



DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS DA VIDA

FACULDADE DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA
UNIVERSIDADE DE COIMBRA

Avaliação do perfil de metilação em Síndrome Mielodisplásica – Estudo comparativo entre sangue periférico e medula óssea

Joana Margarida Verdasca Jorge

2014



DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS DA VIDA

FACULDADE DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA
UNIVERSIDADE DE COIMBRA

**Avaliação do perfil de metilação em
Síndrome Mielodisplásica – Estudo
comparativo entre sangue periférico e
medula óssea**

Joana Margarida Verdasca Jorge

2014



DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS DA VIDA

FACULDADE DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA
UNIVERSIDADE DE COIMBRA

**Avaliação do perfil de metilação em
Síndrome Mielodisplásica – Estudo
comparativo entre sangue periférico e
medula óssea**

Dissertação apresentada à Universidade de Coimbra para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Bioquímica, realizada sob a orientação científica da Professora Doutora Ana Bela Sarmiento Ribeiro e da Professora Doutora Paula Veríssimo (Universidade de Coimbra).

Joana Margarida Verdasca Jorge

2014

III

Agradecimentos

Embora sendo um trabalho individual, a realização desta dissertação seria impossível sem a colaboração de diversas pessoas e instituições, que tornaram possível a execução de toda a investigação necessária, para a conclusão do meu Mestrado. É, por isso, de extrema importância reconhecer e agradecer toda a ajuda que me foi disponibilizada.

Em primeiro lugar à minha orientadora Professora Ana Bela Sarmiento Ribeiro pela orientação neste projeto e pelo apoio prestado ao longo de todo o trabalho, pelos conselhos e críticas sempre construtivas. À Professora Paula Veríssimo pelo apoio e disponibilidade ao longo de todo o mestrado.

À Mestre Ana Cristina Gonçalves pela enorme disponibilidade e dedicação, pela partilha de conhecimentos e pela motivação, e principalmente pela ajuda em toda a vertente experimental deste projeto.

À Dr. Emília Cortesão, e ao Serviço de Hematologia do Centro Hospitalar da Universidade de Coimbra, por generosamente facultarem todas amostras de doentes e toda a informação necessária.

Às colegas do Laboratório de Biologia Molecular Aplicada da Faculdade de Medicina, em especial à Raquel pelos conselhos e pela ajuda, pelo incentivo e pelas conversas que animaram os nossos dias de trabalho, e à Cátia pelo apoio e toda a ajuda, e a todos os investigadores e colaboradores.

À Ana, colega e amiga, pelo apoio incondicional e pelas palavras de encorajamento que muito me incentivaram, e por toda a ajuda na realização deste trabalho, sem ela não seria possível.

Às colegas de Mestrado, em especial à Ana Beatriz, à Mariana, à Laura e à Catarina, por partilharem comigo estes anos de muito trabalho, mas também de muitos cafezitos e boas conversas, sem vocês não seria a mesma coisa.

A todos aqueles com quem partilhei bons momentos e que fizeram da minha passagem por Coimbra, a cidade dos Estudantes, uma experiência que, com certeza,

jamais esquecerei.

Por último, mas não menos importante, um agradecimento muito especial aos meus pais pelo apoio incondicional, por acreditarem sempre nas minhas capacidades e no meu valor e pela palavra sempre positiva que têm para me dar, sem eles este trabalho jamais poderia ser possível

À minha irmã, a melhor do mundo, pelo apoio e incentivo, por todos os momentos de descontração que me alegraram em dias mais difíceis, e por partilhar comigo toda esta experiência.

Um grande Obrigado a todos...

Resumo

A Síndrome Mielodisplásica (SMD) consiste num grupo heterogéneo de doenças clonais da célula estaminal hematopoiética essencialmente caracterizado por displasia morfológica, citopenias periféricas com medula hipercelular, e uma hematopoiese ineficaz resultado de um excesso de apoptose e uma anormal proliferação de blastos na medula óssea. Estes doentes apresentam uma elevada probabilidade de evolução para leucemia aguda, nomeadamente para Leucemia Mieloide Aguda (LMA).

A alteração que desencadeia esta doença não é conhecida, mas pensa-se que terá origem numa célula estaminal hematopoiética com elevada suscetibilidade a alterações genéticas e/ou epigenéticas que induzem alterações na proliferação, diferenciação e sobrevivência, culminando na evolução do clone maligno.

Os mecanismos envolvidos na patogénese de SMD são ainda, na sua maioria desconhecidos. No entanto, sabe-se que envolvem alterações em genes fundamentais no processo hematopoiético, que regulam a maturação e proliferação celular, o ciclo celular, a reparação do ADN e a apoptose. Um dos mecanismos fortemente associado à patogénese da SMD é a metilação do ADN, que demonstrou ser responsável pelo silenciamento de genes essenciais ao funcionamento celular normal, nomeadamente de genes supressores tumorais, que se sabe estarem transcricionalmente silenciados, em consequência da metilação das suas regiões promotoras. Os padrões de metilação aberrante são mecanismos extremamente comuns nas mais variadas neoplasias humanas, nomeadamente em doenças hematológicas, e sabe-se estarem associados ao início do desenvolvimento tumoral bem como na sua progressão.

Os grupos metilos necessários ao processo de metilação podem ter origem em vias metabólicas que envolvem produtos da dieta, nomeadamente o folato e a vitamina B12. Estas vitaminas são elementos chave no metabolismo do carbono, responsável não só pela produção de moléculas necessárias para a síntese e reparação do ADN, mas também pela manutenção dos níveis de S-adenosilmetionina (SAM), o principal dador de grupos metilo endógeno na maioria das reações de metilação, incluído a metilação do ADN.

A avaliação do perfil de metilação de ADN pode ser efetuada em diferentes tipos de amostras biológicas, nomeadamente em sangue periférico, medula óssea e tecido tumoral. A utilização de amostras de sangue periférico poderá constituir uma forma não-invasiva de análise de marcadores tumorais com elevado potencial clínico, nomeadamente na avaliação do tratamento com agentes hipometilantes. Apesar da avaliação do perfil de metilação em leucócitos do sangue periférico já ser utilizado como marcador tumoral em alguns tumores sólidos, como no cancro colorectal, o seu significado clínico em neoplasias hematológicas permanece desconhecido.

Os objetivos deste trabalho foram avaliar o perfil de metilação de genes supressores tumorais e de recetores de morte em amostras de sangue periférico e de medula óssea de doentes com SMD, relacionando-os com os subtipos e com os grupos de risco. Além disso, avaliámos o envolvimento do folato e da vitamina B12 na metilação do ADN, correlacionando-os com os dados obtidos.

Para tal, analisamos o perfil de metilação de genes supressores tumorais (*p15*, *p16*, *p53*, *DAPK* e *MGMT*) e de recetores de morte (*TRAIL DcR1*, *TRAIL DcR2*, *TRAIL DR4* e *TRAIL DR5*) em ADN genómico de amostras de sangue periférico (SP) e de medula óssea (MO) de 82 doentes com SMD *de novo*, colhidas aquando do diagnóstico, e de 14 controlos não neoplásicos. A análise foi efetuada após a modificação do ADN genómico pelo método do bissulfito, utilizado a *Polymerase Chain Reaction* (PCR) específica de metilação (MS-PCR).

Os doentes apresentam uma mediana de idade de 76 anos (22-92), com um *ratio* Masculino/Feminino de 40/42. Os subtipos segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS) são CRDU (n=10), ARSA/CRDM-SA (n=8), CRDU (n=41), AREB-1 (n=5), AREB-2 (n=9), SMD/NMP (n=8) e 5q- (n=1). De acordo com o *International Prognostic Scoring System* (IPSS) são: baixo (n=12), intermédio-1 (n=42) e intermédio-2 (n=9).

Os nossos resultados indicam que 88,6% das amostras de SP e 61,5% das amostras de MO dos doentes com SMD apresentam metilação do gene *p15*, e que 22,7% das amostras de SP e 21,8% das de MO apresentam metilação do gene *p16*. O gene *DAPK* encontra-se metilado em 59,1% das amostras de SP e em 66% das amostras de MO. Os genes *TRAIL DcR1* e *TRAIL DcR2* apresentam metilação em 11,4% e 18,2% das amostras de SP, e em 8% e 16% das amostras de MO, respetivamente. O gene *TRAIL DR4* apresenta-se metilado em 15,9% das amostras de SP e em 24% das de MO.

Por último, 29,5% das amostras de SP e 28% das amostras de MO apresentam metilação do gene *TRAIL DR5*. Nenhuma das amostras de doentes ou controlos apresentou metilação dos genes *p53* e *MGMT*. De um modo geral, observa-se que 97,7% e 83,3% das amostras de SP e de MO dos doentes, respetivamente, apresentam metilação de pelo menos um gene, e 79,5% e 56,4% apresentam mais de dois genes metilados. Além disso, a metilação dos genes estudados apresentam percentagens elevadas de concordância entre amostras de SP e MO (*p15*: 72,5%, *p16*: 77,5%, *DAPK*: 67,5%, *TRAIL DcR1*: 85%, *TRAIL DcR2*: 65%, *TRAIL DR4*: 62,5%), à exceção do gene *TRAIL DR5* (40%). No entanto, apenas os genes *DAPK* e *TRAIL DR5* apresentam resultados significativos ($p=0,04$ e $p=0,031$).

Todos os subtipos de SMD apresentam metilação dos vários genes. A metilação do gene *p16* encontra-se maioritariamente nos subtipos mais avançados (AREB-1 e AREB-2). Os genes *p15* e *DAPK* encontram-se metilados em todos os subtipos, verificando-se tendência para diminuição muito ligeira com a severidade da doença. A metilação dos genes que codificam os recetores de morte é também comum a todos os subtipos, à exceção do gene *TRAIL DR4* cuja metilação foi apenas observada em doentes dos subtipos menos agressivos (CDRU, ARSA e CRDM). Nos grupos do IPSS, verificamos haver metilação em todos os grupos de risco, no entanto, os grupos de risco baixo e intermédio parecem apresentar frequências de metilação ligeiramente superiores às do grupo intermédio-2.

A metilação dos genes varia de acordo com os níveis de folato e de vitamina B12, sendo que, de uma forma geral, os doentes com concentrações séricas de folato e de vitamina B12 de altas a elevadas apresentam maiores frequências de metilação. No entanto, este padrão varia entre os vários genes, e com o tipo de amostra em que a metilação foi analisada.

Os níveis de 5-metilcitosina (5-mC) são superiores em doentes com SMD ($8,4 \pm 4,9$) (%) quando comparados aos controlos ($1,4 \pm 0,518$). Os níveis de 5-mC variam com a concentração de folato, sendo que diminuem com o aumento da concentração do folato. No entanto, não se verificou uma relação direta entre os níveis de 5-mC e as concentrações de vitamina B12, uma vez que os níveis de 5mC não variam muito nos três grupos de doentes.

Assim, concluímos que a metilação aberrante é um evento bastante comum nos

doentes com Síndrome Mielodisplásica e pode estar relacionada com os subtipos da doença e com os grupos de risco do IPSS, confirmando o papel da metilação do ADN na patogénese desta doença. Os níveis séricos de folato e de vitamina B12 parecem estar relacionados com o perfil de metilação dos genes estudados, bem como com os níveis de 5-metilcitosina observados nos doentes com SMD. Além disso, existe uma correlação dos padrões de metilação dos vários genes entre as amostras de sangue periférico e as amostras de medula óssea dos doentes com SMD, sugerindo que o sangue periférico poderá eventualmente constituir um marcador periférico do *status* de metilação em doentes com SMD.

Palavras-Chave:

-  Síndrome Mielodisplásica
-  Metilação
-  Folato/vitaminaB12
-  Sangue periférico
-  Medula óssea

Abstract

Myelodysplastic Syndromes (MDS) are a heterogeneous group of hematopoietic stem-cell disorders characterized by dysplastic features, peripheral-blood cytopenias with hypercellular bone marrow and ineffective hematopoiesis due to excessive apoptosis and abnormal blast proliferation in bone marrow. These patients have high risk of disease progression toward leukemic progression, mainly to Acute Myeloid Leukaemia (AML).

The mechanism that triggers this disease is not known yet, but it probably originates from a hematopoietic stem-cell with high susceptibility to genetic and/or epigenetic changes that induce changes in cell proliferation, differentiation and survival that had an advantage growth to the malignant clone.

The mechanisms involved in the pathogenesis of MDS are not completely understood, but they involve key genes in hematopoiesis, that control cell proliferation and maturation, cell cycle, DNA repair and apoptosis. DNA methylation is one of the epigenetics processes more frequently associated with MDS pathogenesis and several genes, namely tumor suppressor genes, have been shown to be transcriptionally silenced in association with promoter methylation. Aberrant methylation is extremely common in all types of cancers, as well as in hematopoietic disorders, and has been associated with cancer initiation and progression.

The methyl groups necessary for methylation processes are derived from metabolic pathways that involves dietary products, mainly folate and vitamin B12. These vitamins are key elements in one-carbon metabolism which is responsible, not only for the production of molecules required for DNA synthesis and repair, but also for the maintenance of S-adenosylmethyonine (SAM) levels, the main methyl donor for DNA methylation.

There are several types of specimens from which DNA methylation pattern can be measured and evaluated. Blood-based specimens may be a potential source of noninvasive cancer biomarkers, mainly for evaluation of hypomethylating agents treatment. Blood leukocytes from patients with solid tumors, namely colorectal cancer, exhibit complex and distinct cancer-associated DNA methylation patterns, which might

be seen as epigenetic biomarkers with significant clinical potential. However, peripheral blood cell methylation profiles are largely unknown in hematopoietic cancers.

The aim of this work was to investigate the DNA methylation status of tumor suppressor genes (*p15*, *p16*, *p53*, *DAPK* and *MGMT*) and death receptors (*TRAIL DcR1*, *TRAIL DcR2*, *TRAIL DR4* and *TRAIL DR5*) of 82 MDS *de novo* patients at diagnosis in bone marrow (BM) and peripheral blood (PB) cells, and of 14 non-neoplastic patients. Genomic DNA was isolated by standard protocols and modified using sodium bisulfite followed by a methylation specific PCR.

The MDS patient group median age was 76 years (22-92), gender M/F=40/42, WHO subtypes: RCUD (n=10), RARS/RCMD-RS (n=8), RCMD (n=41), RAEB-1 (n=5), RAEB-2 (n=9), MDS/MNP (n=8) and 5q- (n=1) and IPSS: low (n=12), intermediate-1 (n=42) and intermediate-2 (n=9).

Our results showed that 88,6% of PB samples and 61,5% of BM presented *p15* gene methylated, 22,7% of PB and 21,8% of BM presented *p16* gene methylated, 59,1% of PB and 66% of BM presented *DAPK* methylated, 11,4% of PB and 18,2% of BM presented *TRAIL DcR1* methylated, 8% of PB and 16% of BM samples presented *TRAIL DcR2* methylated, 15,9% of PB and 24% of BM samples presented *TRAIL DR4* methylated and 29,5% of PB and 28% of BM samples presented *TRAIL DR5* methylated. None of patients presented *p53* and *MGMT* gene methylated. Overall, 97,7% of PB samples and 83,3% of BM samples from MDS patients presented at least one methylated gene, of these 79,5% of PB and 56,4% of BM samples presented two or more methylated genes.

Moreover, we observed concordant results between BM and PB in 72,5% of patients for *p15* gene, 77,5% for *p16* gene, 67,5% for *DAPK* gene ($p=0,04$), 85% patients for *TRAIL DcR1* gene, 65% for *TRAIL DcR2* gene, 62,5% for *TRAIL DR4* gene and in 40% patients for *TRAIL DR5* ($p=0,031$).

All MDS subtypes presented methylation in several genes. *p16* gene methylation is observed mainly in more aggressive subtypes (RAEB-1 and RAEB-2). *p15* and *DAPK* genes methylation was found in all disease subtypes, with a slight tendency to decrease with disease severity. Methylation of death receptors genes is common to all subtypes, except for *TRAIL DR4* gene which was only observed in less aggressive subtypes, RCUD,

RARS and RCMD. All IPSS groups presented methylation of several gene promoters, but low and intermediate-1 risk groups presented higher methylation frequencies.

Gene methylation varies with folate and vitamin B12 levels, patients with higher levels of folate and vitamin B12 presented higher methylation frequencies. But this pattern varies between genes, and changes in the two types of samples, peripheral blood and bone marrow.

MDS patients also presented higher levels of 5-methylcytosine ($8,4 \pm 4,9$) (%) compared with non-neoplastic patients ($1,4 \pm 0,518$) but without any statistical significance. The 5-mC level varies with folate concentration, being reduced in patients with high levels of folate. There is no direct association between 5-mC level and vitamin B12, once this level don't varies between the three groups of patients with different vitamin B12 concentrations.

Our results show that aberrant methylation seems to be a common event in MDS patients and could be related with MDS subtypes and group risk, which suggests an important role of DNA methylation in MDS pathogenesis. Moreover, folate and vitamin B12 might be associated with DNA methylation status of the genes studied, as well as with 5-methylcytosine levels seen in MDS patients. We also observed a correlation between gene methylation patterns between peripheral blood and bone marrow aspirate suggesting that peripheral blood may possibly be a peripheral marker of methylation status in patients with MDS.

Key words

-  Myelodysplastic Syndrome
-  Methylation
-  Folate/Vitamin B12
-  Peripheral Blood
-  Bone Marrow

Índice

Resumo	VII
Abstract	XI
Índice de Figuras	XVII
Índice de Tabelas	XIX
Lista de abreviaturas	XXI
1. Introdução	1
1.1. Síndrome Mielodisplásica	3
1.1.1. Fatores de Risco	3
1.1.2. Sintomatologia e Diagnóstico	5
1.1.3. Classificação	6
1.1.4. Prognóstico	8
1.1.5. Patogénese	10
1.1.5.1. Alteração das vias de sinalização, do ciclo celular e da apoptose	12
1.1.5.2. Modificações epigenéticas	16
1.1.5.2.1. Relação da Síndrome Mielodisplásica e o metabolismo do folato e da vitamina B12	23
1.1.6. Tratamento	24
2. Objetivos	27
3. Materiais e Métodos	31
3.1. Estudos realizados nos doentes com Síndrome Mielodisplásica e nos controlos não-neoplásicos	33
3.1.1. Seleção e Caracterização dos doentes e controlos	33
3.1.2. Extração e quantificação do ADN genómico	33
3.1.3. Análise do perfil de metilação dos genes <i>p15</i> , <i>p16</i> , <i>DAPK</i> , <i>p53</i> , <i>MGMT</i> , <i>TRAIL DcR1</i> , <i>TRAIL DcR2</i> , <i>TRAIL DR4</i> e <i>TRAIL DR5</i>	34
3.1.3.1. Modificação do ADN com Bissulfito	34
3.1.3.2. <i>Methylation-Specific Polymerase Chain Reaction (MS-PCR)</i>	35
3.1.4. Avaliação dos níveis de metilação de 5-metilcitosina nos doentes com Síndrome Mielodisplásica	37

3.1.5. Análise estatística	37
4. Resultados	41
4.1. Caracterização dos doentes com Síndrome Mielodisplásica e dos controlos não neoplásico	41
4.2. Avaliação do perfil de metilação dos genes supressores tumorais e de recetores de morte em doentes com Síndrome Mielodisplásica	42
4.2.1. Avaliação do perfil de metilação dos genes <i>p15</i> , <i>p16</i> , <i>DAPK</i> , <i>TRAIL DcR2</i> , <i>TRAIL DR4</i> e <i>TRAIL DR5</i> de acordo com os subtipos SMD da classificação da Organização Mundial de Saúde	47
4.2.2. Relação entre o perfil de metilação dos genes <i>p15</i> , <i>p16</i> , <i>DAPK</i> , <i>TRAIL DcR2</i> , <i>TRAIL DR4</i> e <i>TRAIL DR5</i> e o índice de prognóstico <i>International Prognostic Scoring System</i> em doentes Síndrome Mielodisplásica	50
4.2.3. Análise dos níveis séricos de folato e a sua relação com o perfil de metilação	53
4.2.4. Análise dos níveis séricos de vitamina B12 e a sua relação com o perfil de metilação	55
4.2.5. Avaliação dos níveis de metilação de 5-metilcitosina em doentes com Síndrome Mielodisplásica	56
5. Discussão	61
5.1. Análise do perfil de metilação dos genes supressores tumorais e de recetores de morte de doentes com Síndrome Mielodisplásica	63
5.2. Análise comparativa do perfil de metilação dos genes supressores tumorais e de recetores de morte entre amostras de medula óssea e de sangue periférico de doentes com Síndrome Mielodisplásica	70
5.3. Análise do perfil de metilação e da sua relação com os níveis séricos de folato e Vitamina B12 nos doentes com Síndrome Mielodisplásica	72
6. Conclusão	79
7. Bibliografia	83

Índice de Figuras

Figura 1	Incidência anual da Síndrome Mielodisplásica com a idade	4
Figura 2	Mecanismos patofisiológicos envolvidos na Síndrome Mielodisplásica	11
Figura 3	Ciclo celular e mecanismos de controlo	13
Figura 4	Vias de sinalização apoptótica	14
Figura 5	Metilação da citosina	17
Figura 6	Metilação de ADN em células normais e células neoplásicas	18
Figura 7	Efeitos da metilação de ADN e da estrutura da cromatina na transcrição de genes em células normais e em células cancerígenas	19
Figura 8	Formação de S-Adenosilmetionina dependente de vitamina B12 e do metabolismo do Ácido Fólico	24
Figura 9	Caracterização da população de doentes com Síndrome Mielodisplásica de acordo com o sistema de classificação da Organização Mundial de Saúde.....	41
Figura 10	Caracterização da população de doentes com Síndrome Mielodisplásicas segundo o <i>International Prognostic Scoring System (IPSS)</i>	42
Figura 11	Gel de agarose representativo dos resultados obtidos por PCR-específico de metilação (MS-PCR) dos genes <i>p15</i> e <i>p16</i> em amostras de sangue periférico (SP) e de medula óssea (MO) de quatro dos doentes com Síndrome Mielodisplásica	43
Figura 12	Avaliação do perfil de metilação dos genes <i>p15</i> , <i>p16</i> , <i>p53</i> , <i>DAPK</i> , <i>MGMT</i> , <i>TRAIL DcR1</i> , <i>TRAIL DcR2</i> , <i>TRAIL DR4</i> e <i>TRAIL DR5</i> em amostras de medula óssea (MO) de indivíduos controlo (CTL) e de doentes com Síndrome Mielodisplásica (SMD).....	44
Figura 13	Avaliação do perfil de metilação dos genes <i>p15</i> , <i>p16</i> , <i>p53</i> , <i>DAPK</i> , <i>MGMT</i> , <i>TRAIL DcR1</i> , <i>TRAIL DcR2</i> , <i>TRAIL DR4</i> e <i>TRAIL DR5</i> em amostras de sangue periférico (SP) e de medula óssea (MO) de doentes com Síndrome Mielodisplásica (SMD)	44
Figura 14	Percentagem de concordância do perfil de metilação dos genes <i>p15</i> , <i>p16</i> , <i>DAPK</i> , <i>TRAIL DcR1</i> , <i>TRAIL DcR2</i> , <i>TRAIL DR4</i> e <i>TRAIL DR5</i> de amostras com resultados concordantes entre amostras de sangue periférico (SP) e de medula óssea (MO) de doentes com Síndrome Mielodisplásica (SMD)	45
Figura15	Frequência de metilação em amostras de sangue periférico (SP) e de medula óssea (MO) com metilação de pelo menos um dos genes metilados ou com dois ou mais genes metilados, em doentes com Síndrome Mielodisplásica (SMD) de acordo com o subtipo da Organização Mundial de Saúde	48
Figura 16	Avaliação do perfil de metilação dos genes <i>p15</i> , <i>p16</i> , <i>DAPK</i> e <i>TRAIL DcR2</i> em amostras de sangue periférico (SP) e de medula óssea (MO) de doentes com Síndrome Mielodisplásica de acordo com os subtipos definidos pela Organização Mundial de Saúde	49

Figura 17	Avaliação da do perfil de metilação dos genes <i>p15</i> , <i>p16</i> , <i>DAPK</i> , <i>TRAIL DcR2</i> , <i>TRAIL DR4</i> e <i>TRAIL DR5</i> nas amostras de sangue periférico (SP) e de medula óssea (MO) de doentes com Síndrome Mielodisplásica (SMD) de acordo com o <i>International Prognostic Scoring System</i> (IPSS).....	52
Figura 18	Análise do perfil de metilação dos genes <i>p15</i> , <i>p16</i> , <i>DAPK</i> , <i>TRAIL DcR1</i> , <i>TRAIL DcR2</i> , <i>TRAIL DR4</i> e <i>TRAIL DR5</i> em amostras de sangue periférico (SP) e de medula óssea (MO) de doentes com Síndrome Mielodisplásica distribuídos de acordo com os níveis séricos de Folato	54
Figura 19	Análise do perfil de metilação dos genes <i>p15</i> , <i>p16</i> , <i>DAPK</i> , <i>TRAIL DcR1</i> , <i>TRAIL DcR2</i> , <i>TRAIL DR4</i> e <i>TRAIL DR5</i> em amostras de sangue periférico (SP) e de medula óssea (MO) de doentes com Síndrome Mielodisplásica distribuídos de acordo com os níveis séricos de Vitamina B12.....	56
Figura 20	Percentagem de 5-metilcitocina (5mC) nas amostras controlo (CTL) e nas amostras de doentes com Síndrome Mielodisplásica (SMD).....	57
Figura 21	Relação entre a percentagem de 5-metilcitocina (5mC) e os subtipos de Síndrome Mielodisplásica definidos pela Organização Mundial de Saúde (OMS).....	57
Figura 22	Relação entre a percentagem de 5-metilcitocina (5mC) e os grupos de risco do <i>International Prognostic Scoring System</i> (IPSS) em doentes com Síndrome Mielodisplásica	58
Figura 23	Relação entre a percentagem de 5-metilcitocina (5mC) e os grupos de doentes com Síndrome Mielodisplásica definidos de acordo com as concentrações séricas de Folato	58

