlation between methylation versus mRNA levels. Squares and dotted line represent methylation data, and lozenges and continuous line represent mRNA level data. Data were analyzed and edited in GraphPad Prism version 5 and Excel Microsoft, 2010.

DISCUSSION

DNA methylation is responsible for controlling about 60% of transcription (Suzuki and Bird, 2008). This process is regulated by DNA methylation of the CpG islands that are frequently found near the transcription start site and in the first exon and first intron (Suzuki and Bird, 2008). Several studies have revealed the presence of CpG islands from the first intron of *ABCB1* to a few nucleotides upstream of the transcription start site (Nakayama et al., 1998). These DNA regions have been reported as targets of methylation (Jin and Scotto, 1998; Ando et al., 2000). Although a few studies have addressed the association between *ABCB1* methylation status and the expression of this gene, the precise mechanism of *ABCB1* gene expression regulation is not yet clear (Kantharidis et al., 1997; Nakayama et al., 1998; Toyota et al., 2001; Backer et al., 2005; Kim et al., 2009).

ABCB1 expression is frequently implicated in several pathologies, especially in cancer, as a hallmark of multidrug resistance. However, HRM has not yet been used to evaluate the percentage of methylation in this gene and the association of methylation percentage with gene expression. A previous study indicated that in K562 cells the *ABCB1* promoter region had lowly methylated or unmethylated DNA and that *ABCB1* gene expression was correlated to its methylation status (Ando et al., 2000). Additionally, DLD-1 cells also showed a correlation between the status of *ABCB1* gene methylation and gene expression (Kim et al., 2009). In MCF-7 cells, the *ABCB1* expression level was inversely correlated with the methylation

status of the *ABCBI* downstream promoter (Reed et al., 2010). Our results showed that the MCF-7 cell line had the highest percentage of DNA methylation among the cell lines that we studied and that it had low *ABCBI* expression. A previous study showed that the genome of the HCC-1954 cell line was predominantly hypomethylated with specific DNA regions being hypermethylated (Hon et al., 2012). There are no studies showing a correlation between the methylation status and expression of the *ABCBI* gene in the HCC-1954 cell line. However, our results suggest that the promoter region of the *ABCBI* gene is part of the region of the HCC-1954 genome that is hypermethylated and that this hypermethylation status is associated with low levels of *ABCBI* transcripts.

Our study is the first to standardize the HRM dissociation curve to evaluate *ABCBI* gene methylation status. The association between *ABCBI* methylation status and gene expression in established cancer cell lines shows that this method is accurate and reliable. This method can be used to study the MDR phenotype of different human samples, and can thus assist in the choice of therapeutic protocols used in patients with cancer or other diseases. Therefore, our HRM analysis is useful for determining *ABCBI* DNA methylation and for predicting *ABCBI* expression.

Conflict of interest

All authors declare no competing interests.

ACKNOWLEDGMENTS

Research supported by grants from Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro/FAPERJ (#E-26/102.235/2009), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico/CNPq (#478564/2011-2), and Instituto Nacional de Câncer/INCA.

REFERENCES

- Abolhoda A, Wilson AE, Ross H, Danenberg PV, et al. (1999). Rapid activation of MDR1 gene expression in human metastatic sarcoma after *in vivo* exposure to doxorubicin. *Clin. Cancer Res.* 5: 3352-3356.
- Ando T, Nishimura M and Oka Y (2000). Decitabine (5-Aza-2'-deoxycytidine) decreased DNA methylation and expression of *MDR-1* gene in K562/ADM cells. *Leukemia* 14: 1915-1920.
- Baker EK, Johnstone RW, Zalberg JR and El-Osta A (2005). Epigenetic changes to the MDR1 locus in response to chemotherapeutic drugs. *Oncogene* 24: 8061-8075.
- Chen KG and Siki BI (2012). Molecular pathways: regulation and therapeutic implications of multidrug resistance. *Clin. Cancer Res.* 18: 1863-1869.
- El-Osta A, Kantharidis P, Zalberg JR and Wolffe AP (2002). Precipitous release of methyl-CpG binding protein 2 and histone deacetylase 1 from the methylated human multidrug resistance gene (MDR1) on activation. *Mol. Cell Biol.* 22: 1844-1857.
- Goldie JH and Coldman AJ (1984). The genetic origin of drug resistance in neoplasms: implications for systemic therapy. *Cancer Res.* 44: 3643-3653.
- Hon GC, Hawkins RD, Caballero OL, Lo C, et al. (2012). Global DNA hypomethylation coupled to repressive chromatin domain formation and gene silencing in breast cancer. *Genome Res.* 22: 246-258.
- Jin S and Scotto KW (1998). Transcriptional regulation of the MDR1 gene by histone acetyltransferase and deacetylase is mediated by NF-Y. *Mol. Cell Biol.* 18: 4377-4384.
- Kantharidis P, El-Osta A, deSilva M, Wall DM, et al. (1997). Altered methylation of the human MDR1 promoter is associated with acquired multidrug resistance. *Clin. Cancer Res.* 3: 2025-2032.
- Kim SN, Kim NH, Lee W, Seo DW, et al. (2009). Histone deacetylase inhibitor induction of P-glycoprotein transcription

- requires both histone deacetylase 1 dissociation and recruitment of CAAT/enhancer binding protein beta and pCAF to the promoter region. *Mol. Cancer Res.* 7: 735-744.
- Kuo MT, Vyas RC, Jiang LX and Hittelman WN (1994). Chromosome breakage at a major fragile site associated with P-glycoprotein gene amplification in multidrug-resistant CHO cells. *Mol. Cell Biol.* 14: 5202-5211.
- Kusaba H, Nakayama M, Harada T, Nomoto M, et al. (1999). Association of 5' CpG demethylation and altered chromatin structure in the promoter region with transcriptional activation of the multidrug resistance 1 gene in human cancer cells. *Eur. J. Biochem.* 262: 924-932.
- Li LC and Dahiya R (2002). MethPrimer: designing primers for methylation PCRs. *Bioinformatics* 18: 1427-1431.
- Nakayama M, Wada M, Harada T, Nagayama J, et al. (1998). Hypomethylation status of CpG sites at the promoter region and overexpression of the human MDR1 gene in acute myeloid leukemias. *Blood* 92: 4296-4307.
- Reed K, Hembruff SL, Sprowl JA and Parissenti AM (2010). The temporal relationship between *ABCB1* promoter hypomethylation, *ABCB1* expression and acquisition of drug resistance. *Pharmacogenomics J.* 10: 489-504.
- Suzuki MM and Bird A (2008). DNA methylation landscapes: provocative insights from epigenomics. *Nat. Rev. Genet.* 9: 465-476.
- Toyota M, Koyanagi K, Toyota MO, Jair KW, et al. (2001). Methylation profiling in acute myeloid leukemia. *Blood* 97: 2823-2829.
- Ueda K, Pastan I and Gottesman MM (1987). Isolation and sequence of the promoter region of the human multidrug-resistance (P-glycoprotein) gene. *J. Biol. Chem.* 262: 17432-17436.
- Wise JG (2012). Catalytic transitions in the human MDR1 P-glycoprotein drug binding sites. *Biochemistry* 51: 5125-5141.
- Wittwer CT, Reed GH, Gundry CN, Vandersteen JG, et al. (2003). High-resolution genotyping by amplicon melting analysis using LCGreen. *Clin. Chem.* 49: 853-860.
- Wojdacz TK and Dobrovic A (2007). Methylation-sensitive high resolution melting (MS-HRM): a new approach for sensitive and high-throughput assessment of methylation. *Nucleic Acids Res.* 35: e41.
- Wojdacz TK, Borgbo T and Hansen LL (2009). Primer design versus PCR bias in methylation independent PCR amplifications. *Epigenetics* 4: 231-234.

ANEXO A – Termo de Consentimento do Comitê de Ética em Pesquisa



A(o): Dra. Teresa de Souza Fernandez Seixas
Pesquisador(a) Principal

Rio de Janeiro, 3 de maio de 2011.

Registro CEP nº 62/10 (Este nº. deve ser citado nas correspondências referentes a este estudo)
Título do Estudo: Estudo das Alterações Citogenéticas e Moleculares em Pacientes Adultos e Pediátricos com Síndrome Mielodisplásica Primária no Estado do Rio de Janeiro: Investigação de Biomarcadores de Diagnóstico e de Prognóstico

Prezado(a) Pesquisador(a),

Informo a composição do Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto Nacional de Câncer que analisou e aprovou o estudo acima especificado.