Índice de Tabelas

Tabela 1	Características do sangue periférico e da medula óssea nas várias categorias de Síndrome Mielodisplásica definidas pelo comitê da Organização Mundial de Saúde em 2008	8
Tabela 2	Sistema de <i>International Prognostic Scoring System</i> (IPSS) em Síndrome Mielodisplásica	9
Tabela 3	Genes hipermetilados em cancros esporádicos	21
Tabela 4	Alguns dos genes hipermetilados em Síndrome Mielodisplásica e suas respectivas frequências de metilação	22
Tabela 5	Sequência de <i>primers</i> específicos utilizados no MS-PCR	36
Tabela 6	Percentagem de concordância e número de amostras concordantes para o perfil de metilação dos genes <i>p15</i> , <i>p16</i> , <i>DAPK</i> , <i>TRAIL DcR1</i> , <i>TRAIL DcR2</i> , <i>TRAIL DR4</i> e <i>TRAIL DR5</i> em doentes com Síndrome Mielodisplásica com metilação na medula óssea	46
Tabela 7	Percentagem de amostras de sangue periférico (SP) e de medula óssea (MO) dos doentes com Síndrome Mielodisplásica com metilação de pelo menos um dos genes estudados (pelo menos 1) ou com metilação de dois ou mais genes (2 ou mais).....	46
Tabela 8	Percentagem de metilação de pelo menos um dos genes ou de dois ou mais genes em amostras de sangue periférico (SP) e de medula óssea (MO) nos doentes com Síndrome Mielodisplásica de acordo com o grupo risco do <i>International Prognostic Scoring System</i> (IPSS).....	51
Tabela 9	Distribuição dos doentes com Síndrome Mielodisplásica de acordo com os níveis séricos de Folato	53
Tabela 10	Distribuição dos doentes com Síndrome Mielodisplásica de acordo com os níveis séricos de Vitamina B12	55

Lista de Abreviaturas

5hmC	5-hidroximetilcitosina
5mC	5-metilcitosina
ADN	Ácido Desoxirribonucleico
Apaf-1	Ativador da Peptidase Apoptótica 1
APC	<i>Adenomatosis polyposis coli</i>
AR	Anemia Refratária
Ara-C	Citarabina
AREB-t	Anemia Refratária com Excesso de Blastos em transformação
AREB-1	Anemia Refratária com Excesso de Blastos-1
AREB-2	Anemia Refratária com Excesso de Blastos-2
ARN	Ácido Ribonucleico
ARSA	Anemia Refratária com Sideroblastos em Anel
AZA	Azacitidina
Bad	Bcl-2 antagonist of cell death
Bak	Bcl-2 homologous antagonist/killer
Bax	Bcl-2 associated X protein
BCL-2	<i>B-cell Lymphoma 2</i>
BRCA1	<i>Breast Cancer 1</i>
CDC	<i>Cell Division Control</i>
CDK	Cinase dependente de Ciclinas
CDKI	Inibidor de cinases dependentes de ciclinas
COBRA	<i>Combined Bisulfite Restriction Analysis</i>
CpG	Dinucleótido Citosina-fosfato-Guanina
CRI	Citopenia Refratária Infantil
DcR1	Recetor <i>decoy</i> 1
DcR2	Recetor <i>decoy</i> 2
DR4	Recetor de morte 4
DR5	Recetor de morte 5
CRCU	Citopenia Refratária com Displasia de Unilinhagem
CRDM	Citopenia Refratária com Displasia de Multilinhagens
CRDM-SA	Citopenia Refratária com Displasia de Multilinhagens com Sideroblastos em Anel
DAC	Decitabina
DAPK	<i>Death-Associated Protein Kinase</i>

DD	<i>Death Domain</i>
DISC	Death-inducing Signaling Complex
DKK	<i>Dickkopf</i>
DNMT	ADN metiltransferase
dNTP's	Desoxinucleótidos trifosfatos de adenina, guanina, citosina e timina
EPO	Eritropoietina Humana
ER- α	Recetor de estrogénio- α
FAB	Grupo Franco-Américo-Britânico
FADD	<i>Fas-associated Death Domain</i>
FAS	Tumor Necrosis Factor Receptor Superfamily member 6
FAS-L	Ligando FAS
FAS-R	Recetor FAS
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
<i>FHIT</i>	<i>Fragile histidine triad</i>
G-CSF	<i>Granulocyte Colony-Stimulating Factor</i>
G1	<i>Gap 1</i>
G2	<i>Gap 2</i>
HAT	Acetiltransferases das Histonas
HDAC	Desacetilases das histonas
hMLH1	human MutL Homolog 1
HPCE	Eletroforese Capilar de Alta Eficiência
HPLC	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
IMC	Índice de Massa Corporal
INF- γ	Interferão Gama
IAP	Proteínas Inibidoras da Apoptose
IPO	Instituto Português de Oncologia
IPSS	<i>International Prognostic Scoring System</i>
LLA	Leucemia Linfocítica Aguda
LMA	Leucemia Mielóide Crónica
LMMC	Leucemia Mielomonocítica Crónica
M	Mitose
mARN	ARN mensageiro
miARN	Micro ARN
MBP	Proteínas de ligação a metilcitosinas
MGMT	O ⁶ -Methylguanine-DNA methyltransferase gene

MS-PCR	<i>Methylation-Specific Polymerase Chain Reaction</i>
MTHFR	Metilenotetrahidrofolato Redutase
NR	Neutropenia Refratária
OMS	Organização Mundial de Saúde
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
R	Ponto de restrição
Rb	Retinoblastoma
S	Síntese
SAH	S-Adenosilcisteína
SAM	S-Adenosilmetionina
SMD	Síndrome Mielodisplásica
SMD-NC	Síndrome Mielodisplásica não-classificável
SMD/NMP	Síndrome Mielodisplásica/Neoplasia Mieloproliferativa
SFRP	<i>Secreted frizzled-related protein</i>
<i>TET2</i>	<i>Ten-eleven translocation 2 gene</i>
TGFβ	Fator de Crescimento Tumoral
THF	Tetrahidrofolato
TNF-α	Fator de necrose tumoral alfa
TR	Trombocitopenia Refratária
TRAIL	<i>TNF-related apoptosis ligand</i>
TRAIL-R	Recetor do TRAIL
VHL	von Hippel-Lindau gene
WPSS	<i>WHO classification-based prognostic scoring system</i>



1. Introdução

1.1. Síndrome Mielodisplásica

A Síndrome Mielodisplásica (SMD) é um grupo heterogêneo de doenças clonais da célula estaminal hematopoiética. Os doentes com SMD apresentam maturação e proliferação alterada das células estaminais hematopoiéticas que conduzem ao aparecimento de características displásicas numa ou mais linhagens celulares, sendo frequentemente acompanhada por hiperplasia medular e aumento da taxa de apoptose. Esta hematopoiese ineficaz resulta, na grande maioria dos casos, numa ou mais citopenias periféricas (Nikoloski & Reijden, 2012). Estes doentes apresentam ainda uma elevada probabilidade de evolução leucémica, nomeadamente para Leucemia Mielóide Aguda (LMA). O decurso natural desta síndrome é altamente variável, e pode ir desde uma fase crónica, que pode durar vários anos, até uma rápida evolução para leucemia (Hirai, 2003). A SMD pode ser classificada como *de novo*, em que não existe uma causa aparente para o seu aparecimento, ou como SMD secundária, que resulta da exposição a agentes mutagénicos, como por exemplo a quimioterapia e a radioterapia, ou outros agentes potencialmente tóxicos (Foran & Shammo, 2012).

Esta síndrome foi descrita pela primeira vez em 1990 por Leube como “*leukanamie*” que à data se pensava ser de origem infecciosa. Algumas décadas mais tarde, foram relatados vários casos de doentes que, na sequência de uma anemia macrocítica, desenvolveram leucemias agudas, que permitiram fazer a descrição de algumas características mais comuns. O termo “síndrome mielodisplásica” só foi aceite em 1970, quando se percebeu que muitos dos doentes, aos quais se tinha diagnosticado “pré-leucemia”, não chegavam a desenvolver leucemia aguda, morrendo de complicações resultantes das citopenias (Nimer, 2008). No entanto, só em 1982, o Grupo Cooperativo Franco-Americano-Britânico (FAB) designou formalmente este grupo heterogeneo de doenças por Síndrome Mielodisplásica (Nimer, 2008).

1.1.1. Fatores de Risco

A Síndrome Mielodisplásica é muitas vezes considerada uma doença multifatorial, uma vez que pode ser desencadeada pelos mais diversos fatores. A SMD, especialmente a sua forma primária, é predominantemente uma doença característica de

uma faixa etária mais avançada, pois o risco de desenvolver esta patologia aumenta significativamente com a idade. Aproximadamente 86% dos doentes com SMD têm mais de 60 anos aquando do diagnóstico (idade média de 76 anos) (Ma, 2012) e a incidência de SMD aumenta significativamente com o aumento da idade (Figura 1). No entanto, 6% dos casos de SMD são diagnosticados em indivíduos com menos de 50 anos (Ma, 2012), incluindo algumas crianças (Ritchie, 2012).

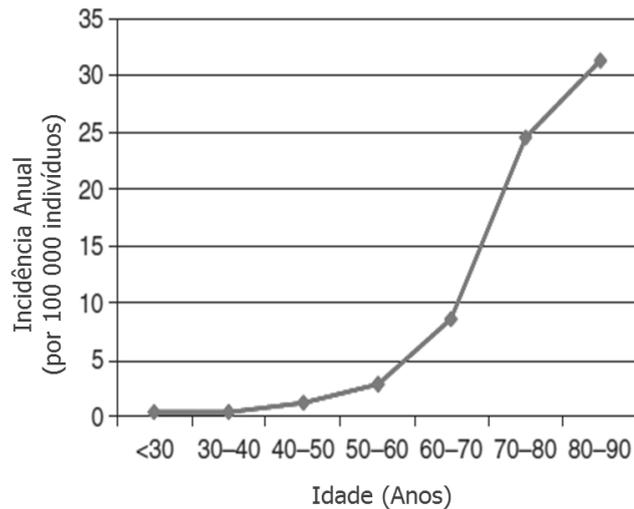


Figura 1 Incidência anual de Síndrome Mielodisplásica com a idade (Adaptado de Jädersten & Hellström-Lindberg, 2009)

Esta síndrome apresenta maior incidência em indivíduos do sexo masculino, comparativamente ao sexo feminino, num fator de cerca de 1.8 (Tefferi & Vardiman, 2009). Também os indivíduos de raça branca demonstram ter uma maior tendência para o desenvolvimento de SMD que indivíduos de outras raças/etnias (Ma, 2012).

Como referido, a Síndrome Mielodisplásica pode ainda surgir como consequência de anteriores tratamentos, como a radioterapia e a quimioterapia, que são frequentemente usados no tratamento dos mais diversos tipos de patologias, sendo designada nestes casos de SMD secundária. A taxa de SMD secundária tem aumentado significativamente nos últimos anos, possivelmente devido ao aumento da taxa de incidência de doenças neoplásicas, juntamente com o aumento do sucesso no seu tratamento (Foran & Shammo, 2012). Por outro lado, o aumento da esperança média de vida poderá também condicionar a taxa de incidência desta patologia, uma vez que esta aumenta significativamente com a idade.

Outros fatores de risco incluem a exposição ao benzeno, cuja principal fonte é o fumo proveniente do tabaco, exposição ocupacional a solventes, como tintas de cabelo, e a pesticidas. A relação entre o consumo de álcool e a SMD foi também estudada por vários grupos de investigação, no entanto, os resultados são bastante contraditórios (Ma, 2012).

Recentemente, Ma Xiaomei (2012) verificou a existência de uma forte associação entre o Índice de Massa Corporal (IMC) e o desenvolvimento de Síndrome Mielodisplásica. Através deste estudo, Ma concluiu que o risco de desenvolver SMD é 2.18 vezes superior em indivíduos com IMC superior a 30 (Obesidade), quando comparados a indivíduos com IMC inferior a 25 (Peso Normal).

O risco de desenvolver tanto SMD, como LMA, é também aumentado por determinadas síndromes genéticas, tais como, a Síndrome de Diamond-Blackfan, a Síndrome de Shwachman-Diamond, a Disqueratose Congénita, a Anemia de Fanconi e a Neutropenia Congénita Severa (Tefferi & Vardiman, 2009).

A taxa de incidência de SMD na população geral é de 5 em cada 100 000 indivíduos por ano, contudo este número aumenta para valores entre 22 a 45 indivíduos por cada 100 000, quando consideramos apenas a população com mais de 70 anos (Greenberg *et al.*, 2011). No entanto, estima-se que as taxas de incidência de SMD estejam provavelmente subestimadas, uma vez que não incluem doentes que já apresentam sintomas da doença mas que ainda não foram corretamente diagnosticados (Al-Ameri *et al.*, 2011).

1.1.2. Sintomatologia e Diagnóstico

O diagnóstico de SMD é sem dúvida um enorme desafio nomeadamente em doentes em fases mais iniciais da doença, uma vez que esta não apresenta sintomas específicos e muitas das suas características são comuns a outras neoplasias mieloides, que devem ser, cuidadosamente excluídos antes de se efetuar um diagnóstico definitivo de SMD (Foran & Shammo, 2012). A suspeita de SMD resulta principalmente de uma análise sanguínea anormal com contagem completa das células sanguíneas (Garcia-Manero, 2012), sendo por isso desencadeada por sintomas ou sinais sugestivos de citopenias. Estes sinais incluem, fadiga e o declínio físico perante atividades diárias de

rotina que poderão ser indicativas de anemia, infecções indicativas de neutropenia, hemorragias frequentes e inexplicáveis e contusões que poderão indicar a presença de trombocitopenia (Foran & Shammo , 2012). Muitos doentes poderão, no entanto, ser assintomáticos e são posteriormente diagnosticados como consequência da avaliação de outras comorbilidades (Foran & Shammo , 2012).

Um dos critérios primários no diagnóstico de SMD é a presença de displasia em pelo menos 10% das células de uma das linhas mielóides (Foran & Shammo , 2012; Tefferi & Vardiman, 2009), sendo as características morfológicas quer do sangue periférico quer da medula óssea extremamente importantes para o estabelecimento do diagnóstico. A análise do sangue periférico é um dos primeiros passos no diagnóstico de SMD, uma vez que os esfregaços revelam, para além da existência de citopenias, várias características morfológicas específicas desta síndrome, como, por exemplo, a hiposegmentação nuclear de neutrófilos (pseudo Pelger-Huët) (Tefferi & Vardiman, 2009). O diagnóstico terá de ser confirmado recorrendo a aspirado e/ou biopsia medular com coloração para ferro (Foran & Shammo, 2012). O aspirado medular permite avaliar detalhadamente a morfologia celular e a percentagem de blastos, e determinar a celularidade e arquitetura medular (Garcia-Manero, 2012). Deve ser também avaliado o cariótipo, uma vez que o padrão citogenético destes doentes é bastante heterogéneo e importante no prognóstico da doença e, nalguns casos, pode mesmo ser determinante na seleção da terapia mais adequada (Garcia-Manero, 2012).

1.1.3. Classificação

Tendo em conta a enorme heterogeneidade desta síndrome, nas últimas décadas, vários sistemas de classificação foram desenvolvidos com o objetivo de uniformizar os critérios de diagnóstico de SMD e de alguma forma estimar a sobrevivência e o risco de progressão para leucemia aguda. De entre os sistemas que surgiram é importante destacar os sistemas do Grupo Cooperativo FAB (1982) e da Organização Mundial de Saúde (OMS), revisto pela última vez em 2008.

A classificação FAB baseia-se essencialmente na percentagem de blastos na medula óssea, no número de linhagens afetadas e na ausência ou presença de sideroblastos em anel. Este sistema de classificação considera ainda que há progressão

para leucemia aguda quando a percentagem de blastos na medula é superior a 30%. Tendo em conta todos estes fatores foram distinguidas 5 subcategorias desta patologia: 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 Crónica (LMMC) (Tefferi & Vardiman, 2009; Greenberg, 2010).

Em 2001, a OMS criou um novo sistema de classificação de neoplasias mielóides que, pela primeira vez, incorporava informação genética, juntamente com informação morfológica, citoquímica, imunofenotípica e clínica (Vardiman *et al.*, 2009). O comité da OMS modificou algumas das definições FAB de Síndrome Mielodisplásica, baixando o nível de blastos necessários para o diagnóstico de LMA, de 30% para 20%, passando a categoria AREB-t para a categoria da LMA. Este comité decidiu ainda colocar a LMMC numa nova categoria de neoplasias mielóides, que tem características mielodisplásicas e mieloproliferativas, e reconheceu duas novas subcategorias a Citopenia Refratária com Displasia Multilinhagem (CRDM) e a Deleção isolada do braço longo do cromossoma 5 (Síndrome 5q-) (Tefferi & Vardiman, 2009). Mais recentemente, em 2008, este sistema de classificação foi revisto com o objetivo de incorporar nova informação clínica e científica, para melhorar os critérios de diagnóstico e introduzir novas entidades patológicas (Tabela 1) (Vardiman *et al.*, 2009).

Nesta revisão foi adicionada uma nova categoria que inclui doentes com displasia de uma única linhagem hematopoiética, anemia refratária, neutropenia refrataria ou trombocitopenia refratária, de uma forma geral, designadas de Citopenia Refratária com Displasia de Unilinhagem (CRDU) (Vardiman *et al.*, 2009). Por fim, foi ainda adicionada uma nova entidade provisória, a Citopenia Refratária Infantil (CRI), que inclui crianças com menos de 2% de blastos no sangue periférico e menos de 5% na medula óssea, mas que apresentam evidência de displasia em duas ou mais linhagens. No entanto, crianças com 2-19% de blastos no sangue e/ou 5-19% na medula devem ser classificadas usando os mesmos critérios que os adultos (Vardiman *et al.*, 2009).

Contudo, e tendo em conta o rápido aparecimento de informação biológica e genética, o próprio comité da OMS previu que seriam necessárias futuras revisões deste sistema de classificação.

Tabela 1 Características do sangue periférico e da medula óssea nas várias categorias de Síndrome Mielodisplásica definidas pelo comité da Organização Mundial de Saúde em 2008.

Patologia	Sangue Periférico (SP)	Medula Óssea (MO)
Citopenia Refratária com Displasia de Unilinhagem (CRDU): (Anemia Refratária [AR]; Neutropenia Refratária [NR]; Trombocitopenia Refratária [TR])	Unicitopenia e Bicitopenia Blastos raros ou ausentes (<1%)	Displasia unilinear: ≥10% de células displásicas da linhagem afetada <5% Blastos <15% dos precursores eritróides são sideroblastos em anel
Anemia Refratária com Sideroblastos em Anel (ARSA)	Anemia Ausência de blastos	≥15% dos precursores eritróides são sideroblastos em anel Apenas displasia eritróide <5% Blastos
Citopenia Refratária com Displasia de Multilinhagens (CRDM)	Citopenia(s) Blastos raros ou ausentes (<1%) Ausência de bastonetes de Auer Monócitos <1x10 ⁹ /L	Displasia em ≥10% das células em 2 ou mais linhas mielóides (neutrófilos e/ou precursores eritróides e/ou megacariócitos) <5% Blastos Ausência de bastonetes de Auer ±15% de sideroblastos em anel
Anemia Refratária com Excesso de Blastos 1 (AREB-1)	Citopenia(s) Blastos <5% Ausência de bastonetes de Auer Monócitos <1x10 ⁹ /L	Displasia de Uni ou Multilinhagens 5%-9% Blastos Ausência de bastonetes de Auer
Anemia Refratária com Excesso de Blastos-2 (AREB-2)	Citopenia(s) 5%-9% Blastos Com bastonetes de Auer Monócitos <1x10 ⁹ /L	Displasia de Uni ou Multilinhagens 10%-19% Blastos Com bastonetes de Auer
Síndrome Mielodisplásica não-classificável (SMD-NC)	Citopenias <1% Blastos	Displasia inequívoca em <10% das células de uma ou mais linhagens mielóides <5% Blastos
Síndrome Mielodisplásica associada à Deleção isolada do cromossoma 5q	Anemia Plaquetas normais ou aumentadas Blastos raros ou ausentes (<1%)	Megacariócitos normais ou aumentados com núcleo hipolobado <5% Blastos Del(5q) isolada Ausência de bastonetes de Auer

(adaptado de Vardiman *et al.*, 2009)

1.1.4. Prognóstico

O prognóstico de doentes com SMD é extremamente difícil de determinar, no entanto, tendo sido criados vários sistemas de prognóstico. Estes sistemas têm como principal objetivo a estratificação do risco de progressão e facilitar a escolha da terapêutica mais adequada a cada caso específico, tendo em conta a informação recolhida aquando do diagnóstico. O sistema de prognóstico mais utilizado é o IPSS (*International Prognostic Scoring System*) criado em 1997. Este sistema é baseado em três variáveis

principais, a percentagem de blastos na medula óssea, o número de citopenias periféricas e as anomalias citogenéticas. Após a avaliação de cada um destes parâmetros é feito o cálculo do *score* que permite inserir cada doente num dos quatro subgrupos de risco existentes: o grupo de baixo risco, intermédio-1 (int-1), intermédio-2 (int-2) e alto risco (Tabela 2) (Greenberg *et al.*, 1997). Embora este sistema seja facilmente reproduzível e fácil de utilizar, apresenta algumas limitações, uma vez que não é muito preciso no prognóstico de doentes de baixo risco e atribui pouco valor à citogenética (Garcia-Manero, 2012).

Tabela 2 Sistema de *International Prognostic Scoring System* (IPSS) em Síndrome Mielodisplásica.

Variável	Score				
	0	0.5	1.0	1.5	2.0
Blastos na Medula (%)	<5	5-10	--	11-20	21-30
Cariótipo ^a	Bom	Intermédio	Mau	--	--
Citopenia ^b	0 ou 1	2 ou 3	--	--	--
Grupo de Risco	IPSS score	Progressão a LMA para 25% dos doentes (anos)	Sobrevivência (anos), Idade ≤60 anos	Sobrevivência (anos), Idade >60 anos	
Baixo	0	9.4	11.8	4.8	
Intermédio-1	0.5-1.0	3.3	5.2	2.7	
Intermédio-2	1.5-2.0	1.1	1.8	1.1	
Alto	2.5-3.5	0.2	0.3	0.5	

^a Bom = Normal (-Y; del[5q]; del[20q]); Intermédio: todas as outras; Mau = complexas (≥3 anomalias)(anomalias no cromossoma 7)

^b Definições de Citopenia - Glóbulos Vermelhos: hemoglobina <10g/dL (100g/L); Glóbulos brancos: contagem absoluta de neutrófilos <1800/μL; Plaquetas <100 000/μL

(Adaptado de Al-Ameri, Cherry, Garcia-Manero, & Quintás-Cardama, 2011)

Mais recentemente, este sistema de prognóstico foi revisto, de modo a incorporar novos subgrupos citogenéticos, que passaram de 3 para 5, e a reduzir a percentagem de blastos mínima necessária para o diagnóstico. Assim, foi criado o IPSS-R, que se pensa vir a ser incorporado em vários centros até que mais informação se conheça relativamente ao prognóstico destes doentes (Seiter, 2013; Garcia-Manero, 2012).

Um outro sistema bastante utilizado é o da Organização Mundial de Saúde, o *WHO Classification-Based Prognostic Scoring System* (WPSS), que foi desenvolvido após se perceber que a dependência de transfusões sanguíneas é um fator de prognóstico independente (Garcia-Manero, 2012). Uma das grandes vantagens deste sistema prende-se com o facto de ser dependente do tempo, isto é, pode ser utilizado em qualquer momento da doença, sendo o doente classificado como estando num dos grupos de risco

e permanece nesse mesmo grupo enquanto o seu *score* permanecer inalterado (Malcovati *et al.*, 2007). As grandes limitações do sistema WPSS são a necessidade da classificação do doente segundo a classificação WHO e da informação relativa a anteriores transfusões sanguíneas (Garcia-Manero, 2012).

De uma forma mais geral, os doentes com SMD são também agrupados em dois grandes grupos, tendo em conta, não só o sistema IPSS, mas também o sistema WPSS. Deste modo, o grupo de doentes classificados como de alto risco inclui os doentes das categorias Int-2 e Elevado do IPSS, ou, as categorias elevado e muito elevado do WPSS, já o grupo de doentes de baixo risco abrange as categorias baixo e Int-1 do IPSS, ou as três categorias mais baixas do WPSS (Muito baixo, baixo e intermédio) (Greenberg *et al.*, 2011). Esta divisão em dois grandes grupos, permite a estratificação dos doentes de acordo com a sobrevivência e a progressão para LMA (Lyons, 2012), e tornou-se extremamente importante para a melhor gestão no que diz respeito às terapias a utilizar (Greenberg *et al.*, 2011).

1.1.5. Patogénese

O desenvolvimento de SMD e a sua frequente progressão para leucemia aguda ocorre em várias etapas e engloba múltiplos mecanismos e fatores, hereditários e ambientais, que atingem a célula estaminal hematopoiética, conduzindo à alteração da função celular e à conseqüente evolução do clone pré-maligno (Cortesão, 2010). Na SMD, a ocorrência de uma mutação numa célula estaminal hematopoiética induz alterações na proliferação, sobrepondo o seu crescimento ao das células normais (Figura 2). Esta célula estaminal neoplásica demonstra evolução clonal que a torna cada vez mais suscetível a múltiplas mutações posteriores e que pode culminar no desenvolvimento de leucemias (Hirai, 2003). No entanto, a mutação inicial ou via de sinalização celular afetada ainda não são bem conhecidas (Hirai, 2003; Tefferi & Vardiman, 2009).