<i>Adriana Scheliga</i>	<i>Médica Oncologista Clínica HC I – Coordenadora</i>
<i>Alessandra Oliveira Marins</i>	<i>Enfermeira do Serv. de Pesq. Clínica - CGTC</i>
<i>Ana Lúcia Amaral Eisenberg</i>	<i>Médica Patologista – DIPAT</i>
<i>Ana Valéria Paranhos Miceli</i>	<i>Psicóloga do Serviço de Psicologia - HC I</i>
<i>André Marcelo Machado Soares</i>	<i>Teólogo / Filósofo Extra INCA</i>
<i>Carlos Henrique D Silva</i>	<i>Médico HC IV – Coordenador Substituto</i>
<i>Célia Helena Fernandes Costa</i>	<i>Enfermeira da Oncologia – HC I</i>
<i>Cláudio Gustavo Stefanoff</i>	<i>Coordenador do Laboratório do BNT - CGTC</i>
<i>Cristiano Guedes Duque</i>	<i>Médico Oncologista - HCI</i>
<i>Danielle Nogueira Ramos</i>	<i>Doutora em Epidemiologia e Bioestatística - CONPREV</i>
<i>Eliana Teixeira Maranhão</i>	<i>Fisioterapeuta do Serviço de Fisioterapia – HC I</i>
<i>Héilton Spindola Antunes</i>	<i>Dentista do Serviço de Pesquisa Clínica - CGTC</i>
<i>Ivan da Costa Marques</i>	<i>Matemático Extra INCA</i>
<i>Maria de Fátima Batalha de Menezes</i>	<i>Enfermeira da Divisão de Enfermagem – HC I</i>
<i>Michele Quarti</i>	<i>Enfermeira - Extra INCA</i>
<i>Paulo Alexandre Mora</i>	<i>Médico Oncologista - HCII</i>
<i>Rosane Vianna Jorge</i>	<i>Doutora em Química Biológica da Divisão de Farmacologia - CGTC</i>
<i>Urquilei dos Santos Pinheiro</i>	<i>Representante de Usuários – CES/RJ</i>
<i>Walter Esteves Piñeiro</i>	<i>Advogado Extra INCA</i>
<i>Wilza Barbosa Felipe</i>	<i>Enfermeira da Comissão de Infecção Hospitalar - HC III</i>

Atenciosamente,

Dr. Carlos Henrique D. Silva
Coordenador Substituto do Comitê de Ética em Pesquisa
CEP-INCA

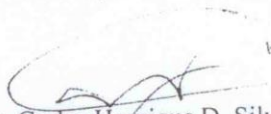


DECLARAÇÃO

Registro CEP nº 62/10 (Este nº. deve ser citado nas correspondências referentes a este estudo)
Título do Estudo: Estudo das Alterações Citogenéticas e Moleculares em Pacientes Adultos e Pediátricos com Síndrome Mielodisplásica Primária no Estado do Rio de Janeiro: Investigação de Biomarcadores de Diagnóstico e de Prognóstico

Declaro que o Comitê de Ética em Pesquisa do INCA concorda com as normas de Boas Práticas Clínicas (Good Clinical Practices – GCP/ICH) e cumpre os termos da Resolução 196 de dezembro de 1996 e da Resolução 251 de agosto de 1997.

Rio de Janeiro, 3 de maio de 2011.


Dr. Carlos Henrique D. Silva
Coordenador Substituto do Comitê de Ética em Pesquisa
CEP-INCA

ANEXO B - Prêmio Newton Freire-Maia de melhor trabalho na área de Genética e Evolução Humana e Genética



57^o Congresso Brasileiro de
GENÉTICA

30 de agosto a 2 de setembro de 2011 - Águas de Lindóia - SP
Centro de Convenções do Hotel Monte Real Resort

Certificado

A Sociedade Brasileira de Genética concede a ELIANE FERREIRA RODRIGUES o Prêmio Newton Freire-Maia de melhor trabalho na área de GENÉTICA E EVOLUÇÃO HUMANA E GENÉTICA MÉDICA, intitulado "CYTOGENETIC AND EPIGENETIC ALTERATIONS IN PEDIATRIC PRIMARY MYELODYSPLASTIC SYNDROME ", autoria de RODRIGUES, EF, SANTOS-REBOUÇAS, CB, PIMENTEL, MMG, MENCALHA, AL, DOBBIN, J, COSTA, ES, FERNANDEZ, CS, BOUZAS, LF, ABDELHAY, E, FERNANDEZ, TS, apresentado durante o 57º CONGRESSO BRASILEIRO DE GENÉTICA, em Águas de Lindóia - SP, período de 30 de agosto a 2 de setembro de 2011

Patrocinador: Profa. Dra. Eleidi Alice Chautard Freire Maia

GH096


Carlos Frederico Martins Menck
Presidente da SBG


Sociedade Brasileira de Genética


Eucléia Primo Bettioli Contel
1ª Secretária da SBG