As características patogénicas multifatoriais desta síndrome estão correlacionadas não só com a alteração inicial da célula estaminal hematopoiética mas também com o microambiente medular. Para além disso, as alterações das vias de sinalização celular decorrentes do processo de envelhecimento são também fundamentais no desenvolvimento de SMD. Todas estas descobertas demonstraram que as alterações

genéticas e oncogénicas, indicativas de instabilidade cromossómica e genética, e as alterações epigenéticas estão associadas ao desenvolvimento e à consequente progressão da doença (Greenberg, 2012). Embora, muitos dos mecanismos envolvidos na patogénese da SMD sejam ainda desconhecidos, sabe-se que envolvem alterações em genes que codificam proteínas importantes na hematopoiese, nomeadamente na regulação da diferenciação, na maturação e crescimento celular, no controlo do ciclo celular, na reparação do ácido desoxirribonucleico (ADN), na apoptose e na regulação da actividade dos telómeros (Gonçalves, 2008).

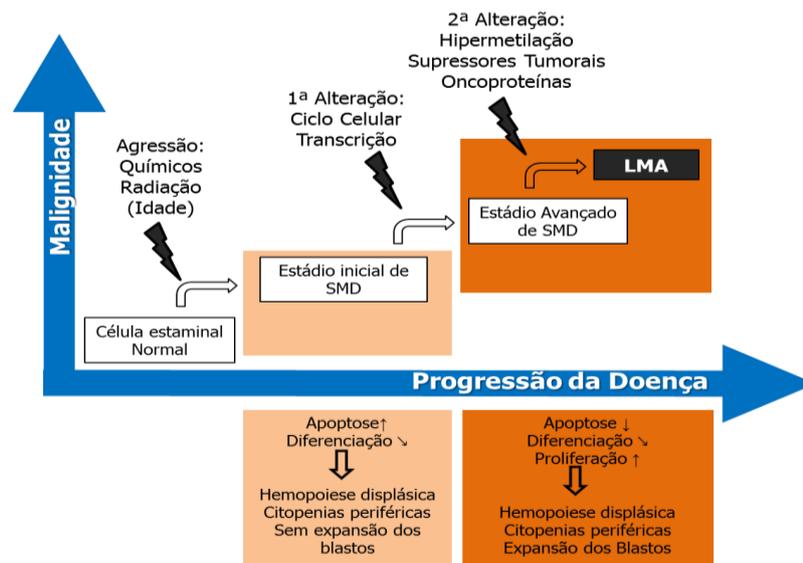


Figura 2 Mecanismos patofisiológicos envolvidos na Síndrome Mielodisplásica (Adaptado de Stintzing *et al.*, 2011)

A base molecular da SMD tem sido intensamente estudada, sendo que até à data inclui alterações cromossómicas como a deleção do cromossoma 5 (5q-), a perda do cromossoma 7 (-7/7q), deleção do cromossoma 20q e ganho do cromossoma 8 (trissomia 8), entre outras (Nimer, 2008); mutações genéticas em várias classes de proteínas tais como fatores de transcrição (ex: RUNX1), membros da via das tirosinas cinases (ex: RAS), inibidores do ciclo celular (ex: p53) e fatores anti-apoptóticos; alterações epigenéticas, como a metilação do ADN, modificações das histonas e ARN de transferência; e ainda, alterações do sistema imunitário, modificações no microambiente e mutações no spliceossoma (Nimer, 2008; Greenberg, 2012).

1.1.5.1. Alteração das vias de sinalização, do ciclo celular e da apoptose

No processo de diferenciação celular normal há sempre um equilíbrio dinâmico entre o estímulo/repressão da proliferação celular. No entanto, nas doenças oncológicas, as células adquirem alterações que levam à desregulação de vias de sinalização normal, nomeadamente as vias de diferenciação, maturação, proliferação e/ou a resistência à morte celular por apoptose (Cortesão, 2010).

Um dos grandes paradoxos na Síndrome Mielodisplásica é a ocorrência de um processo hematopoiético ineficaz e a presença de citopenias periféricas, em conjunto com uma medula normal a hiper celular. Este antagonismo tem sido fortemente estudado e pensa-se que poderá ser explicado pelo aumento da proliferação celular e da morte celular juntamente com a diferenciação ineficaz das células progenitoras hematopoiéticas (Nishino & Chang, 2005).

Deste modo, a desregulação de vias de proliferação e de regulação do ciclo celular e de vias de sinalização envolvidas na morte celular parecem estar envolvidas diretamente na patogénese da Síndrome Mielodisplásica, sendo por isso de extrema importância a compreensão dos mecanismos envolvidos nestes processos.

O ciclo celular das células somáticas engloba quatro fases distintas, a fase G1 (Gap1) em que a célula aumenta de tamanho e prepara para síntese de material genético, a fase S (Síntese) em que há síntese de ADN, a fase G2 (Gap 2) de preparação para a divisão celular e a fase M (Mitose) durante a qual se dá a divisão celular em duas células filhas (Figura 3). Estas células entram novamente em fase G1, permanecendo nesta fase, temporária ou permanentemente, num estado quiescente considerado como fase G0 (Park & Lee, 2003; Gonçalves, 2008).

O controlo do ciclo celular é regulado, espacial e temporalmente, por diversas moléculas, entre elas as proteínas fosfatases, as CDC (Cell Division Control), as proteínas supressoras tumorais como a pRb, a p15, a p16 e a p53 que atuam ao nível dos pontos de restrição impedindo a progressão do ciclo no caso de haver erros no processo, e ainda os complexos Ciclinas/CDKs (Cinases dependentes de Ciclinas). Estes complexos regulam o ciclo celular através da sua atividade de cinase de serina/treonina e permitem a passagem das células pelas diversas fases do ciclo (Gonçalves, 2008; Cortesão, 2010).

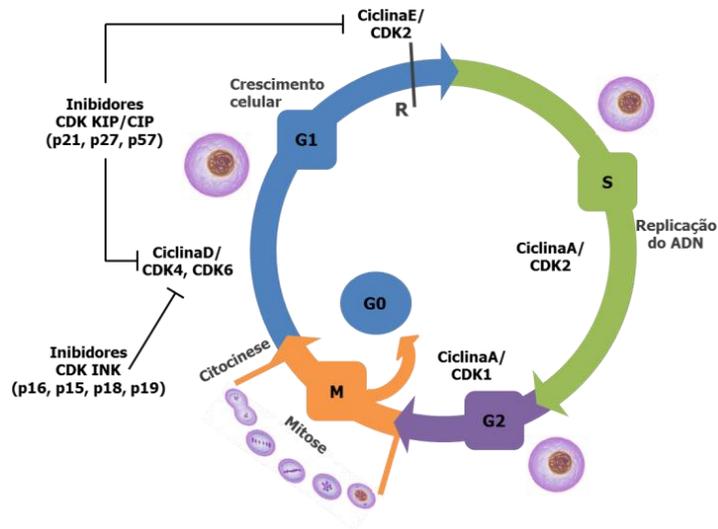


Figura 3 Ciclo celular e mecanismos de controlo. A progressão do ciclo pelas suas diferentes fases é regulada pelos complexos Ciclina/CDK e por genes supressores tumorais, específicos para cada fase do ciclo. A atividade das CDK é bloqueada por interações com duas famílias de proteínas inibitórias, a INK e a CIP/KIP. O primeiro ponto de restrição (R) regulado pelas proteínas supressoras tumorais pRB e p53 para monitorização e reparação de possíveis anomalias (adaptado de Cortesão, 2010; Dehay & Kennedy, 2007)

As CDKs e as ciclinas atuam como reguladores positivos do ciclo celular induzindo a sua progressão, no entanto, existem também vários reguladores negativos do ciclo celular, estes incluem os inibidores de cinases dependentes de ciclinas (CKIs) que atuam no sentido de parar a progressão do ciclo em resposta a sinais regulatórios (Park & Lee, 2003). As proteínas p15 e p16 pertencem à família de inibidores INK, inibindo a atividade dos complexos Ciclina D/CDK4 e Ciclina D/CDK6, sendo que a perda de função destes inibidores, leva à progressão inapropriada do ciclo celular (Uchida *et al.*, 1997).

A apoptose consiste num processo de morte celular programada altamente conservada, envolvido na regulação e manutenção dos mais diversos processos biológicos, entre eles a hematopoiese. A ativação da apoptose pode ser controlada por duas vias de sinalização distintas, mas que se encontram interligadas (Figura 4). A via intrínseca ou mitocondrial, desencadeada por sinais intracelulares como as lesões no ADN, e a via extrínseca ou membranar, iniciada por sinais extracelulares, como por exemplo agentes citotóxicos (Cortesão, 2010; Gonçalves, 2008; Ashkenazi, 2008).

A via extrínseca é desencadeada pela ligação de ligandos específicos, pertencentes à família do fator de necrose tumoral (TNF) que incluem o TNF- α , o ligando FAS (FAS-

L) e o TRAIL (*TNF-related apoptosis ligand*), aos seus recetores membranares TNFR-1, FAS-R e os recetores de morte 4 e 5 (DR4 e DR5, também designados TRAIL R1 e TRAIL R2), respetivamente. Esta ligação, ativa os domínios de morte (DD), comuns aos vários recetores já referidos, que vão interagir com proteínas como a FADD (Fas-associated death domain) e a TRADD (TNF receptor associated death domain). Posteriormente, a trimerização do complexo FAS/FADD/pro-caspase 8, também designado de complexo DISC (death-inducing signaling complex), leva à libertação da caspase 8 ativa, resultando na ativação das caspases efetoras responsáveis pela apoptose (Gonçalves, 2008; Parker & Mufti, 2001).

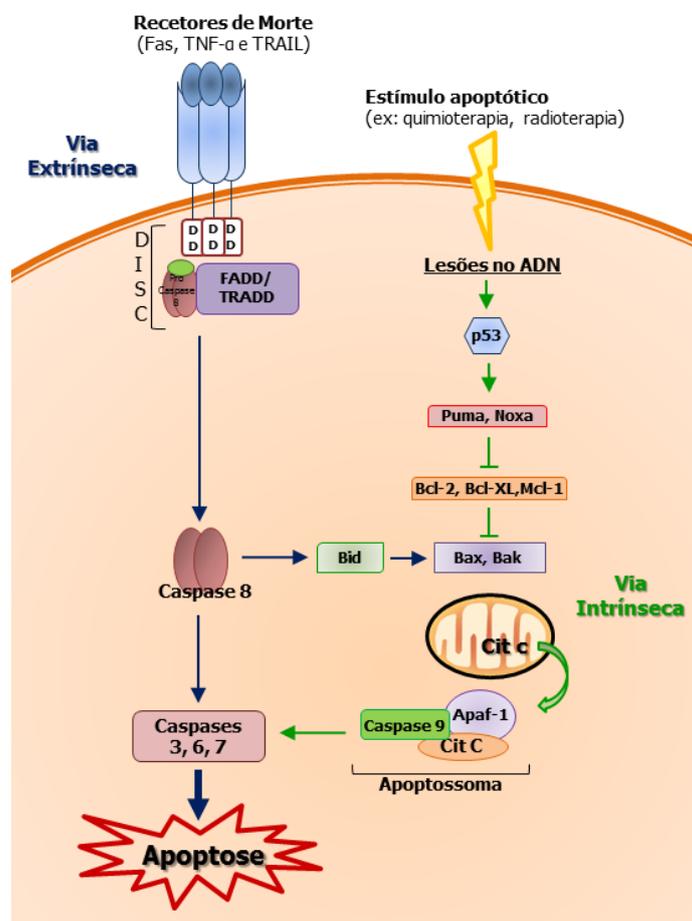


Figura 4 Vias de sinalização apoptótica. A apoptose pode ser iniciada pela via extrínseca, desencadeada pela ativação dos recetores de morte pelo fator de necrose tumoral (TNF), pelo ligando FAS ou pelo TRAIL (*TNF-related apoptosis ligand*). Esta ligação induz a formação do complexo DISC (death-inducing signaling complex) que desencadeia a caspase 8 que posteriormente interage com as caspases 3, 6 e 7. A via intrínseca pode ser desencadeada por stress celular que ativa a p53, uma proteína supressora tumoral, que regula PUMA e NOXA que por sua vez ativam BAX e BAK, que também podem ser ativadas pela forma truncada da proteína BID, a t-BID, formada por ação da caspase 8 ativa. BAX e BAK permeabilizam a membrana mitocondrial externa induzindo o efluxo de citocromo c que em conjunto com o fator ativador da peptidase apoptótica 1 (APAF-1) e a caspase 9 forma o apoptossoma. A caspase 9 ativa posteriormente cliva e ativa as caspases efetoras 3, 6 e 7 que vão desencadear a apoptose (adaptado de Ashkenazi, 2008).

A via intrínseca é regulada por proteínas da família da proteína BCL-2 (B cell lymphoma 2) que inclui proteínas anti-apoptóticas, como a BCL-2 e a BCL-XL inibidoras da libertação de citocromo c, e proteínas pro-apópticas como BAX e BAK (Gonçalves, 2008). Estas moléculas pro-apópticas participam na permeabilização da membrana mitocondrial, possibilitando a saída de citocromo c, que posteriormente se vai ligar à APAF-1 (*apoptosis protease activating factor-1*) e à pro-caspase 9, formando o apoptossoma. Este processo resulta na ativação da cascata de caspases que culmina na apoptose (Ashkenazi, 2008).

No entanto, e para que haja um equilíbrio dos mecanismos apoptóticos existem também vários reguladores negativos deste processo. Estes reguladores incluem os recetores armadilha DcR1 e DcR2 (também designados de TRAIL R4 e TRAIL R5) que competem pela ligação do TRAIL, prevenindo a indução do sinal apoptótico (Parker & Mufti, 2001), as proteínas supressoras tumorais, como a p53, e as proteínas inibidoras da apoptose (IAP) que atuam através do bloqueio de diversas caspases (Cortesão, 2010; Gonçalves, 2008).

Na Síndrome Mielodisplásica, um dos grandes fatores que contribui para a ineficiência da apoptose e da hematopoiese parece ser a sobre-regulação de reguladores negativos da hematopoiese, nomeadamente em SMD de baixo risco (Stintzing *et al.*, 2011), entre eles o TNF- α , o ligando FAS e o TRAIL juntamente com os seus respetivos recetores (Kerbauy & Deeg, 2007). Zang *et al.* demonstraram que o aumento da apoptose em células da medula óssea, de doentes com esta síndrome, é induzido pelo TRAIL, uma vez que os recetores DR4 e DR5 se encontram sobre-regulados nestas células. Zang observou ainda que a razão entre os recetores agonistas e os recetores armadilha é significativamente maior na SMD do que em células de medula de doadores saudáveis (Zang *et al.*, 2001). A importância da mitocôndria na patogénese desta síndrome também tem sido intensivamente estudada, nomeadamente no que diz respeito à expressão dos membros pro- e anti-apoptóticos da família da BCL-2, uma vez que controlam o potencial de membrana mitocondrial (Bernasconi, 2008). Um desses estudos, demonstrou que a razão entre BAX/BAD e BCL-2/BCL-2L1 está correlacionada com o índice apoptótico e é mais elevado em SMD de baixo risco diminuindo em estádios mais avançados devido à elevada expressão de BCL-2 (Parker *et al.*, 2000).

Alem disso, é também conhecido que a progressão desta patologia é muitas vezes acompanhada pela inativação de genes reguladores do ciclo celular, como os genes *p15*, *p16* e *p53*. Todos estes fatos levam a crer que o aumento da morte celular programada em SMD de baixo risco se deve a um mecanismo homeostático, que pretende de alguma forma compensar as elevadas taxas de proliferação. Por outro lado, o aumento da divisão celular também tem como finalidade a neutralização do excesso de apoptose (Parker & Mufti, 2001).

1.1.5.2. Modificações epigenéticas

Todas as células de organismos multicelulares derivam de um mesmo código genético, apesar de serem morfológica e funcionalmente muito diferentes. As características específicas de cada tipo celular não são definidas apenas geneticamente mas também através de distintos padrões de expressão génica que são regulados por mecanismos epigenéticos (Bejar & Steensma, 2012). A explosão de dados indicativos da importância dos processos epigenéticos, levou à conclusão de que a genética e a epigenética funcionam em conjunto nas várias etapas do desenvolvimento de neoplasias (Jones & Baylin, 2007).

O termo epigenética refere-se a alterações na expressão de genes, clonalmente herdadas, que não são acompanhadas por alterações na sequência de ADN (Khan *et al.*, 2013; McDevitt, 2012) e que podem ser reversíveis, ao contrário do que acontece com as alterações genéticas. Os mecanismos epigenéticos são responsáveis pela normal regulação da embriogénese e do desenvolvimento, sabendo-se também que os fatores epigenéticos têm um papel importante no controlo da totipotência celular, na seleção de linhagens e na diferenciação das células hematopoiéticas (McDevitt, 2012). Os três maiores mecanismos epigenéticos são a metilação do ADN, a modificação das histonas e a regulação por ácido ribonucleico (ARN) não codificante – microRNAs ou miRs – e sabe-se que estes mecanismos estão envolvidos no fenótipo maligno do cancro (Khan *et al.*, 2013).

A metilação do ADN é, sem dúvida, o evento epigenético mais estudado até ao momento, essencialmente devido ao papel crucial que desempenha na regulação da expressão de genes essenciais ao organismo, e em fenómenos como o *imprinting*

genómico, a inactivação do cromossoma X e no silenciamento de retrotransposões e elementos repetitivos (Yang *et al.*, 2010). Esta metilação consiste na adição de um grupo metilo a uma das quatro bases que constituem a sequência de ADN (Issa, 2010). Nas células de mamíferos, a adição do grupo metilo ocorre apenas no carbono da posição 5 do anel de pirimidina do nucleótido citosina (Figura 5) (Baylin, 2005). Esta reação resulta na formação da 5-metilcitosina (5mC), uma base que resulta em alterações na ligação de factores de transcrição ao ADN (Khan *et al.*, 2013), e que se encontra em aproximadamente 4% do ADN genómico, principalmente nos dinucleótidos citosina-fosfato-guanina (CpGs) (Baylin, 2005).

A reação de metilação é catalisada pelas ADN metiltransferases (DNMTs), que são assim as responsáveis por estabelecer e manter o padrão de metilação. Nas células de mamíferos, podemos encontrar três DNMTs diferentes, a DNMT1, a DNMT3a e a DNMT3b (Baylin, 2005). Durante a embriogénese, a metilação *de novo* de ADN é mediada pelas DNMT3a e DNMT3b (Yang *et al.*, 2010). Por sua vez, a DNMT1 mantém os padrões de metilação ao longo das várias divisões celulares, pois liga-se preferencialmente a ADN hemi-metilado, ou seja ao ADN após ser replicado. A DNMT1 vai metilar a citosina complementar que se encontra desmetilada (Bejar & Steensma, 2012).

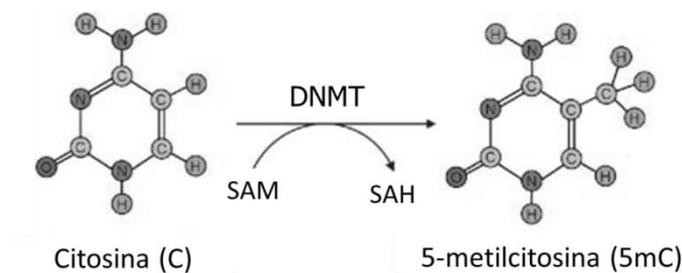


Figura 5 Metilação da citosina. Os resíduos de citosina no ADN são convertidos em 5-metilcitosina pelas ADN metiltransferases (DNMTs). O grupo metilo é doado pela S-adenosilmetionina (SAM) que é convertida em S-adenosilcisteína (SAH). (Adaptado de Gronbaek, Hother, & Jones, 2007)

A metilação do ADN ocorre essencialmente nas citosinas que precedem guaninas, designadas de dinucleótidos citosina-fosfato-guanina (CpGs), estes dinucleótidos estão desigualmente distribuídos no genoma, existindo zonas ricas nestes dinucleótidos, as ilhas CpG. Estas ilhas são definidas como regiões do ADN com mais de 500 pares de bases e cujo conteúdo em GC é superior a 50%, e encontram-se, na sua maioria próximas

das regiões promotoras de aproximadamente 60% dos genes (Yang *et al.*, 2010). No entanto, grande parte do genoma está depletado de dinucleótidos CpG, essencialmente devido à relativa instabilidade da 5mC, uma vez que durante a evolução, a desaminação hidrolítica espontânea da 5mC para uma outra base de ADN, a timina (T), levou à perda sucessiva destas sequências (Gronbaek *et al.*, 2007). Nas células normais, as citosinas que se encontram nas ilhas CpG estão normalmente desmetiladas, enquanto os dinucleótidos localizados, principalmente em zonas repetitivas e centroméricas, estão metilados. A desmetilação de ilhas CpG associadas a promotores de genes permite que ocorra a transcrição desses mesmos genes, uma vez que permite que a cromatina fique na sua forma activa e que seja possível a ligação dos fatores de transcrição necessários (Figura 6) (Leone *et al.*, 2008). A metilação das ilhas CpG está, deste modo, associada à ausência de transcrição do promotor envolvido, e este silenciamento é transmitido através das sucessivas mitoses, assegurando a herança clonal. Este processo é particularmente notável nos fenómenos de inactivação do cromossoma X e no *imprinting* genómico (Issa, 2010).

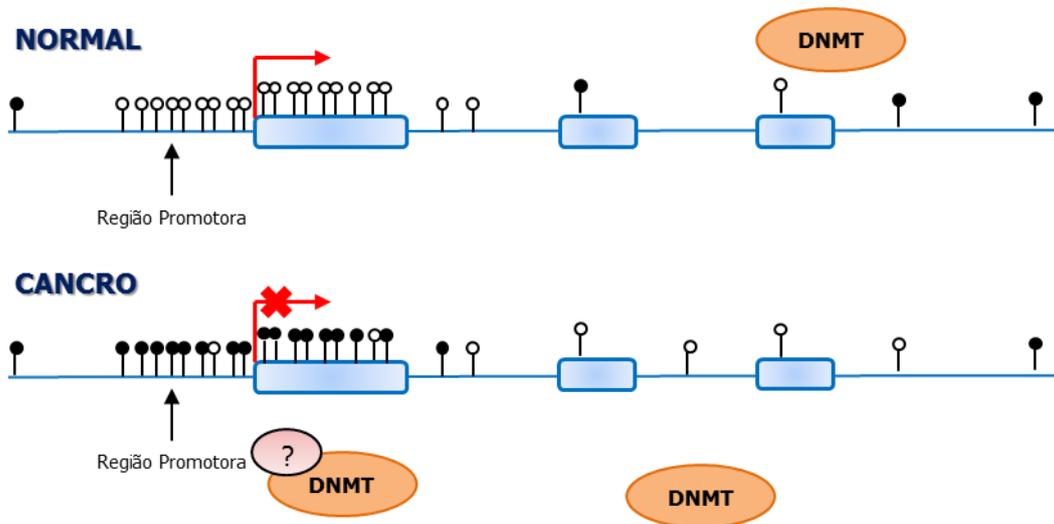


Figura 6 Metilação de ADN em células normais e em células neoplásicas. Círculos brancos, dinucleótidos CpG; Círculos pretos, locais hipermetilados; 1,2 e 3, exões dos genes representados; x, bloqueio da transcrição; DNMT, ADN metiltransferases (adaptado de Baylin, 2005)

Embora a metilação possa de alguma forma controlar a actividade dos genes, ela não pode por si só regular a transcrição. A estrutura local da cromatina também contribui para a determinação da expressão do gene (Baylin, 2005). As modificações pós-traducionais de aminoácidos nos terminais das histonas, tais como, metilação, acetilação,

fosforilação, entre outras, interagem com outras proteínas de modo a promover a abertura ou fecho da estrutura dos nucleossomas, caso seja necessário promover ou bloquear a transcrição de genes, respectivamente (Issa, 2010).

A metilação das ilhas CpG forma importantes locais de ligação para as proteínas de ligação a metilcitosina, as *Metil Binding Proteins* (MBPs). Estas proteínas vão mediar o efeito inibitório da metilação das ilhas CpG na expressão de genes, actuando como repressores transcricionais. A ligação das MBPs é seguida do recrutamento de um complexo proteico que inclui as desacetilases das histonas (HDACs), estas enzimas vão alterar o grau de compactação da cromatina que fica numa configuração fechada (Figura 7) (Issa, 2010). Quando as ilhas CpG estão desmetiladas, os nucleossomas estão numa configuração aberta e transcricionalmente activa, que permite o acesso de fatores de transcrição e outros coativadores, e de acetiltransferases das histonas (HATs). Estas têm a capacidade de desdobrar a cromatina favorecendo a transcrição (Baylin, 2005).

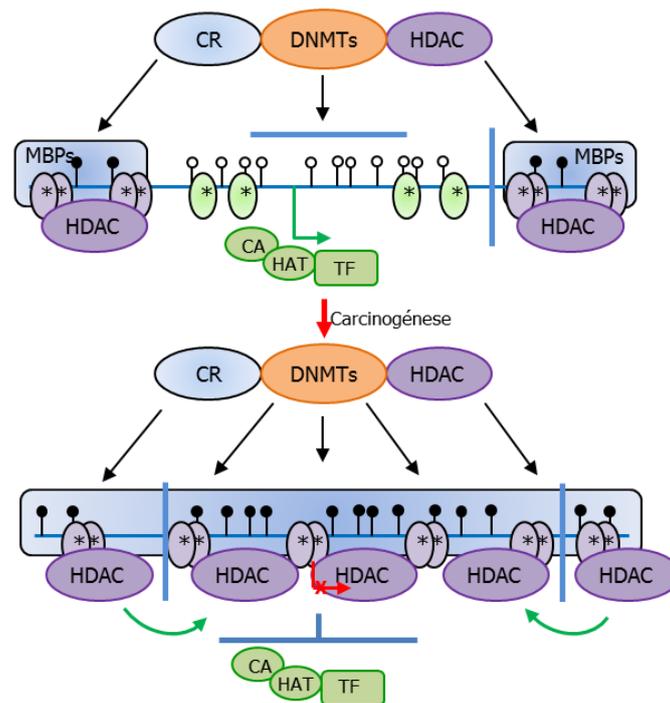


Figura 7 Efeitos da metilação de ADN e da estrutura da cromatina na transcrição de genes em células normais e em células cancerígenas. Bolas com asteriscos a negrito, nucleossomas em que as histonas apresentam desacetilação de aminoácidos chave, tal como a lisina 9 da histona 3 e metilação do mesmo resíduo (ambos marca de transcrição inativa); bolas com asterisco, nucleossomas com acetilação da lisina 9 da histona 3 e metilação da lisina 4 da mesma histona (ambos marcas de transcrição ativa); círculos brancos, dinucleótidos CpG; círculos pretos, locais hipermetilados; seta com X, repressão transcricional; setas curvas, atividade transcricional. CA, coativadores da transcrição; CR, corepressores da transcrição; DNMTs, ADN metiltransferases; HAT, Acetiltransferases das histonas; HDAC, desacetilases das histonas; MBPs proteínas de ligação a metilcitosinas; TF, fatores de transcrição (adaptado de Baylin, 2005)

A desregulação dos mecanismos epigenéticos, tal como a metilação do ADN e a alteração da estrutura da cromatina, têm um papel tão importante como as alterações genéticas no desenvolvimento e progressão de cancro, em particular em leucemias. No entanto, estes dois mecanismos também atuam em conjunto para o mesmo fim (Leone *et al.*, 2008; Yang *et al.*, 2010).

Nas doenças neoplásicas ocorrem alterações bastante complexas no que diz respeito à metilação de ADN. De uma forma geral, estas alterações incluem a ocorrência em simultâneo da hipometilação global do genoma, a hipermetilação de ilhas CpG anteriormente desmetiladas, e ainda, o aumento da expressão das DNMTs (Issa, 2010). A desmetilação global do ADN foi inicialmente descoberta através do estudo do conteúdo de 5mC em tumores, e parece envolver principalmente ADN satélite, sequências repetitivas e locais CpG localizados em intrões (Issa, 2010). Pensa-se que esta hipometilação exerça um efeito oncogénico através da reativação de sequências silenciadas e de oncogenes, que vão contribuir para o fenótipo neoplásico (Leone *et al.*, 2008; Issa, 2010). Também foi já demonstrado que a hipometilação global do genoma pode resultar em instabilidade cromossómica (Khan *et al.*, 2013).

A grande maioria das células neoplásicas apresenta aumento da actividade enzimática da DNMT1, no entanto, o aumento dos níveis de mRNA de DNMT1, DNMT3a e DNMT3b também já foi descrito em algumas neoplasias, incluindo leucemias, e poderão por essa razão estar implicados no aumento de actividade. As DNMTs parecem ser reguladas pelo ciclo celular e alguns autores defendem que os níveis destas enzimas reflectem o estado fisiológico de proliferação aumentada em neoplasias. Por outro lado, também se considera que a DNMT1 aumenta após ativação de oncogenes, e é possível que os seus níveis reflitam as várias alterações moleculares observados nos tumores (Issa, 2010).

No entanto, grande parte dos estudos de epigenética nas neoplasias estão focados na hipermetilação das ilhas CpG, e revelaram o silenciamento de muitos genes supressores tumorais, genes com funções celulares e miRs, através da metilação do ADN (Yang *et al.*, 2010). A hipermetilação de vários genes têm sido observada nos mais diversos tipos de neoplasias mas, no geral, o padrão de metilação nas células cancerígenas é específico dos tecidos envolvidos (Leone *et al.*, 2008). De acordo com o modelo dos dois *hits* de Knudson, a disrupção da função de genes supressores tumorais necessita que

haja a perda de função de ambos os alelos (Knudson, 2001). Neste contexto, a hipermetilação anormal de promotores pode exercer o mesmo efeito que uma mutação numa região codificante ou deleção numa das cópias do gene e, por isso, pode ser considerada como via adicional, que contribui para a perda de um ou dos dois alelos (Gronbaek *et al.*, 2007; Baylin, 2005). O grande número de genes que se sabe estarem hipermetilados, em vários tipos de neoplasias, sugere que as alterações epigenéticas têm de facto um papel na iniciação e no consequente desenvolvimento no cancro (Baylin, 2005), incluindo nas neoplasias hematológicas (Issa, 2010). Desta forma, a hipermetilação do ADN ocorre ao nível de genes da regulação do ciclo celular, da reparação do ADN, da evasão e adesão celular, da apoptose, da diferenciação, alterando vias de sinalizar celular fundamentais ao funcionamento normal da célula (Tabela 3) (Baylin, 2005; Leone *et al.*, 2008). A desregulação destas vias vai conferir às células afetadas uma maior capacidade de sobrevivência, contribuindo para a progressão da carcinogénese (Leone *et al.*, 2008).

Tabela 3 Genes hipermetilados em cancros esporádicos.

Gene ou Produto	Função	Tipo de Tumor
<i>Rb</i>	Regulação do Ciclo Celular	Retinoblastoma
<i>APC</i>	Via Wnt	Cancro colorectal, entre outros
<i>p14</i>	Regulação do Ciclo Celular	Cancro colorectal
<i>p15</i>	Regulação do Ciclo Celular	Leucemias
<i>p16</i>	Regulação do Ciclo Celular	Várias neoplasias
<i>BRCA1</i>	Reparação do ADN	Cancro da Mama e Ovários
<i>VHL</i>	Supressor Tumoral*	Cancro das células Renais
<i>hMLH1</i>	Reparação de ADN	Cancro Endometrial, Gástrico e Colorectal
<i>ER-α</i>	Recetor de estrogénios	Cancro da Mama, Colorectal, entre outros

*Perda de controlo para a angiogénese regulada por oxigénio. APC, adenomatosis polyposis coli; BRCA1, breast cancer 1, início precoce; ER- α , Receptor de estrogénios alfa. hMLH1, homólogo do mutL humano 1; Rb, retinoblastoma; VHL, supressor tumoral de von Hippel-Lindau.

(adaptado de Baylin, 2005)

Devido à natureza clonal e elevado potencial de transformação leucémica, a Síndrome Mielodisplásica foi considerada um modelo válido para a análise da metilação durante o processo oncogénico. Esta avaliação permite verificar quais os eventos moleculares que poderão estar associados à progressão da doença, e se os padrões de

metilação aberrante ocorrem em estádios mais iniciais ou mais tardios da oncogênese, quando já se desenvolveram uma ou mais alterações genéticas (Musolino *et al.*, 2010).

Grande parte dos estudos epigenéticos envolvendo doentes com Síndrome Mielodisplásica são focados na metilação de ADN. O silenciamento de genes induzido por hipermetilação está descrito em muitos genes nesta síndrome (Tabela 4), incluindo genes envolvidos na regulação do ciclo celular (*p15*, *p16*), na apoptose (*DAPK*), na adesão e motilidade (*CDH1*), entre outros (Issa, 2010). A variedade de genes metilados pode ser encontrada em doentes em estádios mais iniciais da doença, afetando várias funções celulares. No entanto, a progressão da doença está associada a eventos epigenéticos adicionais, que são muito comuns em estádios mais avançados (Greenberg, 2012). A metilação de cada um destes genes em separado tem um impacto funcional mínimo na SMD, não sendo sequer expressos nas células hematopoiéticas normais. Contudo, os doentes com SMD apresentam hipermetilação de vários genes em simultâneo, o que poderá contribuir para a heterogeneidade da doença (Issa, 2010).

Tabela 4 Alguns dos genes hipermetilados em Síndrome Mielodisplásica e as suas respetivas frequências de metilação.

Gene	Frequência de metilação (%)	Função
<i>Calcitonina</i>	50	Diferenciação
<i>p15</i>	23-80	Inibidor das cinases dependentes de ciclinas; ciclo celular/proliferação
<i>DAPK</i>	50	Serina pro-apoptótica/Treonina cinase
<i>RASSF1</i>	9	Regulador negativo da sinalização RAS
<i>FHIT</i>	50	Metabolismo das purinas
<i>HIC1</i>	32	Repressor da transcrição
<i>CDH1</i>	15-27	Adesão e Motilidade
<i>CTNNA1</i>	10	Catenina alfa
<i>ER-α</i>	7-19	Recetor de estrogénios
<i>RIL</i>	36-70	Supressor tumoral, pro-apoptotico
<i>CDH13</i>	21	Adesão e Motilidade
<i>NOR1</i>	15	Proteína com domínio nitro-oxidado
<i>NPM2</i>	20	Nucleofosmina/Nucleoplasmina 2 envolvido no desenvolvimento
<i>OLIG2</i>	41	Fator de transcrição básico hélice-loop-hélice
<i>PGRA</i>	45	Recetor de progesterona
<i>PGRB</i>	45	Recetor de progesterona

(adaptado de Issa, 2010)

Deste modo, a compreensão de todos os mecanismos epigenéticos, nomeadamente da metilação de ADN, parece ser de extrema importância para a caracterização molecular na Síndrome Mielodisplásica. Tal deve-se à possibilidade de reverter todas as alterações epigenéticas farmacologicamente, através da utilização de agentes hipometilantes, no caso da hipermetilação do ADN, reativando genes anteriormente silenciados. De facto, inibidores das DNMT, como a azacitidina e a decitabina encontram-se aprovados pela FDA para tratamento de SMD de alto risco.

Por outro lado, o padrão de metilação de determinados genes é cada vez mais utilizado como marcador molecular de neoplasias. A utilização de genes hipermetilados como biomarcadores é bastante vantajosa uma vez que este tipo de modificação é muito característica das células tumorais, para além disso as técnicas de análise de hipermetilação, como o MS-PCR (*methylation specific polymerase chain reaction*), a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) e a eletroforese capilar de alta eficiência (HPCE), são bastante rápidas e sensíveis. Podemos ainda destacar o fato de o ADN ser uma molécula bastante estável e de poder ser obtido de uma vasta quantidade de amostras, como o sangue periférico e o sangue medular (Mulero-Navarro & Esteller, 2008). A observação da presença de biomarcadores epigenéticos poderá deste modo fazer a deteção mais precoce da doença, avaliar qual o estado de progressão, e ainda prever a resposta clínica a determinados tipos de fármacos (Mulero-Navarro & Esteller, 2008; McDevitt, 2012).

1.1.5.2.1. Relação da Síndrome Mielodisplásica e o metabolismo do folato e da vitamina B12

Nos últimos anos tem sido dada bastante atenção ao papel dos nutrientes na expressão génica pela sua interação com polimorfismos genéticos e com a modulação da metilação do ADN. A alteração da homeostase de processos essenciais como o metabolismo do carbono pode ocorrer em resultado da deficiência de dois nutrientes essenciais envolvidos neste processo metabólico, o folato e a cobalamina, mais conhecida por vitamina B12 (Das & Singal, 2004).

O metabolismo do carbono está dividido em dois grandes ciclos, um responsável pela produção de purinas e timidina e o outro responsável pela síntese de metionina e de S-adenosilmetionina (SAM) (Das & Singal, 2004). Nesta via metabólica, os grupos metil

são doados pelo 5-metiltetrahidrofolato (5-metilTHF), resultante da conversão irreversível de 5,10-metilenotetrahidrofolato (5,10-metilenoTHF) a 5-metiltetrahidrofolato (5-metilTHF) pela metilenotetrahidrofolato redutase (MTHFR) (Crider, *et al.*, 2012). Esta reacção é importante para a manutenção do fluxo de grupos metil para a remetilação da homocisteína a metionina pela reação da metionina sintetase dependente da vitamina B12, com posterior formação de S-Adenosilmetionina (Figura 8) (Crider, *et al.*, 2012).

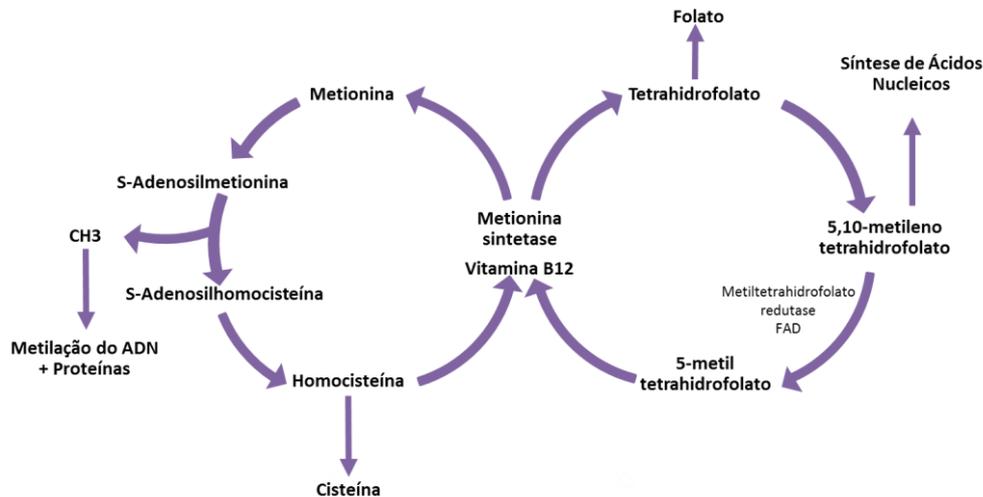


Figura 8 Formação de S-Adenosilmetionina dependente de vitamina B12 e do metabolismo do Ácido Fólico. (adaptado de Crider, *et al.* 2012; Cortesão, 2010)

Deste modo, o folato e a vitamina B12 adquirem um papel de extrema importância, uma vez que poderão regular processos como a metilação do ADN. Nomeadamente, o folato que adquire interesse como agente quimiopreventivo devido ao seu papel na síntese, reparação e metilação do ADN (Cortesão, 2010).

Vários estudos têm avaliado os níveis de folato e vitamina B12 em várias neoplasias, como é o caso de um estudo desenvolvido por Johansson, *et al.*, em 2008, que concluiu que elevadas concentrações de B12 poderão estar associadas a um aumento do risco para cancro da próstata em estágio avançado.

1.1.6. Tratamento

Tendo em conta o aumento do número de casos de SMD, é também cada vez maior o esforço colocado na descoberta de terapêuticas capazes, não só de curar esta

doença, mas também de melhorar a qualidade de vida dos doentes e alterar a história natural da doença.

As terapêuticas usadas em SMD devem ser, no entanto, otimizadas para cada doente, tendo em atenção vários fatores, como o subtipo, por exemplo, a lenalidomida que está aprovada pela *Food and Drug Administration* (FDA) para o tratamento da Síndrome 5q-, a categoria IPSS, a idade, o estado físico e as comorbidades de cada doente (Lyons, 2012). Como a maioria dos doentes com SMD apresentam medianamente 70 anos à data do diagnóstico, as opções terapêuticas tornam-se muito limitadas devido às comorbilidades e às características anormais das células estaminais hematopoiéticas e do microambiente (Greenberg, 2010). Para a escolha da terapêutica a utilizar é também de enorme importância ter em consideração a vontade do doente, que é o fator mais determinante (Lyons, 2012).

Os objetivos terapêuticos, bem como o tratamento a utilizar, variam consoante o grupo de risco em que o doente se insere, como já referido. Deste modo, os principais objetivos nos doentes de baixo risco são a melhoria hematológica, a independência de transfusões, a manutenção ou melhoria da qualidade de vida e o atraso na progressão da doença (Lyons, 2012). Nestes casos, são utilizadas várias terapêuticas de suporte em que podemos destacar as transfusões de produtos sanguíneos, nomeadamente de glóbulos vermelhos e de plaquetas (Lyons, 2012), as terapêuticas de quelatação de ferro, nos casos em que há acumulação de ferro no sangue (Greenberg, 2010), e ainda, a administração de fatores de crescimento hematopoiéticos, uma vez que promovem o crescimento e diferenciação dos precursores hematopoiéticos (Al-Ameri *et al.*, 2011). Este tipo de terapêutica implica inicialmente a observação, monitorização clínica, avaliação psicossocial e avaliação da qualidade de vida dos doentes (Greenberg *et al.*, 2011).

No caso dos doentes de alto risco, a terapêutica tem como principal finalidade alterar o decurso natural da doença, através de tratamento mais agressivos (Lyons, 2012). Estes tratamentos incluem os agentes hipometilantes, os protocolos de quimioterapia e o transplante alogénico de células estaminais hematopoiéticas (Garcia-Manero & Fenaux, 2011). Os agentes hipometilantes são bastante importantes no tratamento de SMD devido à importância das alterações epigenéticas nesta doença. Estes fatos levaram à aprovação pela FDA de dois agentes análogos de citosinas, a 5-azacitidina (AZA) e a 5-aza-2-desoxiazacitidina (DAC) para o tratamento desta síndrome. A AZA é o único

agente hipometilante que prolonga significativamente a sobrevivência global de doentes de alto risco, quando comparada a terapêuticas convencionais, no entanto ambos estão associados a um aumento significativo da qualidade de vida dos doentes (Lyons, 2012). Os protocolos de quimioterapia mais utilizados em SMD de alto risco são semelhantes aos utilizados na LMA *de novo*, que tiram partido das combinações de antraciclina/citarabina. Porém, os doentes candidatos a esta terapêutica são muito poucos, uma vez que a quimioterapia só é aconselhável em doentes relativamente novos, com cariótipo favorável, particularmente os candidatos a transplante quando é necessária uma redução rápida da percentagem de blastos antes do mesmo (Garcia-Manero & Fenaux, 2011). Na Europa, também é bastante utilizado o regime de baixas doses de citarabina, no entanto, este tratamento pode levar a mielossupressão severa (Garcia-Manero & Fenaux, 2011). O único tratamento potencialmente curativo em SMD é o transplante alogénico de células estaminais hematopoiéticas. Contudo, apenas um número muito limitado de doentes é candidato a esta terapêutica, devido à baixa disponibilidade de dadores compatíveis e à idade, normalmente avançada, dos doentes com esta síndrome (Al-Ameri *et al.*, 2011). Uma das decisões mais importantes a tomar quando se utiliza este tipo de tratamento, é sem dúvida o momento exato em que deve efetuado, sendo necessário fazer um balanço entre a possível progressão da doença e o risco de morbilidade e mortalidade a longo prazo que poderá resultar do transplante (Al-Ameri *et al.*, 2011).

São também muitas as terapêuticas em investigação para o tratamento da Síndrome Mielodisplásica. De entre estas podemos destacar, os inibidores das farnesiltransferase, que inibem a ativação de proteínas dependente da prenilação, como é o caso do produto do proto-oncogene *RAS* (Al-Ameri *et al.*, 2011). Também as terapias imunossupressivas, como os corticoesteróides, a imunoglobulina intravenosa e o anticorpo monoclonal anti-CD52 alemtuzumab têm sido muito estudados em SMD (Lyons, 2012). Os inibidores das desacetilases das histonas parecem ser bastantes promissores devido ao elevado número de alterações já estudadas nesta síndrome (Al-Ameri *et al.*, 2011). Finalmente, também se têm estudado vários tipos de combinações entre fármacos já existentes e novos fármacos, como é o caso da associação da lenalidomida e da azacitidina em doentes de alto risco, e do romiplostim, agentetrombomimético, com a azacitidina ou a lenalidomida em casos de baixo risco (Lyons, 2012).



Objetivos

2. Objetivos

Este trabalho tem como principal objetivo correlacionar o perfil de metilação, de amostras de sangue periférico e de medula óssea, de doentes com Síndrome Mielodisplásica colhidas aquando do diagnóstico, e correlacioná-lo com a clínica. Deste modo do pretende-se:

-  Avaliar o perfil de metilação dos genes supressores tumorais (*p15*, *p16*, *p53*, *DAPK* e *MGMT*) e dos recetores de morte (*TRAIL DcR1*, *TRAIL DcR2*, *TRAIL DR4* e *TRAIL DR5*) nos doentes com SMD
-  Comparar o perfil de metilação dos vários genes entre as amostras de sangue periférico e de medula óssea de cada doente
-  Relacionar os dados obtidos com as características clínicas de cada doente, incluindo os subtipos de SMD e o IPSS
-  Relacionar o perfil de metilação com o metabolismo do folato e da vitamina B12 nos doentes
-  Avaliação da metilação global das amostras de SMD, através da quantificação da 5-Metilcitosina

Objetivos



Materiais e Métodos

3. Materiais e Métodos

3.1. Estudos realizados nos doentes com Síndrome Mielodisplásica e nos controlos não-neoplásicos

3.1.1. Seleção e Caracterização dos doentes e controlos

Neste estudo participaram 96 indivíduos, dos quais 82 doentes com Síndrome Mielodisplásica (SMD) e 14 controlos não neoplásicos sem critérios de diagnóstico.

A seleção e caracterização dos doentes com SMD e dos controlos não neoplásicos foi efetuada no Serviço de Hematologia Clínica do Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra (CHUC/HUC) e na consulta de Oncologia do Serviço de Medicina do Hospital Distrital da Figueira da Foz, EPE, de acordo com os critérios internacionais.

Posteriormente, foi feita a divisão dos doentes com SMD, segundo a classificação da OMS, nos vários subtipos da doença, tendo em conta todos os critérios de diagnóstico definidos pela mesma organização.

Os doentes foram ainda distribuídos em três grupos de risco distintos de acordo com o sistema de prognóstico IPSS: o grupo de baixo risco (Baixo), o grupo de risco intermédio-1 (Int-1) e o grupo de risco intermédio-2 (Int-2).

3.1.2. Extração e quantificação do ADN genómico

A extração de ADN genómico de sangue periférico e de medula óssea dos doentes com SMD e dos controlos foi realizada através do protocolo de extração de ADN para amostras de sangue desenvolvido por Bartlett & White (Bartlett & White, 2003), após otimização do mesmo.

Assim, num tubo cónico de 10 ml, colocou-se 500 µl de sangue periférico ou medula óssea e adicionou-se 2 ml de solução de lise de glóbulos vermelhos, que contém 0,01 M Tris HCl (Tris Base, ULTROL[®] Grade, Calbioquem[®]), 320 mM Sucrose (D(+)-Sucrose, AppliChem), 5 mM de MgCl₂ e 1% Triton X100 (MpBiomedicals). Seguidamente, agitou-se durante 4 minutos à temperatura ambiente, centrifugou-se a mistura a 3.000 xg durante 5 minutos e descartou-se o sobrenadante. De seguida, adicionou-se 160 µl de solução de lise celular, que contém 4 M Tris HCl, 150 mM NaCl, 0,06 M EDTA (EDTA Na₂, MpBiomedicals) e 1% de SDS (SDS pure, AppliChem), e

incubou-se a mistura no banho a 65°C entre 15 a 20 minutos. Após arrefecimento da mistura à temperatura ambiente, adicionou-se 350 µl de clorofórmio frio e colocou-se numa placa giratória durante 30 a 60 minutos. De seguida e após centrifugação a 240 xg durante 2 minutos, recolheu-se o sobrenadante para um novo tubo de 1,5 mL, e descartou-se o pellet. Ao sobrenadante adicionou-se 420 µl de Etanol (MERCK) frio para precipitar o ADN. Com a ajuda de uma pipeta estéril colheu-se o novelo de ADN para um novo tubo 1,5 mL, e deixou-se secar à temperatura ambiente para evaporação do etanol. Por fim, ressuspendeu-se o ADN em 100 µl de tampão de eluição.

Após a obtenção das amostras de ADN genómico efetuou-se a quantificação da concentração e grau de pureza das amostras por espectrofotometria de absorção recorrendo ao *NanoDrop® 1000 Spectrophotometer*. O grau de pureza do ADN é determinado através da razão 260nm/280nm. Para a quantificação e determinação da pureza das amostras de ADN usou-se como referência o tampão de eluição no qual o ADN foi dissolvido, que se designou de branco. Foram consideradas apenas as amostras com grau de pureza entre 1.7 e 1.9, e cuja concentração de ADN fosse superior a 100 ng/µl. As amostras foram posteriormente armazenadas a -20 °C.

3.1.3. Análise do perfil de metilação dos genes *p15*, *p16*, *DAPK*, *p53*, *MGMT*, *TRAIL DcR1*, *TRAIL DcR2*, *TRAIL DR4* e *TRAIL DR5*

Para a análise do perfil de metilação dos genes *p15*, *p16*, *DAPK*, *p53*, *MGMT*, *TRAIL DcR1*, *TRAIL DcR2*, *TRAIL DR4* e *TRAIL DR5* foi realizado um PCR específico de metilação, o MS-PCR (*Methylation-Specific Polymerase Chain Reaction*). Para a deteção da metilação, o ADN genómico tem de ser previamente modificado com bissulfito, que vai converter os resíduos de citosina não metilados em uracilos, enquanto as citosinas metiladas permanecem inalteradas. Esta alteração permite a identificação dos genes que se encontrem metilados e desmetilados.

3.1.3.1. Modificação do ADN com Bissulfito

A modificação do ADN genómico, isto é, a conversão das citosinas não metiladas em uracilos, foi realizada através da utilização do kit de modificação *EZ DNA Methylation-Gold™ Kit*, da ZYMO RESEARCH, seguindo as instruções do fabricante.

Resumidamente, misturaram-se 100 ng de ADN genómico, num volume total de 20 µl, a 130 µl de *CT Conversion Reagent*, para proceder à modificação do ADN. Esta modificação é realizada através de um ciclo de desnaturação (98°C durante 10 minutos) passo onde ocorre a desnaturação do ADN, e um ciclo de conversão pelo bissulfito e temperatura, que ocorre a 64°C durante 2,5 horas, num termociclador (MyCycler™ BioRad). De seguida, o ADN modificado foi colocado numa coluna de purificação, *Zymo-Spin™ IC Column*, e após a adição de diferentes tampões de lavagem e centrifugações, obteve-se o ADN modificado puro. O ADN modificado foi guardado a -4°C para posterior utilização.

3.1.3.2. *Methylation-Specific Polymerase Chain Reaction (MS-PCR)*

O ADN modificado dos doentes e dos controlos foi posteriormente amplificado através da técnica de MS-PCR, segundo o protocolo definido por Herman *et al.* (1996) (Herman *et al.*, 1996), com algumas alterações.

Desta forma, ao ADN modificado foi adicionado um primer directo e um primer inverso, indicados na Tabela 5, numa concentração de 0,25 µM, mistura de dNTP's (desoxinucleótidos trifosfatados de adenina, guanina, citosina e timina) a 0,2 mM, cloreto de magnésio (NZYtech), tampão (reaction buffer for Supreme NZYTaQ DNA polymerase), aproximadamente 100 ng de ADN e 1 U de polimerase (Supreme NZYTaQ DNA polymerase, NZYtech).

A reacção de PCR iniciou-se com um ciclo de desnaturação inicial de 15 minutos a 95°C, seguida de 35 ciclos de desnaturação a 95°C durante 30 segundos, emparelhamento à temperatura, indicada na Tabela 5, durante 30 segundos e extensão a 72°C durante 30 segundos. A reacção foi finalizada com um ciclo de extensão de 10 minutos a 72°C, recorrendo-se novamente ao termociclador MyCycler™ BioRad. Foram também amplificados em simultâneo três amostras de controlo, uma amostra sem ADN, a que designamos de Branco, o controlo universal metilado e o controlo universal desmetilado (*EpiTect PCR Control DNA Set*, Qiagen).

Tabela 5 Sequência de Primers específicos utilizados no MS-PCR

	Primer	TE	Sequência do Primer	Tamanho (pb)	Referência
Alelo Metilado	<i>p15F</i>	60°C	5'-TAGTGAGGATTTCCGACGC-3'	148	(Herman <i>et al.</i> , 1996)
	<i>p15R</i>		5'-ACGACCGATCGTTAACTCCG-3'		
	<i>p16F</i>	65°C	5'-TTATTAGAGGGTGGGGCGGATCGC-3'	234	
	<i>p16R</i>		5'-GACCCCGAACCGCGACCGTAA-3'		
	<i>DAPKF</i>	60°C	5'-GGATAGTCGGATCGAGTTAACGTC-3'	100	(Russo <i>et al.</i> , 2005)
	<i>DAPKR</i>		5'-CCCTCCCAAACGCCG-3'		
	<i>p53F</i>	60°C	5'-TTCGGTAGGCGGATTATTTG-3'	193	(Gonzalez-Gomez <i>et al.</i> , 2003)
	<i>p53R</i>		5'-AAATATCCCGAAACCAAC-3'		
	<i>MGMTF</i>	66°C	5'-TTTCGACGTTTCGTAGGTTTTTCG-3'	81	(Esteller <i>et al.</i> , 2000)
	<i>MGMTR</i>		5'-GCACCTTCCGAAAACGAAACG-3'		
	<i>DR4F</i>	60°C	5'-TTCGAATTCGGGAGCGTAGC-3'	91	(Lee <i>et al.</i> , 2009)
	<i>DR4R</i>		5'-GTAATTCATCCTCCCGCGA-3'		
	<i>DR5F</i>	58°C	5'-GAGTAGTAAAAGATTAGTTCGCGTC-3'	199	
	<i>DR5R</i>		5'-CCGAAACGTTCTATCCCG-3'		
	<i>DcR1F</i>	60°C	5'-TTACGCGTACGAATTTAGTTAAC-3'	125	
	<i>DcR1R</i>		5'-ATCAACGACCGACCGAAACG-3'		
<i>DcR2F</i>	60°C	5'-GGGATAAAGCGTTTCGATC-3'	138		
<i>DcR2R</i>		5'-CGACAACAAAACCGCG-3'			
Alelo Desmetilado	<i>p15F</i>	60°C	5'-GTTAGAGTGAGGTGGGGTAGTGAGGATTTGTGATGT-3'	154	(Herman <i>et al.</i> , 1996)
	<i>p15R</i>		5'-TACAATAACCAACAACCAATCATTAACTCCA-3'		
	<i>p16F</i>	60°C	5'-TTATTAGAGGGTGGGGTGGATTGT-3'	234	
	<i>p16R</i>		5'-CAACCCCAAACCACAACCATAA-3'		
	<i>DAPKF</i>	60°C	5'-GGAGGATAGTTGGATTGAGTTAATGTT-3'	106	(Russo <i>et al.</i> , 2005)
	<i>DAPKR</i>		5'-CAATCCCTCCCAAACACCAA-3'		
	<i>p53F</i>	60°C	5'-TTGGTAGGTGATTATTGTTT-3'	247	(Gonzalez-Gomez <i>et al.</i> , 2003)
	<i>p53R</i>		5'-CCAATCAAAAAACATATCAC-3'		
	<i>MGMTF</i>	66°C	5'-TTTGTGTTTTGATGTTGTAGGTTTTGT-3'	93	(Esteller, <i>et al.</i> , 2000)
	<i>MGMTR</i>		5'-AATCCACACTCTCCAAAAACAAAACA-3'		
	<i>DR4F</i>	60°C	5'-GTAGTGATTTTGAATTTGGGAGGTAGT-3'	102	(Lee <i>et al.</i> , 2009)
	<i>DR4R</i>		5'-CTCATAATTCATCCCAACA-3'		
	<i>DR5F</i>	60°C	5'-TGTTTGAGTAGTAAAAGATTAGTTTGTGTT-3'	208	
	<i>DR5R</i>		5'-ACAACAAAACATTCTATCCCA-3'		
	<i>DcR1F</i>	60°C	5'-GAATTTTTTATGTGTATGAATTTAGTTAAT-3'	135	
	<i>DcR1R</i>		5'-CCATCAACAACAAAACA-3'		
<i>DcR2F</i>	60°C	5'-TTGGGATAAAGTGTTTGATT-3'	145		
<i>DcR2R</i>		5'-AAACCAACAACAAAACACA-3'			

Após a amplificação, os produtos da PCR foram analisados em gel de agarose (NZYtech) a 2%, corados com *GreenSafe* (NZYtech) e utilizando o marcador de pesos moleculares de 100 pb (NZYDNA Ladder V, NZYtech), e posteriormente analisados sob luz ultravioleta.

3.1.4. Avaliação dos níveis de metilação de 5-metilcitosina nos doentes com Síndrome Mielodisplásica

Para a avaliação da metilação global das amostras dos doentes com SMD foi efetuada a quantificação da 5-metilcitosina através do *5-Methylcytosine DNA ELISA kit*, da Enzo Life Sciences, seguido as indicações do fabricante.

A 100ng de ADN genómico foi adicionado tampão de revestimento até perfazer os 100µl, e para se proceder à sua desnaturação num termociclador (MyCycler™ BioRad) a 98°C durante 5 minutos, os tubos devem ser transferido de imediato para gelo. Posteriormente, adicionou-se o ADN aos poços da placa de ELISA e incubou-se a 37°C durante 1 hora. Após a incubação, foi efetuada uma série de lavagens com o tampão de ELISA, bem como uma nova incubação de 37°C durante 30 minutos com o mesmo tampão. De seguida, foi preparada a mix de anticorpos de acordo com o protocolo do fabricante, da qual se adicionou 100µl a cada poço, a que se seguiu um novo período de incubação a 37°C durante uma hora. Após a incubação, procedeu-se novamente a uma série de lavagens, que foram seguidas da adição de 100µl de HRP *developer* que deve ser deixado à temperatura ambiente entre 11 a 60 minutos para que este mude de cor. A leitura da absorvância nos comprimentos de onda de 405nm e 450nm foi efetuada num espectrofotómetro leitor de placas (Synergy™ HT Multi-Mode Microplate Reader, BioTek Instruments).

3.1.5. Análise estatística

O tratamento estatístico dos dados foi realizado através da utilização do programa SPSS (*Statistical Package for Social Sciences*). Após se verificar a normalidade da nossa população de doentes, pelo teste de *Kolmogorov-Smirnov*, optou-se pela utilização do teste não paramétrico de amostras independentes de *Kruskal-Wallis* na análise dos

Materiais e Métodos

parâmetros com valores absolutos. Para a análise da frequência de metilação dos vários genes utilizou-se o teste Chi-quadrado com o teste de simulações sucessivas de *Monte Carlo*. Em todos os teste realizados considerou-se um nível de significância estatística a 99% ($p < 0.05$).



Resultados

4. Resultados

4.1. Caracterização dos doentes com Síndrome Mielodisplásica e dos controlos não neoplásico

Este estudo foi realizado em 82 doentes com Síndrome Mielodisplásica, sendo 42 do sexo Feminino (F) e 40 do sexo Masculino (M), numa razão (F/M) de aproximadamente 1:1. A mediana de idades é de 76 anos, com um intervalo entre os 22 e os 92 anos. Estes doentes foram caracterizados segundo o sistema de classificação da Organização Mundial de Saúde, tendo em conta os critérios morfológicos e clínicos das células da medula óssea e do sangue periférico necessários para um correto diagnóstico dos doentes. Desta forma, dos 82 doentes estudados, 10 foram classificados como Citopenia Refratária com Displasia de Unilinhagem (CRDU), dos quais 7 como Anemia Refratária (AR), 2 com Neutropenia Refratária (NR) e 1 com Trombocitopenia Refratária (TR), 5 foram classificados como Anemia Refratária com Sideroblastos em Anel (ARSA), 41 com Citopenia Refratária com Displasia de Multilinhagens (CRDM), 3 como Citopenia Refratária com Displasia de Multilinhagens com Sideroblastos em Anel (CRDM-SA), 5 como Anemia Refratária com Excesso de Blastos tipo 1 (AREB-1), 9 como Anemia Refratária com Excesso de Blastos tipo 2 (AREB-2), 1 como Síndrome 5q- e 8 como Síndrome Mielodisplásica/Neoplasia Mieloproliferativa (SMD/NMP - LMMC) (Figura 9).

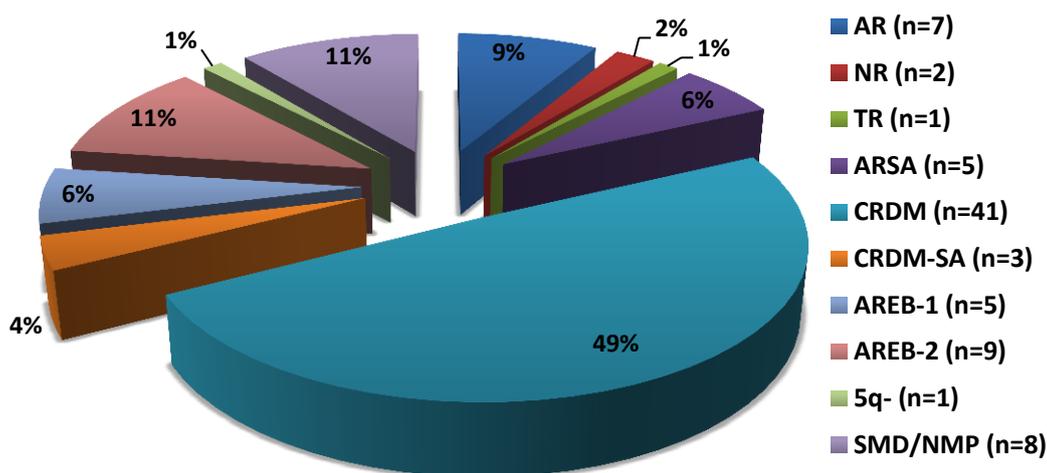


Figura 9 Caracterização da população de doentes com Síndrome Mielodisplásica de acordo com o sistema de classificação da Organização Mundial de Saúde. AR, Anemia Refratária; NR, Neutropenia Refratária; TR, Trombocitopenia Refratária; ARSA, Anemia Refratária com Sideroblastos em Anel; CRDM, Citopenia Refratária com Displasia de Multilinhagens; CRDM-SA, Citopenia Refratária com Displasia de Multilinhagens com Sideroblastos em Anel; AREB-1, Anemia Refratária com Excesso de Blastos-1; AREB-2, Anemia Refratária com Excesso de Blastos-2; 5q-, Síndrome 5q-; SMD/NMP, Síndrome Mielodisplásica/Neoplasia Mieloproliferativa

Resultados

Tendo em conta as características do cariótipo, a percentagem de blastos na medula óssea e as citopenias existentes, 63 doentes foram ainda classificados segundo o *International Prognostic Scoring System* (IPSS), em 3 grupos de risco: 12 de baixo risco, 42 de risco intermédio-1 e 9 de risco intermédio-2 (Figura 10). Apesar do IPSS estabelecer quatro grupos de prognóstico, nenhum dos doentes analisados neste estudo apresentava prognóstico de alto risco.

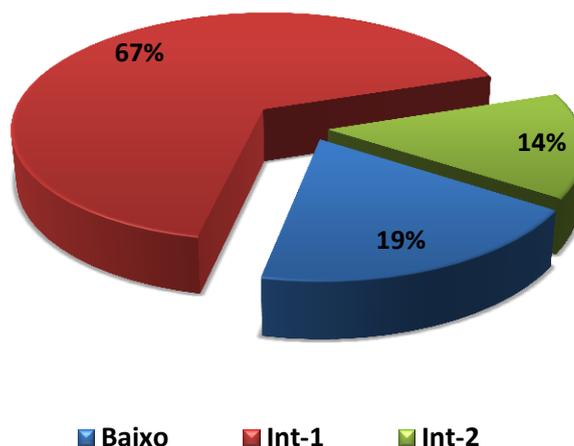


Figura 10 Caracterização da população de doentes com Síndrome Mielodisplásicas segundo o *International Prognostic Scoring System* (IPSS). Baixo, baixo risco; Int-1, risco intermédio 1; Int-2, risco intermédio 2.

Neste estudo foram ainda envolvidos 14 controlos não neoplásicos, indivíduos sem critérios de diagnóstico de neoplasia, dos quais 3 do sexo feminino e 11 do sexo masculino, com mediana de idades de 71 anos, num intervalo entre os 34 e os 86 anos.

4.2. Avaliação do perfil de metilação dos genes supressores tumorais e de recetores de morte em doentes com Síndrome Mielodisplásica

A análise do perfil de metilação dos promotores dos genes supressores tumorais *p15*, *p16*, *p53*, *DAPK* e *MGMT*, e dos recetores de morte da família do TRAIL, *TRAIL DcR1*, *TRAIL DcR2*, *TRAIL DR4* e *TRAIL DR5*, foi realizada por PCR específico de metilação como o descrito na secção 3.1.3.2.. Esta análise foi efetuada em amostras de sangue periférico (SP) e de medula óssea (MO) dos doentes com Síndrome Mielodisplásica e dos controlos. A figura 11 representa um gel de agarose a 4%

representativo da análise da metilação no SP e MO dos genes *p15* e *p16* obtida por PCR-específico de metilação da amplificação do ADN genómico modificado.

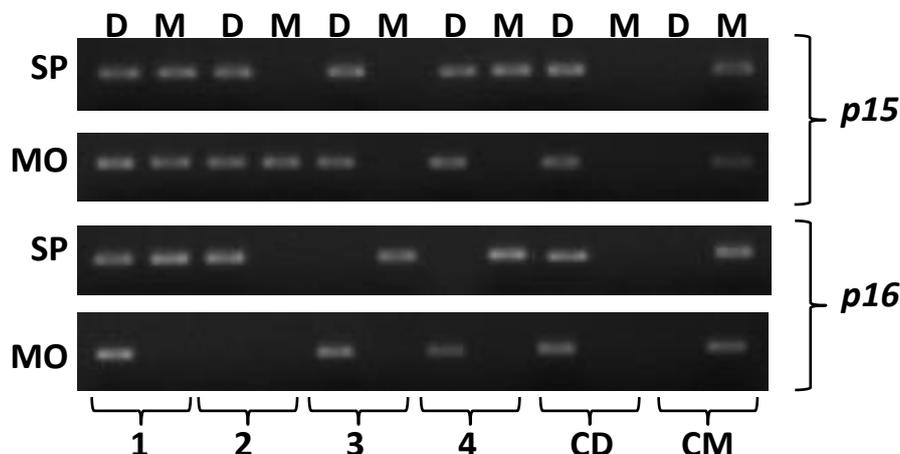


Figura 11 Gel de agarose representativo dos resultados obtidos por PCR-específico de metilação (MS-PCR) dos genes *p15* e *p16* em amostras de sangue periférico (SP) e de medula óssea (MO) de quatro dos doentes com Síndrome Mielodisplásica. 4: amostras de doentes; M, alelo metilado; D, alelo desmetilado; CD: controlo universal desmetilado; CM: Controlo universal metilado.

Inicialmente, fomos comparar o perfil de metilação entre as amostras de medula óssea (MO) de controlos e de doentes com Síndrome Mielodisplásica.

Como podemos ver na figura 12, os controlos e doentes com SMD não apresentam metilação dos promotores dos genes *p53* e *MGMT*. Além disso, apenas as amostras dos doentes com SMD apresentam metilação das regiões promotoras dos genes *p16*, *TRAIL DcR1*, *TRAIL DcR2*, *TRAIL DR4* e *TRAIL DR5*. Por outro lado, verificou-se aumento da frequência de metilação nos promotores dos genes *p15* e *DAPK* nos doentes com SMD (*p15*: 61,5%; *DAPK*: 61,5%), relativamente aos controlos (*p15*: 52,9%; *DAPK*: 50%). Tendo em conta o número de genes metilado por cada amostra verificamos que as amostras dos doentes com SMD apresentam um maior número de genes metilados, comparativamente aos controlos. De facto, cerca de 83,3% dos doentes SMD apresentam pelo menos 1 gene metilado, enquanto que em apenas 42,9% dos controlos isto se verifica ($p < 0,05$, Figura 12)

Resultados

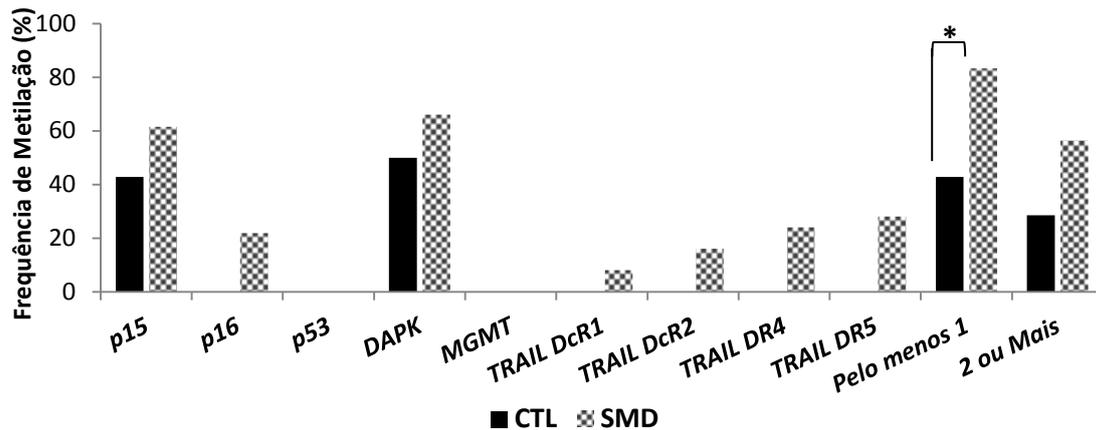


Figura 12 Avaliação do perfil de metilação dos genes *p15*, *p16*, *p53*, *DAPK*, *MGMT*, *TRAIL DcR1*, *TRAIL DcR2*, *TRAIL DR4* e *TRAIL DR5* em amostras de medula óssea (MO) de indivíduos controle (CTL) e de doentes com Síndrome Mielodisplásica (SMD). * $p < 0.05$

Seguidamente analisaram-se as frequências de metilação nos mesmos genes nas amostras de sangue periférico e compararam-se com as obtidas na MO (Figura 13). Tal como observado nas amostras de medula óssea, as regiões promotoras dos genes *p53* e *MGMT* encontram-se desmetiladas no sangue periférico de doentes e controlos. Relativamente à frequência de metilação dos restantes genes nas amostras de sangue periférico, podemos observar que, de uma forma geral, não existem diferenças significativas na metilação entre os dois tipos de amostras, nomeadamente no que diz respeito à metilação do promotor do gene *p16* (SP: 22,7%; MO: 21,8%), *DAPK* (SP: 59,1%; MO:66%) e do *TRAIL DR5* (SP: 29,5%; MO: 28%). Porém, podemos destacar a diferença observada na metilação da região promotora do gene *p15* (SP: 88,6%; MO: 61,5%).

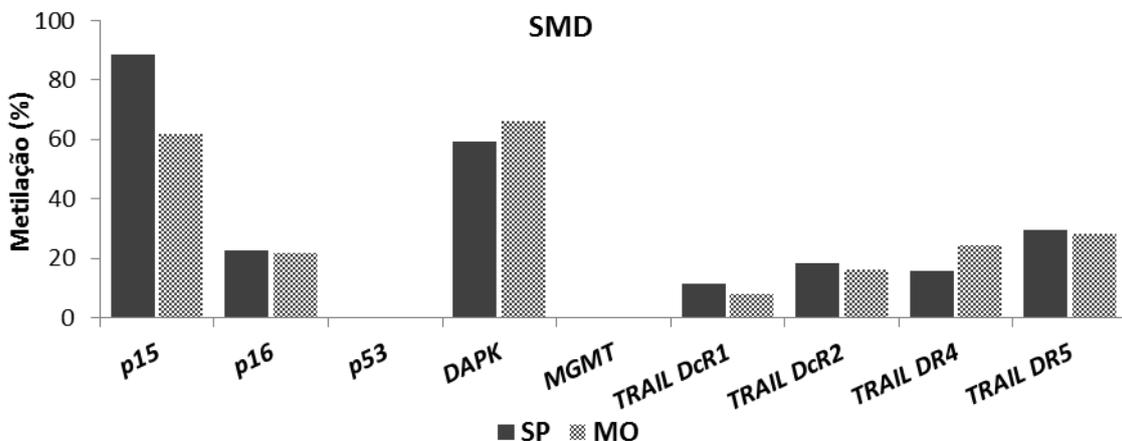


Figura 13 Avaliação do perfil de metilação dos genes *p15*, *p16*, *p53*, *DAPK*, *MGMT*, *TRAIL DcR1*, *TRAIL DcR2*, *TRAIL DR4* e *TRAIL DR5* em amostras de sangue periférico (SP) e de medula óssea (MO) de doentes com Síndrome Mielodisplásica (SMD).

De modo a verificar o grau de concordância do padrão de metilação entre amostras de sangue periférico e de medula óssea dos doentes com SMD, fomos avaliar a percentagem de concordância entre os dois tipos de amostras para os vários genes (figura 14). Assim, podemos verificar (figura 14) que todos os genes estudados apresentam percentagens de concordância relativamente elevadas (*p15*: 72,5%, *p16*: 77,5%, TRAIL *DcR1*: 85%, TRAIL *DcR2*: 65%, TRAIL *DR4*: 62,5%) sem significado estatístico ($p > 0,05$), com exceção para o gene TRAIL *DR5* que apresenta um valor de concordância consideravelmente mais baixo (40%) que os restantes genes com significado estatístico ($p = 0,031$). O gene DAPK apresenta um grau de concordância bastante considerável de 67,5%, mas também ele com diferenças estatisticamente significativas ($p = 0,046$).

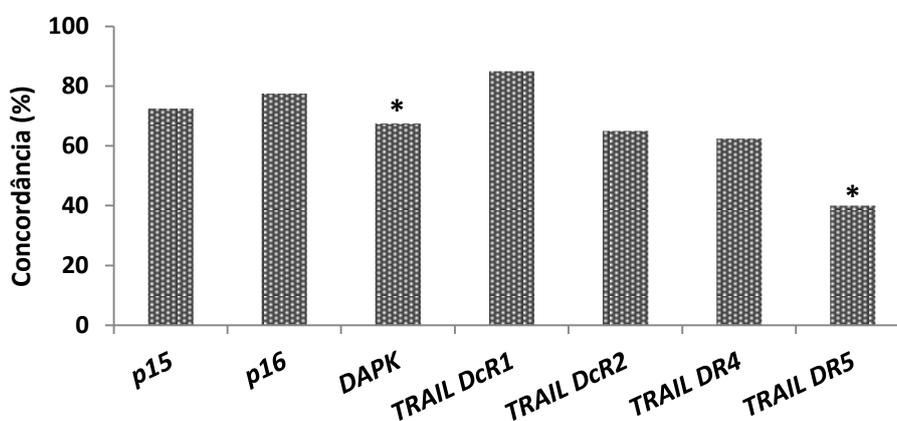


Figura 14 Percentagem de concordância do perfil de metilação dos genes *p15*, *p16*, DAPK, TRAIL *DcR1*, TRAIL *DcR2*, TRAIL *DR4* e TRAIL *DR5* de amostras com resultados concordantes entre amostras de sangue periférico (SP) e de medula óssea (MO) de doentes com Síndrome Mielodisplásica (SMD).
* $p < 0,05$

No entanto, e como um dos objetivos do nosso trabalho é verificar se podemos utilizar amostras de sangue periférico em substituição das amostras de medula óssea, fomos calcular a concordância apenas em doentes que apresentam metilação dos genes na medula óssea.

Como podemos observar na tabela 6, existe de fato alguma concordância entre amostras de MO e de SP, mas sem qualquer significado estatístico devido ao número de amostras. Podemos no entanto destacar a elevada concordância no perfil de metilação dos genes *p15* e DAPK.

Resultados

Tabela 6 Percentagem de concordância e número de amostras concordantes para o perfil de metilação dos genes *p15*, *p16*, *DAPK*, *TRAIL DcR1*, *TRAIL DcR2*, *TRAIL DR4* e *TRAIL DR5* em doentes com Síndrome Mielodisplásica com metilação na medula óssea

	<i>p15</i>	<i>p16</i>	<i>DAPK</i>	<i>TRAIL DcR1</i>	<i>TRAIL DcR2</i>	<i>TRAIL DR4</i>	<i>TRAIL DR5</i>
Concordância (%)	96,5	60	72	0	0	10	7,1
Nº de Amostras concordantes (Nº total de Amostras)	28 (29)	3 (5)	18 (25)	0 (2)	0 (6)	1 (10)	1 (14)

È importante ainda referir que todas as discrepâncias que observamos são bidirecionais, isto é, observamos amostras de sangue periférico positivas e medula óssea negativa, e vice-versa.

Por último, fomos analisar as amostras com metilação de pelo menos um ou dois ou mais genes. Deste modo, como podemos observar na tabela 7, 97,7% das amostras de SP e 83,3% das amostras de MO apresentam pelo menos um dos genes metilados.

Contudo, quando analisamos a percentagem de amostras com metilação de promotores de dois ou mais genes, verificamos uma redução considerável nos dois tipos de amostras (SP: 79,5%; MO: 56,4%), porém mais acentuada nas amostras de MO.

Tabela 7 Percentagem de amostras de sangue periférico (SP) e de medula óssea (MO) dos doentes com Síndrome Mielodisplásica com metilação de pelo menos um dos genes estudados (pelo menos 1) ou com metilação de dois ou mais genes (2 ou mais).

	SMD	
	SP % (n)	MO % (n)
Pelo menos 1	97,7 43/44	83,3 65/78
2 ou mais	79,5 35/44	56,4 44/78

4.2.1. Avaliação do perfil de metilação dos genes *p15*, *p16*, *DAPK*, *TRAIL DcR2*, *TRAIL DR4* e *TRAIL DR5* de acordo com os subtipos SMD da classificação da Organização Mundial de Saúde.

Posteriormente, procedemos á análise do perfil de metilação da região promotora dos vários genes tendo em conta os diferentes subtipos de SMD definidos pela Organização Mundial de Saúde (OMS). Para esta análise, foram considerados os subtipos CRDU, que inclui os 7 doentes com AR, os 2 com NR e 1 doente com TR, e ARSA/CRDM-SA, incluindo respetivamente 5 e 3 doentes. De referir que não foi feita a análise do subtipo 5q- uma vez que a nossa população possui apenas um doente deste subtipo, que não nos permite estabelecer uma relação.

Para correlacionar os subtipos de SMD com a metilação dos genes em estudo, fomos tentar perceber se a metilação das regiões promotoras de genes é comum a todos os subtipos de SMD. Como podemos verificar através da figura 15, observa-se elevado número de doentes com pelo menos um gene metilado nas amostras de SP de todos os subtipos de SMD, à exceção das amostras de doentes incluídos no subtipo CRDU. Quando analisamos as amostras de MO, verificamos uma redução na percentagem de amostras com pelo menos um gene metilado relativamente às amostras de SP, bem como diminuição da frequência de metilação nos subtipos mais avançados da doença.

Quando analisamos a percentagem de amostras com dois ou mais genes metilados observamos uma maior heterogeneidade entre os vários subtipos de SMD e uma diminuição considerável em comparação à percentagem de amostras com pelo menos um dos genes metilados (Figura 15). No entanto, verificamos que o padrão de metilação se mantém nas amostras de MO, isto é, à semelhança do que observámos na análise da metilação de pelo menos um dos genes, há uma diminuição da metilação nos subtipos mais avançados da doença. Podemos ainda destacar que os doentes do subtipo AREB-2 são os que apresentam menor percentagem de amostras com dois ou mais genes metilados, comparativamente aos restantes subtipos.

Resultados

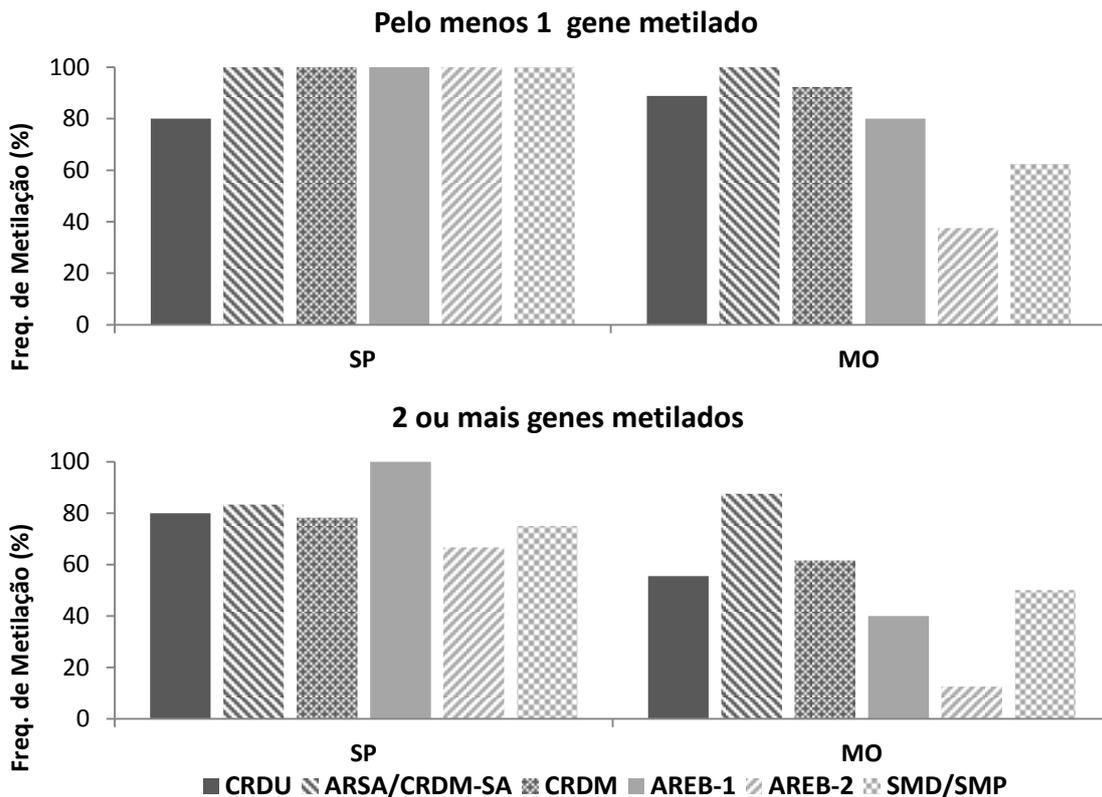
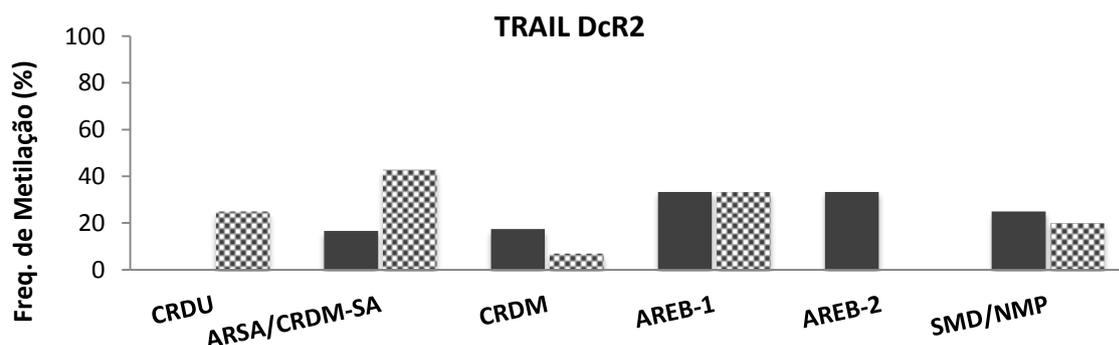
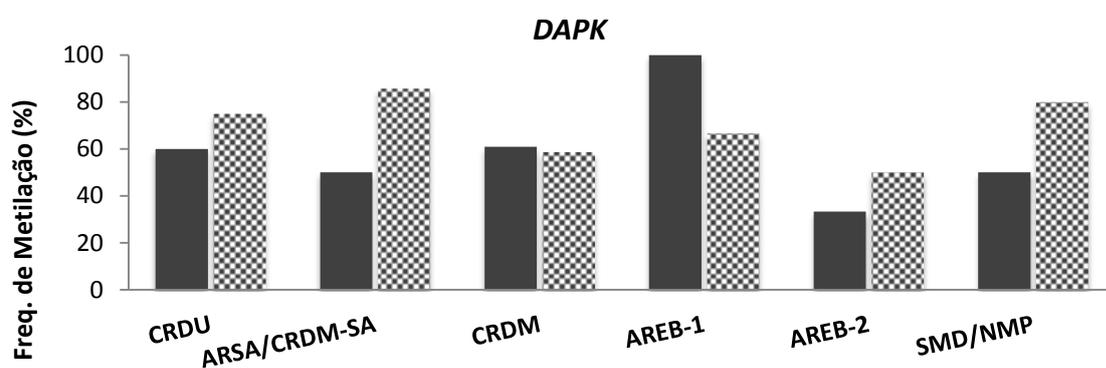
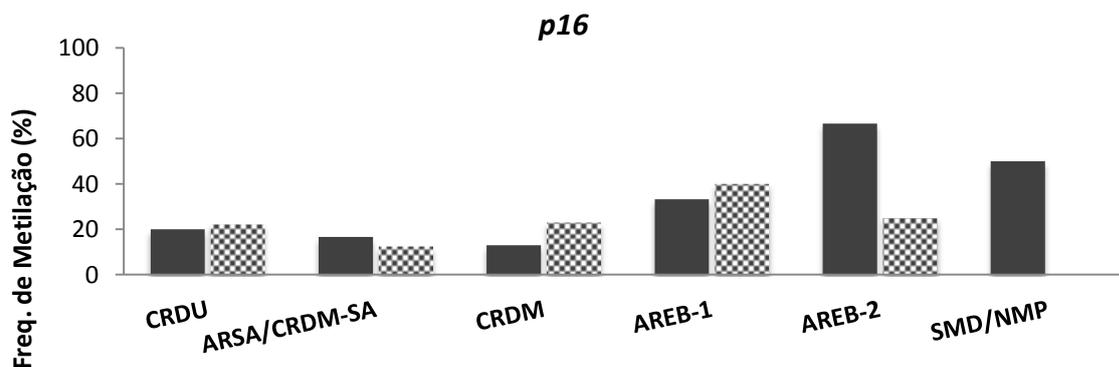
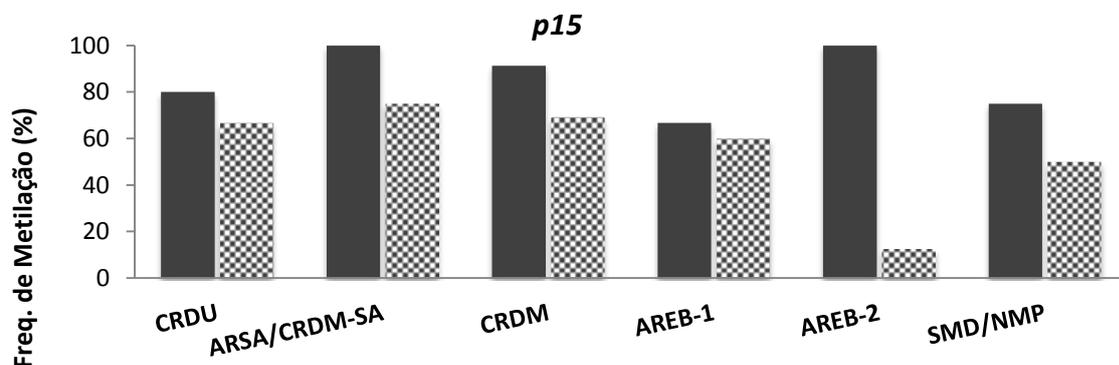


Figura 15 Frequência de metilação em amostras de sangue periférico (SP) e de medula óssea (MO) com metilação de pelo menos um dos genes metilados ou com dois ou mais genes metilados, em doentes com Síndrome Mielodisplásica (SMD) de acordo com o subtipo da Organização Mundial de Saúde. CRDU, Citopenia Refratária com Displasia de Unilinhagem; ARSA/CRDM-SA, Anemia Refratária com Sideroblastos em Anel/Citopenia Refratária com Displasia de Multilinhagens e Sideroblastos em Anel; CRDM, Citopenia Refratária com Displasia de Multilinhagens; AREB-1, Anemia Refratária com Excesso de Blastos-1; AREB-2, Anemia Refratária com Excesso de Blastos-2; SMS/SMP, Síndrome Mielodisplásica/Neoplasia Mieloproliferativa

Posteriormente, procedemos à análise isolada de cada um dos genes de acordo com os subtipos da doença. No entanto, a análise do perfil de metilação do gene *TRAIL* *DcR1* não foi incluída, devido ao número muito reduzido de amostras metiladas.

Como podemos observar na figura 16, a região promotora do gene *p15* encontra-se metilada em todos os subtipos de SMD, no entanto a frequência de metilação nas amostras de medula óssea dos doentes com AREB-2 está significativamente reduzida quando comparada às amostras de SP, bem como às amostras relativas aos restantes subgrupos. Também no caso do gene *p16*, podemos verificar que se encontra metilado em doentes pertencentes a todos os subtipos estudados, no entanto observamos um ligeiro aumento da frequência de metilação nos subtipos mais avançados da doença,

AREB-1 e AREB-2. O gene *DAPK* também apresenta elevada frequência de metilação nos doentes com SMD, sendo apenas ligeiramente inferior nos doentes do subtipo AREB-2. No que diz respeito aos genes que codificam os recetores do TRAIL, todos apresentam, de uma forma geral, frequências de metilação relativamente baixas e variáveis entre os vários subtipos.



Resultados

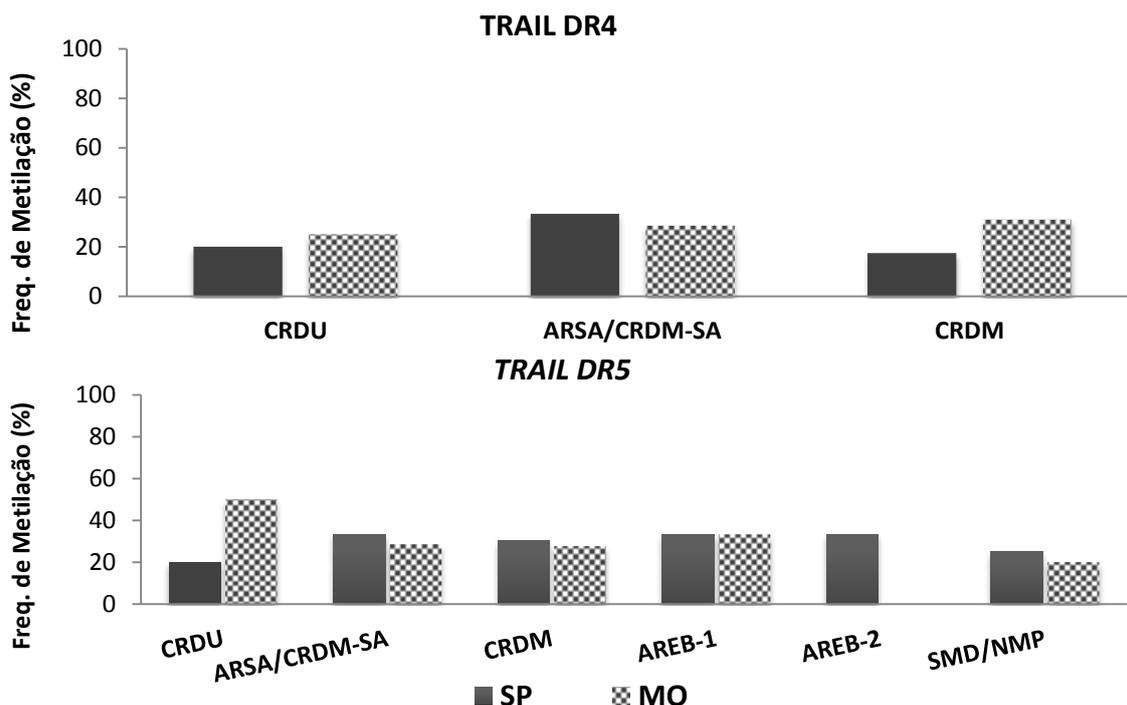


Figura 16 Avaliação do perfil de metilação dos genes *p15*, *p16*, *DAPK* e *TRAIL DcR2* em amostras de sangue periférico (SP) e de medula óssea (MO) de doentes com Síndrome Mielodisplásica de acordo com os subtipos definidos pela Organização Mundial de Saúde. CRDU, Citopenia Refratária com Displasia de Unilinhagens; ARSA/CRDM-SA, Anemia Refratária com Sideroblastos em Anel/Citopenia Refratária com Displasia de Multilinhagens com Sideroblastos em Anel; CRDM, Citopenia Refratária com Displasia de Multilinhagens; AREB-1, Anemia Refratária com Excesso de Blastos-1; AREB-2, Anemia Refratária com Excesso de Blastos-2; SMD/NMP, Síndrome Mielodisplásica/Neoplasia Mieloproliferativa

No entanto, é importante destacar que o gene *TRAIL DR4* apresenta metilação do seu promotor apenas nos subtipos CRDU, ARSA/CRDM-SA e CRDM. Devido ao reduzido número de amostra em cada subtipo de SMD, a análise estatística da comparação da frequência de metilação entre as amostras de sangue periférico e de medula óssea só foi efetuada nos doentes do subtipo CRDM. Deste modo, verificamos que apenas o perfil de metilação do gene *TRAIL DR5* apresenta diferenças estatisticamente significativas ($p=0,044$).

4.2.2. Relação entre o perfil de metilação dos genes *p15*, *p16*, *DAPK*, *TRAIL DcR2*, *TRAIL DR4* e *TRAIL DR5* e o índice de prognóstico *International Prognostic Scoring System* em doentes Síndrome Mielodisplásica

Para avaliarmos se existe uma relação entre o perfil de metilação e os diferentes grupos de risco do IPSS, fomos analisar a metilação dos genes em estudo em cada um

dos grupos de risco (Tabela 8). Deste modo, como podemos observar na tabela 8, todas as amostras de SP apresentam metilação no promotor de pelo menos um dos genes, independentemente do grupo de risco. No entanto, na análise da metilação de dois ou mais genes em amostras de SP verificamos diminuição da frequência de metilação nos doentes incluídos no grupo de risco intermédio-2.

As amostras de MO destes doentes apresentam ligeira diminuição da frequência de metilação relativamente às amostras de SP, relativamente à metilação de pelo menos um gene. Quando avaliamos a metilação de dois ou mais genes na MO podemos observar diminuição da frequência de metilação comparativamente às amostras de SP e às frequências de metilação pelo menos um dos genes metilados. Por outro lado, observamos que a frequência de metilação nas amostras de SP e de MO diminui à medida que aumenta o risco (Tabela 8).

Tabela 8 Percentagem de metilação de pelo menos um dos genes ou de dois ou mais genes em amostras de sangue periférico (SP) e de medula óssea (MO) nos doentes com Síndrome Mielodisplásica de acordo com o grupo risco do *International Prognostic Scoring System* (IPSS).

		Pelo menos 1 gene metilado (%)	2 ou mais genes metilados (%)
Baixo Risco	SP	100	100
	MO	91,7	75
Risco Intermédio-1	SP	100	78,9
	MO	85	47,5
Risco Intermédio-2	SP	100	100
	MO	44,4	33,3

Posteriormente, avaliou-se a relação do perfil de metilação de cada gene de acordo com os grupos de risco prognóstico (figura 17).

Relativamente à metilação do promotor do gene *DAPK*, verificamos que é bastante heterogénea, quer entre os vários grupos de risco, quer entre as amostras de SP e de MO. No que diz respeito ao gene *TRAIL DcR2*, podemos observar que apresenta

Resultados

percentagem de metilação ligeiramente elevada nas amostras de MO dos doentes incluídos no grupo de baixo risco, no entanto, observamos também aumento considerável de metilação nas amostras de SP nos doentes de risco intermédio-2. As amostras de SP dos doentes com SMD analisadas apresentam menor frequência de metilação do gene TRAIL DR4 com o aumento do risco da doença, estando mesmo ausente nos doentes de risco intermédio-2. Este facto não se verifica nas amostras de MO, que apresentam uma percentagem de metilação deste gene semelhante em todos os grupos de risco. Por último, o gene TRAIL DR5 não apresenta grandes variações de metilação entre os vários grupos de risco.

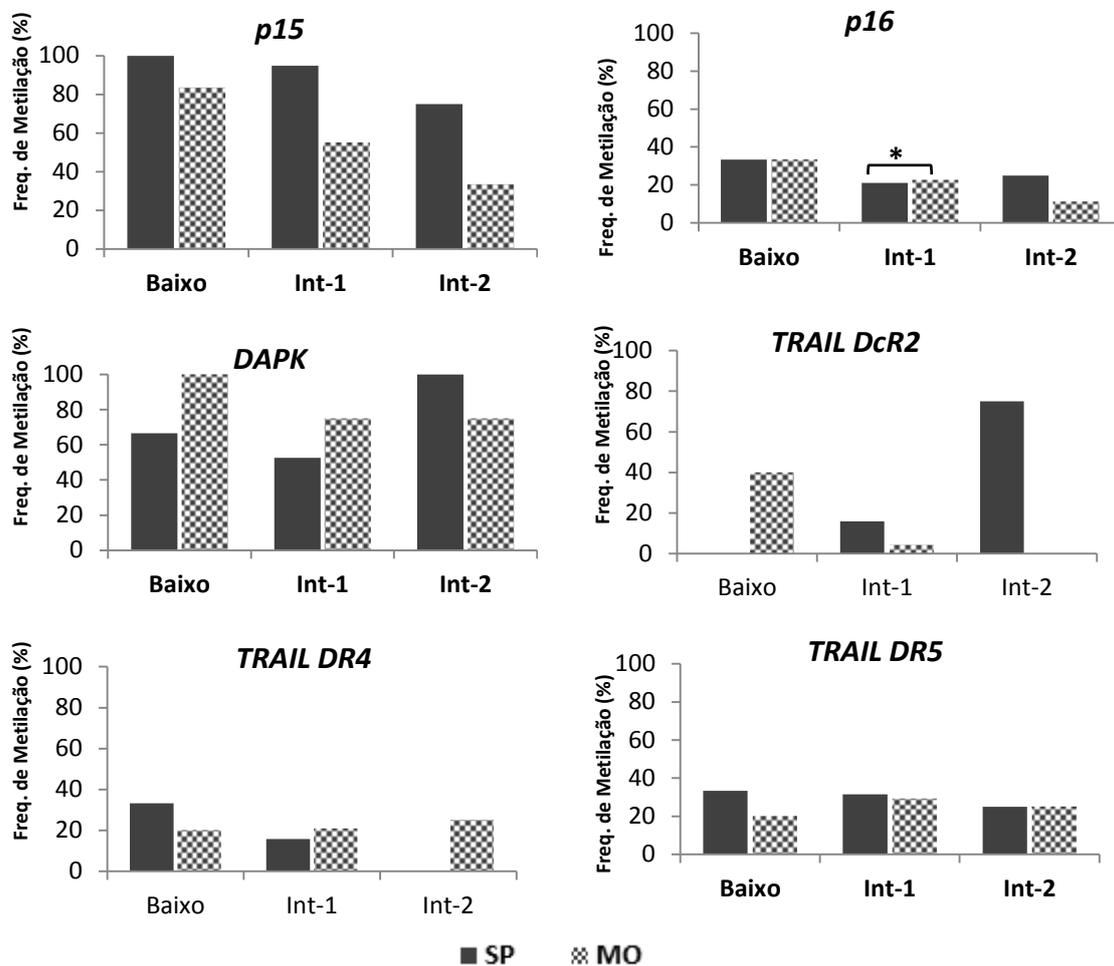


Figura 17 Avaliação da do perfil de metilação dos genes *p15*, *p16*, *DAPK*, *TRAIL DcR2*, *TRAIL DR4* e *TRAIL DR5* nas amostras de sangue periférico (SP) e de medula óssea (MO) de doentes com Síndrome Mielodisplásica (SMD) de acordo com o *International Prognostic Scoring System* (IPSS). Baixo - risco baixo; Int-1 - risco intermédio 1; Int-2 - risco intermédio 2.

A análise estatística da relação entre amostras de sangue periférico e de medula óssea tendo em conta os vários grupos de risco também só pode ser efetuada no grupo de risco Intermédio-1 devido ao maior número de doentes nele incluído. Deste modo, verificámos que apenas há significado estatístico na relação entre amostras de SP e MO avaliadas para o gene *p16* ($p=0.044$).

4.2.3. Análise dos níveis séricos de folato e a sua relação com o perfil de metilação

Posteriormente, fomos verificar se o perfil de metilação dos genes em estudo se correlaciona com os níveis séricos de folato, uma vez que o folato é co-factor na remetilação da homocisteína a metionina, garantindo desta forma a formação de S-adenosilmetionina, o principal dador de grupos metilo na metilação do ADN. No entanto, para podermos fazer uma análise mais detalhada dividimos os doentes de acordo com a gama de valores considerada normal para este parâmetro.

Deste modo, considerámos os valores normais para o folato entre 1 e 20 ng/ml, tendo em conta este valor dividimos os doentes em três grupos distintos, um grupo que inclui doentes com valores séricos de folato entre 1 e 10 ng/ml e que designamos de grupo Baixo (B) e que inclui mais de 50% dos doentes (tabela 9), um grupo doentes com valores entre 11 e 20 ng/ml (Grupo Aumentado - A) e um grupo com doentes cujos valores de folato sérico são superiores a 20 ng/ml (Grupo Elevado - E).

Tabela 9 Distribuição dos doentes com Síndrome Mielodisplásica de acordo com os níveis séricos de Folato

	Concentração sérica de Folato (ng/ml)	Nº de Doentes
Grupo B	1-10	30
Grupo A	11-20	8
Grupo E	>20	18

Na análise dos vários genes em estudo e os grupos definidos de acordo com os níveis de folato (Figura 18), verificámos que na metilação do gene *p15* em amostras de sangue periférico, os doentes incluídos no grupo A têm uma frequência de metilação mais reduzida que nos grupos B e E, sendo que nas amostras de MO este padrão se

Resultados

repete mas com frequências de metilação mais reduzidas que nas amostras de SP. No que diz respeito ao gene *p16* podemos observar que a sua frequência de metilação é mais elevada nos grupos B e A, estando mesmo ausente em amostras de sangue periférico dos doentes com níveis elevados de folato (grupo E). Relativamente à frequência de metilação do promotor do gene *DAPK* podemos observar que nas amostras de SP há uma tendência para aumento da frequência à medida que aumenta a concentração de folato, no entanto este padrão inverte nas amostras de MO. Também o gene *TRAIL DcR1* apresenta aumento de frequência de metilação com o aumento dos níveis de folato nas amostras de SP. Já para o gene *TRAIL DcR2* observou-se diminuição na sua frequência de metilação nas amostras de MO com o aumento da concentração de folato. Nos genes que codificam os recetores de morte, verificamos que, o *TRAIL DR4* apresenta elevada frequência de metilação nas amostras de SP nos doentes incluídos no grupo A e que nenhuma das amostras de MO dos mesmos doentes apresenta metilação do gene *TRAIL DR5*.

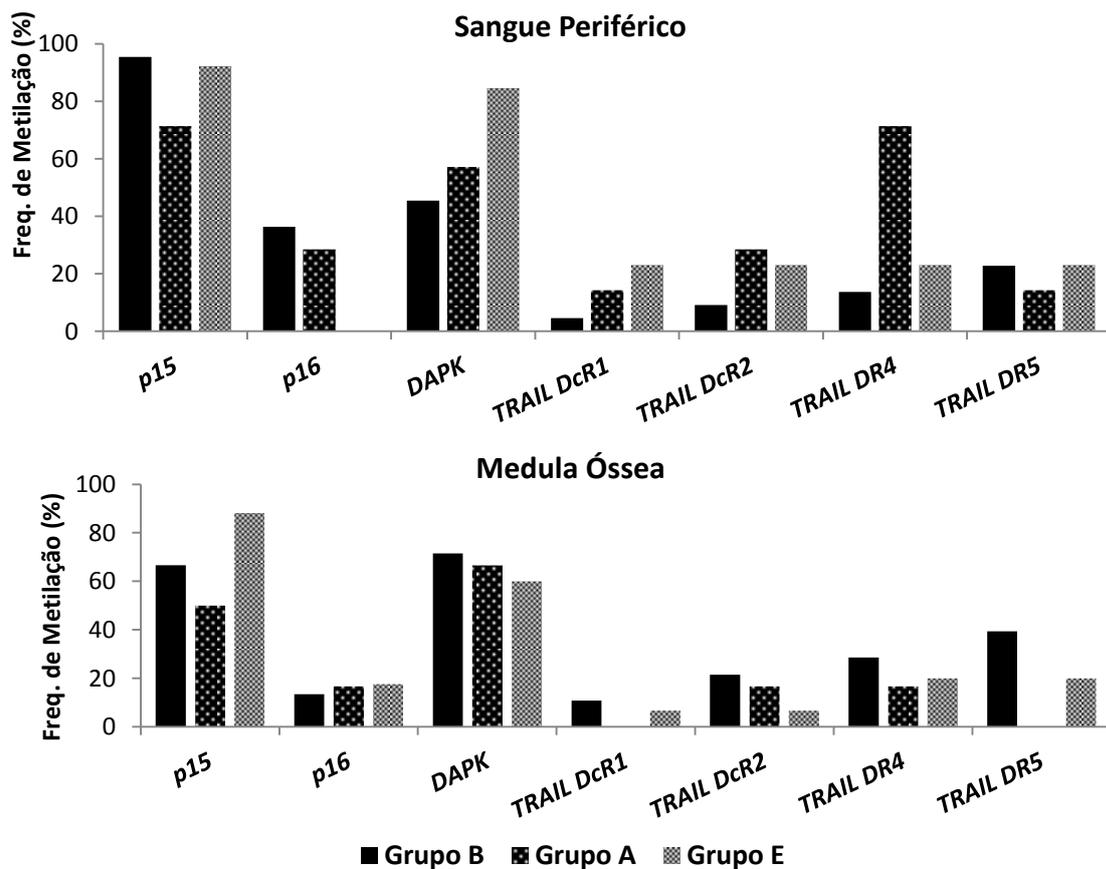


Figura 18 Análise do perfil de metilação dos genes *p15*, *p16*, *DAPK*, *TRAIL DcR1*, *TRAIL DcR2*, *TRAIL DR4* e *TRAIL DR5* em amostras de sangue periférico (SP) e de medula óssea (MO) de doentes com Síndrome Mielodisplásica distribuídos de acordo com os níveis séricos de Folato. Grupo B: 1-10 ng/ml; Grupo A: 11-20 ng/ml; Grupo E: >20 ng/ml.

4.2.4. Análise dos níveis séricos de vitamina B12 e a sua relação com o perfil de metilação

Posteriormente, procedemos a uma análise semelhante para os níveis séricos de vitamina B12, deste modo, considerando como valores normais de vitamina B12 no sangue 210-900 pg/ml, distribuímos os doentes em três grupo. O grupo com níveis sérico de vitamina B12 baixo entre 210-555 pg/ml a que designámos Grupo B, o grupo que inclui doentes com níveis altos (Grupo A) de vitamina B12, entre 556-900 pg/m, e por último um grupo que inclui os doentes apresentam níveis de vitamina B12 elevados, ou seja superiores a 900 pg/ml sangue (Grupo E) (tabela 10).

Tabela 10 Distribuição dos doentes com Síndrome Mielodisplásica de acordo com os níveis séricos de Vitamina B12

	Concentração sérica de Vitamina B12 (pg/ml)	Nº de Doentes
Grupo B	210-555	23
Grupo A	556-900	14
Grupo E	>900	19

Por último estudamos a relação entre o perfil de metilação dos vários genes em estudo e os grupos de doentes que têm em conta os valores séricos de vitamina B12 (Figura 19). Como podemos observar pela figura 19, os valores da percentagem de metilação do gene *p15* nas amostras de SP são consideravelmente elevados nos doentes dos grupos A e E, no entanto, quando avaliamos as amostras de MO verificamos tendência para redução na frequência de metilação do gene *p15* proporcional ao aumento da concentração de vitamina B12. A metilação do gene *p16* em amostras de SP parece ser ligeiramente superior nos doentes com valores aumentados de vitamina B12 (grupo A e E). No caso do gene *DAPK* verificamos haver aumento da sua frequência de metilação com o aumento da concentração de vitamina B12, em amostras de SP e de MO. No que diz respeito aos genes que codificam os recetores do TRAIL, podemos observar que o seu perfil de metilação é relativamente baixo em todos os grupos, no entanto verificamos ligeiro aumento na metilação do gene TRAIL *DcR2* com maiores níveis de concentração vitamina B12, bem como elevada frequência de metilação do gene

Resultados

TRAIL *DR4* verificada nas amostras de medula óssea dos doentes com concentrações altas de vitamina B12 (Grupo A). Podemos, ainda, destacar a grande percentagem de amostras de sangue periférico com metilação do promotor do gene TRAIL *DR5* nos doentes incluídos no grupo E.

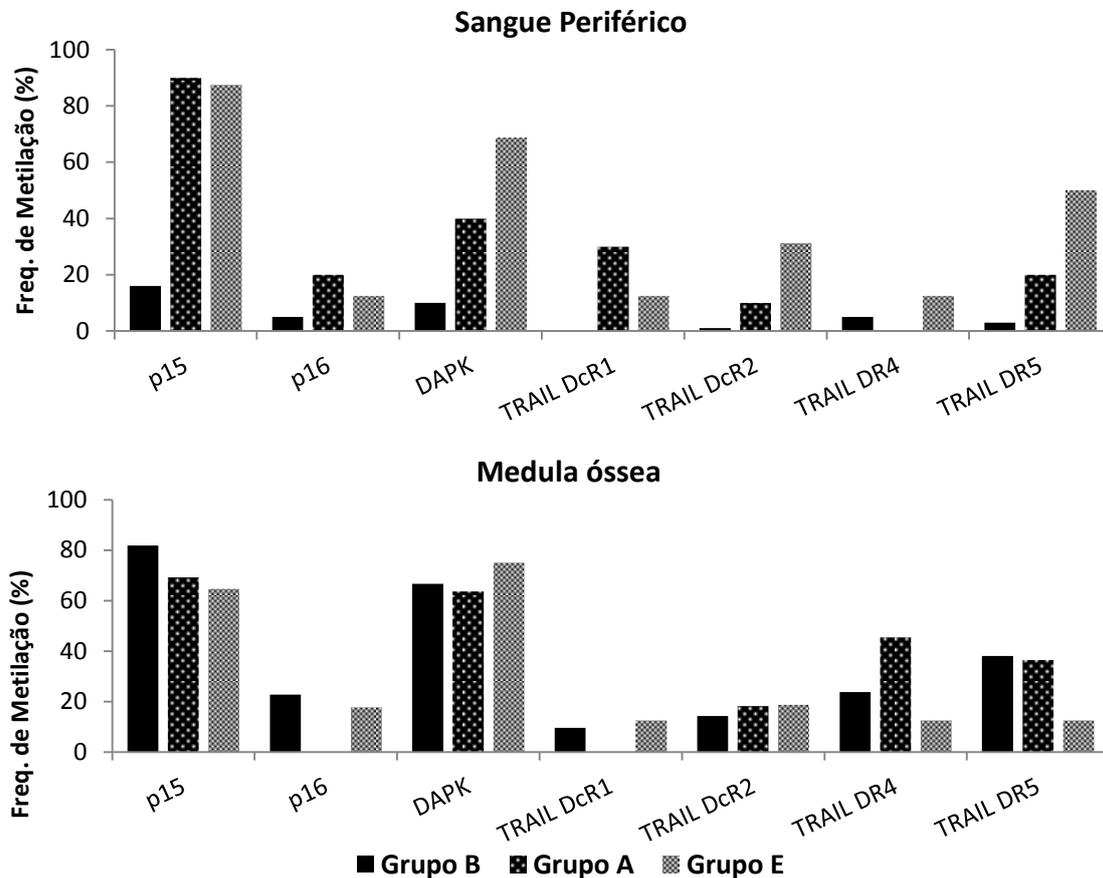


Figura 19 Análise do perfil de metilação dos genes *p15*, *p16*, *DAPK*, *TRAIL DcR1*, *TRAIL DcR2*, *TRAIL DR4* e *TRAIL DR5* em amostras de sangue periférico (SP) e de medula óssea (MO) de doentes com Síndrome Mielodisplásica distribuídos de acordo com os níveis séricos de Vitamina B12. Grupo B: 210-555 pg/ml; Grupo A: 556-900 pg/ml; Grupo E: >900 pg/ml.

4.2.5. Avaliação dos níveis de metilação de 5-metilcitosina em doentes com Síndrome Mielodisplásica

Como última análise, quantificámos os níveis de 5-metilcitosina (5mC) através da técnica de ELISA, de modo a avaliarmos a metilação global nos doentes com SMD, comparando-os ainda com os vários subtipos da doença, os grupos de risco e com os níveis séricos de folato e de vitamina B12.

Como podemos observar na figura 20, a percentagem de 5mC é ligeiramente mais elevada nos doentes com SMD ($8,4 \pm 4,9$), quando comparada à dos controlos ($1,4 \pm 0,518$) no entanto as diferenças não tem significado estatístico.

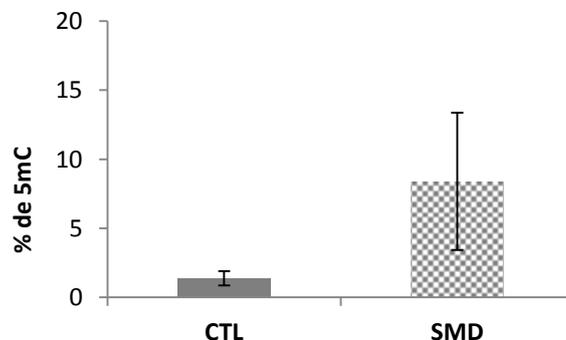


Figura 20 Percentagem de 5-metilcitocina (5mC) nas amostras controlo (CTL) e nas amostras de doentes com Síndrome Mielodisplásica (SMD). Os resultados expressos em percentagem (%) representando a média \pm desvio padrão de cada população.

Quando comparamos os níveis de 5-metilcitocina com os vários subtipos de SMD (figura 21), verificamos que estes variam entre os vários subtipos, sendo os doentes AREB2 os que apresentam níveis mais elevados e os CRDM os níveis mais baixos.

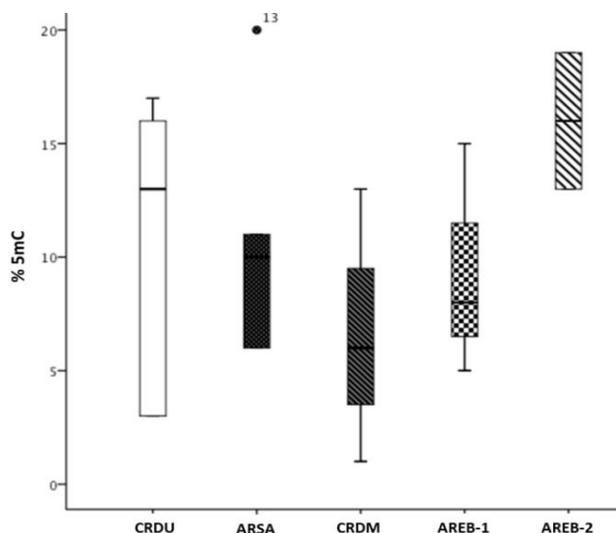


Figura 21 Relação entre a percentagem de 5-metilcitocina (5mC) e os subtipos de Síndrome Mielodisplásica definidos pela Organização Mundial de Saúde (OMS). CRDU, Citopenia Refratária com Displasia de Unilinhagem; ARSA, Anemia Refratária com Sideroblastos em Anel; CRDM, Citopenia Refratária com Displasia de Multilinhagens; AREB-1, Anemia Refratária com Excesso de Blastos-1; AREB-2, Anemia Refratária com Excesso de Blastos-2.

Quando avaliamos a relação da percentagem de 5-metilcitocina e os vários grupos de risco prognóstico do IPSS (figura 22), podemos observar que os doentes incluídos no

Resultados

grupo de risco Intermédio-1 possuem baixos valores de 5-metilcitosina, quando comparado com os dois restantes grupos, enquanto os doentes de risco Intermédio-2 são os que apresentam valores mais elevados de 5mC. É importante, ainda, destacar o aumento da 5mC dos doentes de risco intermédio-1 para os de intermédio-2.

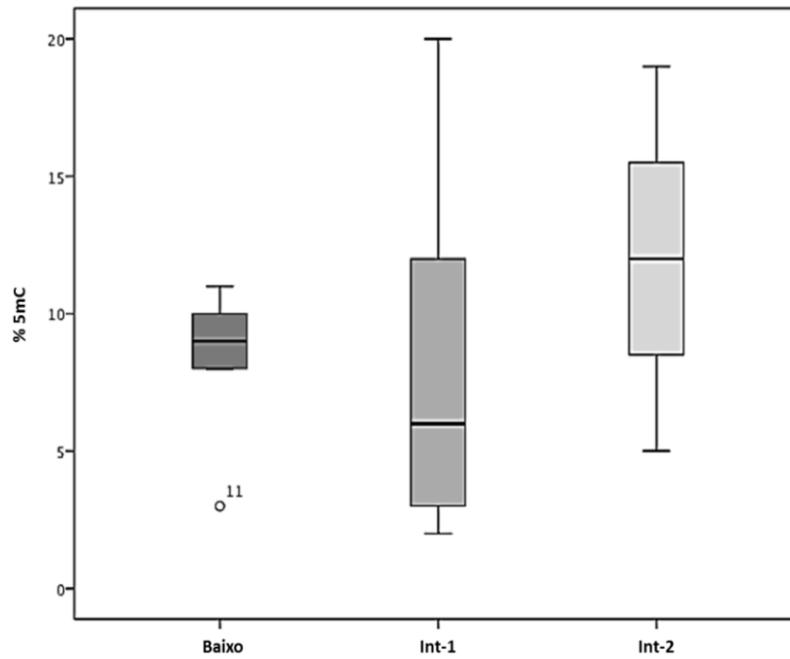


Figura 22 Relação entre a percentagem de 5-metilcitosina (5mC) e os grupos de risco do *International Prognostic Scoring System* (IPSS) em doentes com Síndrome Mielodisplásica. Baixo: baixo risco; Int-1: risco intermédio-1; Int-2: risco intermédio-2.

Por fim analisamos, como já referido, a relação dos níveis de 5-metilcitosina com os grupos definidos de acordo com as concentrações séricas de Folato e de Vitamina B12.

Na análise da comparação entre a 5mC e os valores séricos de folato (figura 23), não observamos grande variação dos valores de 5mC entre o grupo de doentes com baixo níveis de folato (Grupo B) e o grupo com altos níveis de folato (Grupo A). Contudo, verificamos diminuição considerável nos valores de 5mC nos doentes do grupo E, isto é, nos doentes com elevados níveis de folato, relativamente aos grupos B e A, no entanto sem significado estatístico.

Resultados

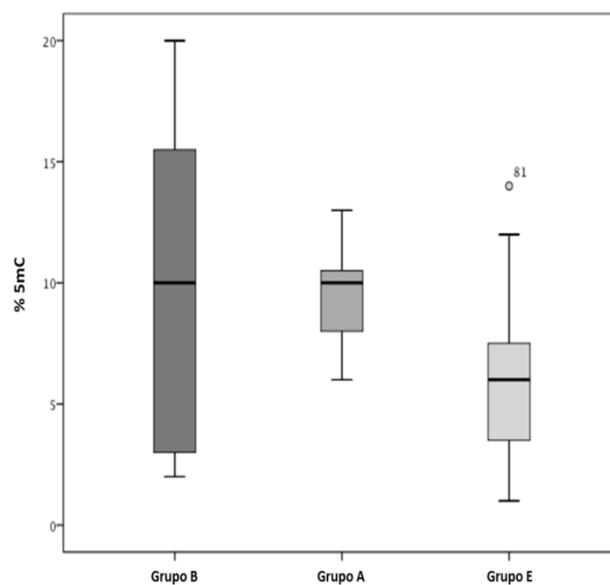


Figura 23 Relação entre a percentagem de 5-metilcitosina (5mC) e os grupos de doentes com Síndrome Mielodisplásica definidos de acordo com as concentrações séricas de Folato. Grupo B: 1-10 ng/ml; Grupo A: 11-20 ng/ml; Grupo E: >20 ng/ml.

Resultados



Discussão

5. Discussão

5.1. Análise do perfil de metilação dos genes supressores tumorais e de recetores de morte de doentes com Síndrome Mielodisplásica

A SMD consiste num grupo heterogéneo de doenças clonais da célula estaminal hematopoiética, essencialmente caracterizado por hematopoiese ineficaz, citopenias refratárias, medula óssea hiperclular e, ainda, por um elevado risco de evolução para LMA (Issa, 2010; Khan, *et al.*, 2013). Sendo uma doença de enorme heterogeneidade clínica e molecular, torna-se um grande desafio o seu diagnóstico e a sua classificação. Por esta razão, têm sido desenvolvidos vários sistemas de classificação que permitem de alguma forma organizar e uniformizar os critérios de diagnóstico da doença, e estimar o risco de progressão da mesma, bem como a sobrevivência dos doentes. O sistema de classificação desenvolvido pela OMS, em 2008, é atualmente o mais aceite, e reconhece sete subtipos distintos da doença, tendo em conta as características morfológicas, a percentagem de blastos na medula óssea e o número de linhagens afetadas (Vardiman *et al.*, 2009). Para a avaliação do prognóstico destes doentes foi ainda criado um índice de prognóstico, o IPSS, que categoriza os doentes em baixo risco, risco intermédio-1, risco intermédio-2 e alto, de acordo com o número de citopenias dos doentes, a percentagem de blastos na medula óssea e as alterações citogenéticas (Tefferi & Vardiman, 2009).

O evento que desencadeia todo o processo de desenvolvimento da Síndrome Mielodisplásica ainda não é conhecido, no entanto, a grande instabilidade genética das células estaminais hematopoiéticas poderá constituir uma possível explicação, uma vez que as torna extremamente suscetíveis a múltiplas mutações genéticas que levam ao estabelecimento do clone pré-maligno (Hirai, 2003).

Os mecanismos envolvidos na patogénese da SMD também ainda não estão definidos mas sabe-se que envolvem alterações em vias de sinalização essenciais ao completo desenvolvimento das células hematopoiéticas. Estas vias incluem processos como a regulação da diferenciação, maturação e crescimento celular, da apoptose, do controlo do ciclo celular e reparação de lesões no ADN (Stintzing *et al.*, 2011).

Embora esta síndrome seja caracterizada por uma medula celular normal a hiperclular, grande parte dos doentes apresentam citopenias no sangue periférico. Este paradoxo tem sido atribuído à apoptose excessiva dos progenitores hematopoiéticos, nomeadamente em estádios menos avançados da doença (Parker *et al.*, 2000; Stintzing *et*

al., 2011), contribuindo para algumas das características que definem a SMD, como as características morfológicas displásicas, a hematopoiese ineficaz e a falência medular (Nishino & Chang, 2005). Desta forma, o excesso de apoptose poderá atuar como um processo homeostático que controla o número de células. No entanto, a progressão leucêmica pode surgir pela aquisição de lesões genéticas e/ou epigenéticas que levam ao bloqueio da apoptose ou que promovam a proliferação celular, que se sobrepõe à apoptose (Parker *et al.*, 2000). O estudo de possíveis alterações nestas duas vias de sinalização poderá fornecer informação crucial para um melhor entendimento da patogênese da SMD, e conseqüentemente, auxiliar o desenvolvimento de terapêuticas direcionadas, que poderão atuar de forma eficaz nestes doentes.

Um dos mecanismos que se sabe estar envolvido na patogênese de Síndrome Mielodisplásica é a alteração dos padrões normais de metilação do ADN, processo que tem sido cada vez mais associado não só às neoplasias hematológicas, mas de um modo geral, a todas as neoplasias.

A frequência deste processo e a grande variedade de genes envolvidos, bem como a grande variedade de tumores que se sabe possuem níveis de metilação elevadas, refletem o importante papel das alterações epigenéticas na iniciação e conseqüente progressão do cancro (Leone *et al.*, 2008). A alteração nos mecanismos de metilação do ADN, torna-se assim extremamente importante no processo oncogénico, uma vez que se encontram envolvida num sem número de processos biológicos como a regulação da expressão génica (Fukushige & Horii, 2013).

A hipermetilação aberrante das ilhas CpGs associadas a promotores de genes leva ao silenciamento transcricional de múltiplos genes, nomeadamente de genes supressores tumorais. Enquanto alguns genes se encontram hipermetilados em vários tipos de neoplasias, de uma forma geral, o padrão de genes hipermetilados é específico do tecido em questão (Leone *et al.*, 2008). No entanto, a hipermetilação aberrante foi já descrita como sendo um processo frequente em diversas doenças hematológicas (Leone *et al.*, 2008; Boulwood & Wainscoat, 2007).

Na Síndrome Mielodisplásica cada vez é maior o número de genes cujo promotor se encontra hipermetilado, nomeadamente de genes supressores tumorais e genes envolvidos em vias de sinalização como a regulação do ciclo celular, apoptose, angiogénese e de reparação do ADN, entre outras (Issa, 2010).

Um dos genes mais frequentemente estudado na SMD é, sem dúvida, o gene *p15* que codifica a proteína que regula o ciclo celular através da inibição das cinases dependentes de ciclinas (CDK) 4 e 6. A hipermetilação deste gene é umas alterações epigenéticas mais comuns em SMD, encontrando-se metilado em cerca de 50% a 80% dos casos (Uchida *et al.*, 1997; Hofmann *et al.*, 2006; Solomon *et al.*, 2007). A metilação do gene *p15* é bastante frequente não só na SMD, mas em várias neoplasias hematológicas (Herman *et al.*, 1997).

O gene *DAPK* é também um dos mais estudados em SMD, e foi já descrito como estando desregulado nesta doença em consequência da sua hipermetilação em 47% dos doentes. Estes doentes encontram-se normalmente em estádios avançados da doença, nomeadamente em estádios de progressão para LMA, demonstrando que a hipermetilação do gene *DAPK* poderá representar um passo inicial no processo de evolução leucémica (Voso *et al.*, 2004).

Contudo, a variedade de genes descritos como estando hipermetilados na Síndrome Mielodisplásica tem aumentado ao longo dos últimos anos, e cada vez mais se verifica existir uma forte associação entre o grau de metilação aberrante e o prognóstico desta doença. Vários estudos têm evidenciado que a progressão de SMD para LMA está associada a um aumento da taxa de metilação em regiões promotoras chave e que a sobrevivência dos doentes com um excesso de metilação é largamente comprometida (Khan *et al.*, 2013).

Uma das características mais importantes da metilação do ADN, e que a distingue fortemente das mutações genéticas, é, sem dúvida, a sua reversibilidade. Esta propriedade faz das alterações epigenéticas um alvo terapêutico bastante atrativo. A terapia epigenética tem evoluído consideravelmente nos últimos anos, e tem como principais alvos dois principais mecanismos, a metilação do ADN e a desacetilação das histonas. Desta forma, o conhecimento dos perfis de metilação poderá ser de extrema importância para a escolha da melhor estratégia terapêutica, não só em doentes com Síndrome Mielodisplásica, mas de um modo geral, em doentes oncológicos.

Tendo em conta todos estes aspetos, no nosso estudo avaliamos o perfil de metilação dos genes supressores tumorais *p15*, *p16*, *p53*, *MGMT* e *DAPK* e dos genes recetores de morte da família do TRAIL, *TRAIL DcR1*, *TRAIL DcR2*, *TRAIL DR4* e

TRAIL *DR5*) em amostras de sangue periférico e de medula óssea de doentes com SMD, colhidas aquando do diagnóstico, e de controlos não neoplásicos.

Para tal, foi analisada uma população de 82 doentes com SMD, classificados segundo o sistema de classificação da Organização Mundial de Saúde e, ainda, distribuídos tendo em conta os grupos de risco do IPSS, com uma distribuição etária e por sexos semelhante ao que se encontra até agora disponível na literatura. A distribuição da nossa amostra pelos vários subtipos de SMD não é homogénea, uma vez que há uma predominância de doentes incluídos nos subtipos menos agressivos, nomeadamente no subtipo CRDM, fato que se reflete nos grupos de risco do IPSS. No que diz respeito, aos controlos não neoplásicos, verificamos um predomínio do sexo masculino, e uma mediana de idades consideravelmente inferior à da população de doentes.

Na literatura existente até à data, verificamos que a análise do perfil de metilação de diversos genes é efetuada, maioritariamente, em amostras de medula óssea e, nalguns casos em amostras de sangue periférico. No entanto, são muito reduzidos os estudos que fazem uma análise de comparação dos resultados de metilação de genes entre os dois tipos de amostras, para poder averiguar se os resultados são sobreponíveis. Deste modo, a nossa análise tem, também, como objetivo avaliar a concordância da metilação entre amostras de sangue periférico e de medula óssea. A escolha da utilização das amostras de medula óssea foi feita, tendo em conta, a semelhança entre os padrões de metilação em células precursoras CD34+ após o seu isolamento ou em células mononucleares da medula óssea, de doentes com Síndrome Mielodisplásica (Aggerholm *et al*, 2006).

A avaliação global do perfil de metilação dos genes em estudo demonstrou que a frequência de metilação é um processo bastante frequente nos doentes, pois podemos verificar que 97,7% das amostras de sangue periférico, bem como 83,3% das amostras de medula óssea apresentam metilação de pelo menos um dos genes em estudo. Contudo, quando avaliamos a metilação de dois ou mais genes, podemos observar uma ligeira redução, nomeadamente nas amostras de MO. Estes valores estão de acordo com o descrito na literatura, nomeadamente num estudo de Hofmann *et al* (2006), que verificou uma frequência de metilação de pelo menos um gene em 80% dos doentes estudados.

Na análise do perfil de metilação dos genes *p15* e *p16*, foi-nos possível verificar uma maior frequência de metilação do gene *p15*, relativamente ao *p16*, que apresenta uma frequência de metilação bastante reduzida. A frequência de metilação observada

para o gene *p15* em amostras de medula óssea é de 61,5% das amostras de MO, uma percentagem dentro dos valores descritos até à data (50% a 80%) nesta doença (Uchida *et al.*, 1997; Christiansen *et al.*, 2003; Solomon *et al.*, 2008), como mencionado.

Quando analisamos a frequência de metilação do gene *p15* tendo em conta a progressão da doença, verificámos que a metilação deste gene não varia muito nos vários subtipos da doença, com exceção dos doentes AREB-2, onde a metilação diminui. De igual modo, os doentes com IPSS mais alto, ou seja de maior risco prognóstico apresentam redução da metilação da região promotora do gene *p15*. Estes resultados não estão de acordo com o que tem sido descrito por outros autores que referem aumento da frequência de metilação do gene *p15* nos subtipos de alto risco, indicando a possível influência deste processo na progressão leucémica (Uchida *et al.*, 1997; Christiansen *et al.*, 2003). A diferença que observamos nos nossos resultados poderá estar relacionada com o fato de a nossa análise ser efetuada aquando do diagnóstico dos doentes, não incluído amostras de doentes após a progressão da doença, ou ainda estar relacionado com o reduzido número de doentes incluídos nos subtipos mais agressivos da doença.

Relativamente, à análise da metilação do gene *p16*, podemos constatar que as nossas amostras apresentam uma frequência de metilação deste gene de 21,8%, ligeiramente inferior a alguns dos dados descritos na literatura (30% a 40%) (Solomon *et al.*, 2008; Cortesão, 2010). No entanto, a informação relativa à metilação deste gene não é muito concordante, uma vez que existem outros estudos que indicam uma frequência de metilação do gene *p16* relativamente mais baixa ou até mesmo inexistente (0% a 8%) (Hofmann *et al.*, 2006; Christiansen *et al.*, 2003; Uchida *et al.*, 1997). A metilação do gene *p16* quando analisada tendo em conta os subtipos da OMS, revelou aumento nas amostras de doentes incluídos em subtipos mais agressivos, como AREB-1 e AREB-2. No entanto, não são sobreponíveis aos dados já existentes que apontam para maior metilação do gene *p16* em subtipos menos agressivos (Cortesão, 2010). No entanto, ao avaliarmos a relação com os grupos de risco do IPSS verificamos maior metilação no grupo de doentes SMD de baixo risco. Estes resultados podem ser devidos ao fato do número de doentes com informação relativa ao IPSS ser reduzido, relativamente ao número de doentes nos subtipos, e a população estudada ser sobretudo de baixo risco.

Na análise da metilação da região promotora do gene *DAPK*, que codifica para uma proteína cinase associada à morte celular, encontramos metilação do promotor deste gene em 66% das amostras analisadas, sendo um resultado ligeiramente superior aos

descritos em estudos anteriores (45% a 65%) (Voso *et al.*, 2004; Quian *et al.*, 2010). A metilação de *DAPK* encontra-se ainda fortemente associada a subtipos mais agressivos, como descrito por Quian *et al.*, que mostra também uma forte contribuição da hipermetilação do *DAPK* na progressão leucémica dos doentes com SMD. No entanto, os nossos resultados não demonstram aumento da metilação deste gene nos subtipos mais avançados da doença, que mais uma vez poderá ser explicado pelo fato de não ter sido efetuado um acompanhamento destes doentes ao longo da progressão da doença ou da população estudada ser maioritariamente de subtipos menos avançados, nomeadamente do subtipo CRDM.

Tendo em conta o importante papel que os processos apoptóticos parecem ter na patogénese de SMD, são vários os estudos que focam as alterações em reguladores da apoptose, entre eles o TRAIL e os seus respetivos recetores. Zang *et al.* (2007) verificou haver aumento da apoptose induzida pelo TRAIL em células de medula de doentes com SMD, observando ainda haver sobre-regulação dos recetores de morte (*TRAIL DR4* e *TRAIL DR5*), bem como uma elevada razão entre os recetores de morte e os recetores armadilha (*TRAIL DcR1* e *TRAIL DcR2*) nos doentes com SMD quando em comparação com controlos.

Tendo em conta a informação relativa ao papel do TRAIL e dos seus recetores na Síndrome Mielodisplásica analisámos o perfil de metilação dos quatro recetores do TRAIL na nossa população de doentes. Em todos os genes que codificam estes recetores verificámos uma frequência de metilação relativamente baixa. Nos genes *TRAIL DcR1* e *TRAIL DcR2*, que codificam os recetores anti-apoptóticos, observámos metilação dos seus promotores em 8% e 16% dos casos respetivamente, sendo que na avaliação da metilação dos genes *TRAIL DR4* e *TRAIL DR5*, que codificam os recetores pro-apoptóticos, 24% e 28% das amostras, respetivamente, apresentavam hipermetilação da região promotora destes dois genes. Embora os níveis de metilação sejam bastante reduzidos, podemos ainda observar que a metilação do gene *TRAIL DcR2* abrange todos os subtipos de SMD à exceção do subtipo AREB-2, sendo mais elevado no grupo de baixo risco. No caso dos genes *TRAIL DR4* e *TRAIL DR5* observámos que a sua metilação é mais evidente em subtipos menos avançados da doença, sendo que o gene *TRAIL DR4* se encontra metilado apenas nos subtipos CRDU, ARSA e CRDM, mas abrangente a todos os grupos do IPSS. Contudo, as frequências de metilação destes genes

são muito reduzidas, principalmente dos genes *TRAIL DcR1* e *TRAIL DcR2*, para podermos fazer uma avaliação tendo em conta os subtipo e os grupos de risco de SMD.

Os níveis de metilação dos genes que codificam os recetores TRAIL ainda não se encontram descritos na literatura para os doentes com Síndrome Mielodisplásica ou outras doenças hematológicas, no entanto, vários estudos de metilação em tumores sólidos têm sido desenvolvidos com o mesmo objetivo. Um desses estudos foi realizado em amostras de cancro da próstata, que permitiu observar frequências de metilação na ordem dos 40% para os genes *TRAIL DcR1* e *TRAIL DcR2* e dos 5% nos recetores pró-apoptóticos. Este estudo permitiu observar que a metilação dos genes *TRAIL DcR1* e *TRAIL DcR2* tem uma correlação significativa com a sobrevivência dos doentes (Suzuki *et al.*, 2006). Um outro estudo, com o objetivo de avaliar a percentagem de metilação dos genes que codificam os recetores do ligando TRAIL foi desenvolvido em linhas celulares e amostras tumorais de vários tipos de neoplasias. Este estudo permitiu verificar a frequente metilação dos genes *TRAIL DcR1* e *TRAIL DcR2* em vários tipos de neoplasias sólidas, mas também no linfoma (41%) e no mieloma múltiplo (56%), não observando valores de metilação dos genes *TRAIL DR4* e *TRAIL DR5* consideráveis em todas as amostras estudadas (Shivapurkar *et al.*, 2004).

No nosso estudo fomos também avaliar o perfil de metilação dos promotores dos genes *p53* e *MGMT* nas amostras dos doentes, contudo nenhuma apresentou metilação da região promotora de qualquer um dos dois genes. O gene *MGMT* codifica uma enzima reparadora de ADN, que segundo alguns estudos se encontra hipermetilado em cerca de 40% das amostras de gliomas e de carcinoma coloretal, no entanto esta frequência é mais reduzida (cerca de 25%) no cancro do pulmão de não-pequenas células, linfoma e no cancro do pescoço e da cabeça (Esteller *et al.*, 1999). Na Síndrome Mielodisplásica a metilação do *MGMT* foi avaliada em alguns estudos, com resultados de metilação extremamente reduzidos de 4,9% (Solomon *et al.*, 2008) e de 6% (Hofmann *et al.*, 2006). Porém, no estudo desenvolvido por Solomon *et al.*, os 3 doentes com metilação do gene *MGMT* são casos de doentes com LMA secundária a SMD, que não incluímos no nosso estudo. O facto de nenhum dos doentes estudados não terem, até ao momento, evoluído para LMA e do nosso estudo ter sido realizado em amostras ao diagnóstico, poderá justificar estas diferenças.

Também a análise do gene *p53* permitiu verificar que nenhuma das amostras se encontra metilada para nos doentes com SMD. A *p53* é uma proteína supressora tumoral

chave, cuja ativação pode levar ao bloqueio do ciclo celular e à indução de genes reparadores do ADN, ou pode promover a progressão para senescência ou apoptose (Bejar & Steensma, 2012). A p53 encontra-se alterada numa grande quantidade de neoplasias, alterações que foram já descritas na SMD e na LMA, onde se observou que aproximadamente 10% dos casos de SMD possuem uma mutação da p53 (Bejar *et al.*, 2011). Outros estudos apontam para bloqueio da cadeia de processos mediados pela p53, pelo silenciamento epigenético do gene p14ARF, um gene supressor tumoral, que entre outras funções, é responsável pela ativação de bloqueio do ciclo celular dependente da p53 (Robertson & Jones, 1998). O resultado que obtemos no nosso estudo poderá, desta forma, estar relacionado com o elevado número de alterações genéticas que afetam este gene, e consequente a proteína que este codifica. Assim, este resultado poderá estar relacionado com o facto das alterações genéticas do *p53* serem mais importantes que as alterações epigenéticas na SMD.

Deste modo, no nosso estudo podemos verificar que a metilação aberrante de promotores é um processo frequente em amostras de sangue periférico e de medula óssea de doentes com Síndrome Mielodisplásica, resultados já obtidos em vários estudos (Aggerholm *et al.*, 2006; Jiang *et al.*, 2009)

5.2. Análise comparativa do perfil de metilação dos genes supressores tumorais e de recetores de morte entre amostras de medula óssea e de sangue periférico de doentes com Síndrome Mielodisplásica

Cada vez é maior a necessidade do desenvolvimento de testes moleculares não-invasivos de deteção e de diagnóstico com base em amostras de sangue. O fato do sangue periférico ser uma amostra rica em diversos conteúdos celulares e moleculares, que fornece informação relativa ao estado de saúde do doente, faz dele uma amostra ideal para o desenvolvimento de diagnósticos não invasivos para o cancro, nomeadamente para a deteção de biomarcadores (Hanash *et al.*, 2011).

Tendo como base este conceito, fomos avaliar o grau de concordância do perfil de metilação dos vários genes estudados entre as amostras de sangue periférico e de medula óssea dos doentes com Síndrome Mielodisplásica. Esta análise permitiu-nos verificar que, de uma forma geral, todos os genes apresentam valores de concordância relativamente elevados (*p15*: 72,5%; *p16*: 77,5%; *DAPK*: 67,5%; *TRAIL DcR1*: 65%;

TRAIL *DcR2*: 65%; TRAIL *DR4*: 62,4%; TRAIL *DR5*: 40%), com exceção do gene TRAIL *DR5*. Embora só os genes *DAPK* e TRAIL *DR5* apresentem resultados com significado estatístico, ou seja, apenas estes dois genes não são concordantes estatisticamente, parece-nos que os graus de concordância verificados poderão indicar a elevada similaridade entre os dois tipos de amostras. No entanto, esta avaliação inclui todos os doentes, mesmo os que não apresentam hipermetilação dos genes.

De modo a perceber se este padrão se mantém quando consideramos apenas as amostras metiladas, efetuamos uma nova avaliação tendo por base as amostras dos doentes que apresentavam metilação dos genes na medula óssea. Os resultados obtidos variam em relação aos anteriores, sendo observada uma redução do grau de concordância no gene *p16* e nos genes que codificam os recetores do TRAIL, sendo esta bastante acentuada nestes últimos, provavelmente devido ao reduzido número de amostras de medula óssea com metilação destes genes. Contudo, o grau de concordância dos genes *p15* e *DAPK* aumentou (*p15*: 96,5%; *p16*: 77,5%). Assim, este estudo sugere-nos que pelo menos o perfil de metilação dos genes *p15* e *p16* poderá ser utilizado como biomarcador nas amostras de sangue periférico dos doentes com SMD.

Nenhum estudo tendo como base este conceito foi realizado em amostras de doentes com Síndrome Mielodisplásica, no entanto, um estudo desenvolvido no nosso grupo de investigação, avaliou a metilação dos genes *p15* e *DAPK* entre amostras de SP e de MO de doentes com Gamapatia Monoclonal, observando uma forte correlação dos resultados entre os dois tipos de amostras (Geraldès *et al.*, 2013)

Existem também vários estudos que fazem a comparação entre amostras de biopsias tumorais e outros tipos de amostras, como é o caso do sangue periférico. Um desses estudos avaliou a deteção da metilação do gene *p16* em amostras de biopsias tumorais do carcinoma hepatocelular e plasma ou soro dos mesmos doentes, detetando metilação nas amostras de plasma em 13 das 16 (81%) amostras de tecido tumoral metiladas para o mesmo gene (Wong *et al.*, 1999), um valor muito aproximado do verificado nas nossas amostras relativo ao mesmo gene.

Uma análise muito semelhante foi efetuada entre amostras de biopsias de cancro do colo do útero e amostras de plasma, analisadas para os genes *DAPK*, *p16* e *MGMT*, sendo que dos 23 doentes com os dois tipos de amostras, todos apresentavam padrões de metilação semelhantes entre elas (Yang *et al.*, 2004).

Deste modo, parece-nos que a avaliação do padrão de metilação em amostras de sangue periférico poderá constituir uma boa abordagem para a detecção de biomarcadores tumorais, que poderão ser extremamente importantes na detecção precoce de neoplasias e outras doenças, no diagnóstico e estadiamento de múltiplos tumores, e ainda na escolha da melhor estratégia terapêutica, bem como na previsão da resposta a determinadas estratégias terapêuticas e mesmo na monitorização da terapêutica com agentes hipometilantes.

5.3. Análise do perfil de metilação e da sua relação com os níveis séricos de folato e Vitamina B12 nos doentes com Síndrome Mielodisplásica

Como referido anteriormente, vários nutrientes envolvidos no metabolismo do carbono, como o folato e a vitamina B12 entre outros, têm sido frequentemente associados ao desenvolvimento de neoplasias. A manutenção deste processo metabólico é de extrema importância, uma vez que assegura processos tão importantes como a remetilação normal da homocisteína, a formação da S-adenosilmetionina e a metilação do ADN.

Neste contexto, fomos avaliar a relação entre os perfis de metilação dos genes em estudo e os valores séricos de folato e de vitamina B12 medidos nos doentes. Para uma melhor análise dos nossos resultados, efetuamos a divisão dos doentes tendo em conta a gama de concentrações séricas de folato, criando três grupos distintos, um que inclui os doentes com níveis baixos de folato (Grupo B), outro com níveis altos (Grupo A), e um outro com os doentes que possuem níveis elevados de folato (Grupo E). Esta divisão permitiu-nos verificar que mais de 50% dos nossos doentes apresentam níveis baixos de folato sérico. Nestes grupos podemos observar que, de uma forma geral, os doentes do grupo B apresentam menor frequência de metilação em amostras de sangue periférico, com exceção para a metilação do gene *p15*, que apresenta uma frequência de metilação semelhante e mais elevada no grupo B e no grupo E. Por outro lado, verificamos que no caso dos genes *DAPK* e *TRAIL DcR1* existe uma tendência para o aumento da metilação proporcional ao aumento da concentração de folato sérico, em amostras de SP. No entanto, parece-nos haver maior percentagem de metilação nas amostras de sangue periférico dos doentes incluídos no grupo com altas concentrações séricas de folato. Quando analisamos as amostras de medula óssea observamos uma alteração do padrão

verificado no sangue periférico, isto é, genes como o *DAPK*, e os genes que codificam os recetores do ligando TRAIL, apresentam redução da percentagem de metilação com o aumento das concentrações de folato.

Embora, não exista grande informação relativa à influência do folato em amostras de doentes com SMD, um estudo recente demonstrou que a baixa concentração de folato pode estar relacionada com a metilação dos genes em amostras de medula óssea, nomeadamente no *p16* (Cortês, 2010). Estes resultados não se encontram em acordo com a nossa avaliação, no entanto se tivermos em conta os nossos resultados apenas para o gene *p16*, verificamos que a sua metilação é, de fato, ligeiramente aumentada. Por outro lado, o nosso estudo inclui um maior número de amostras o que poderá explicar a diferença de resultados entre os dois estudos.

Vários estudos têm, no entanto, sido concebidos no sentido de perceber o papel mais direto na metilação do ADN, através da avaliação do perfil de metilação de vários genes, ou através da análise da metilação global, tendo em conta os níveis de folato dos doentes. Contudo os resultados já descritos apresentam uma grande variabilidade de conclusões, não se verificando uma relação exata entre os níveis de folato e a metilação de ADN, até porque baixas concentrações de folato podem resultar quer em hipometilação quer em hipermetilação, levando à desregulação deste processo (Crider *et al.*, 2012). Um estudo desenvolvido por Kim *et al.*, examinou a metilação em três *loci* e verificou que os níveis elevados de folato estavam relacionados com o aumento de metilação do gene *p73* mas não dos genes *p16* e *hMLH1* (Kim *et al.*, 2011). O que está de alguma forma relacionado com os nossos resultados uma vez que verificámos diferentes comportamentos nos vários genes, para as diferentes concentrações de folato. No entanto, os estudos descritos até à data apresentam resultados bastante divergentes, provavelmente explicados pelos diferentes desenhos experimentais. Mas, as evidências sugerem que baixas concentrações de folato estão associadas a diminuição da metilação global do ADN e consequentemente a maior risco de desenvolvimento de tumores (Crider *et al.*, 2012).

Posteriormente, dividiram-se os doentes em três grupos tendo em conta os valores séricos de vitamina B12, de modo semelhante ao que realizamos para os níveis de folato. A distribuição desta amostra nos vários grupos é mais heterogénea, que no caso do folato, no entanto, o grupo de doentes com baixos níveis séricos de vitamina B12, inclui, ainda assim, 45% dos doentes. Esta análise permitiu-nos verificar que nas amostras de sangue

periférico a frequência de metilação é consideravelmente mais elevada nos grupos de doentes com valores elevados de vitamina B12, de uma forma geral, em todos os genes que analisamos, mas mais evidente nos genes *p15* e *DAPK*. Nas amostras de medula óssea, o padrão de metilação dos genes, tendo em conta as diferentes concentrações de vitamina B12, é diferente do observado nas amostras de SP. Sendo que nestas amostras se verifica que a metilação dos genes em estudo é comum a todos os grupos com as diferentes concentrações de vitamina B12. No entanto, no caso, dos genes *p16* e *TRAIL DcR1* nenhum dos doentes incluídos no grupo de doentes com altos níveis de vitamina B12 apresenta metilação destes genes.

Os estudos que relacionam a metilação do ADN em doentes com SMD, ou outras doenças hematológicas, são muito reduzidos.

A relação das concentrações de vitamina B12 e o risco de cancro tem sido estudada em tumores sólidos, no entanto com resultados contraditórios. Um destes estudos, foi desenvolvido em doentes com cancro da próstata, e observou que o aumento da concentração de vitamina B12 poderá estar associado ao aumento do risco deste cancro, em casos avançados da doença (Johansson *et al.*, 2998). No entanto, um outro estudo, desenvolvido em amostras de cancro do pâncreas, concluiu existir uma relação inversa entre o risco de cancro e as concentrações séricas de folato, vitamina B6 e vitamina B12, em doentes em que estes nutrientes foram obtidos apenas através da dieta (Schernhammaer *et al.*, 2007).

A nossa análise permitiu verificar que a metilação do ADN é um processo frequente em todos os grupos de doentes definidos tendo em conta as concentrações séricas de folato e vitamina B12. De um modo geral, não se observa um padrão definido entre os dois fatores analisados. No entanto, parece haver uma relação entre o aumento da metilação do gene *DAPK* e a o aumento da concentração de folato no sangue periférico, bem como da concentração de vitamina B12. Parece-nos também evidente, existirem diferentes significados biológicos, para a metilação nas amostras de sangue periférico e de medula óssea, uma vez que se verificam padrões de distribuição da metilação muito diferentes entre elas. No entanto, mais estudos devem ser desenvolvidos no sentido de perceber o que está por detrás destas diferenças.

5.4. Análise de 5-metilcitosina nos doentes com Síndrome Mielodisplásica e a sua relação com os níveis séricos de folato e vitamina B12

As alterações na metilação global do genoma têm sido cada vez mais associadas às neoplasias, no entanto, ainda não se sabe se estas alterações representam diferenças epigenéticas na suscetibilidade para a doença. Embora, a hipermetilação de regiões específicas do genoma, as ilhas CpG, seja um mecanismo muito característico das células tumorais, este coexiste juntamente com a hipometilação global do genoma. Esta hipometilação parece estar envolvida, essencialmente no ADN satélite, nas sequências repetitivas e nas ilhas CpGs localizadas em intrões. Esta hipometilação foi inicialmente descrita após se quantificar o conteúdo de 5-metilcitosina em tecidos tumorais.

Tendo estes fatores em conta, fomos analisar a 5-metilcitosina nas amostras de sangue periférico de doentes com SMD e em amostras controlos. Posteriormente, verificamos qual a sua relação com os vários subtipos da SMD e com os vários grupo de risco do IPSS. Fomos ainda verificar se existe algum tipo de associação entre os valores de 5mC e os valores séricos de folato e de vitamina B12.

A nossa amostra de doentes com SMD apresentam valores médios de 5mC ligeiramente superior aos valores observados na nossa amostra controlo, resultado que está de acordo com o verificado anteriormente neste estudo.

Na análise da relação entre os valores de 5mC e os vários subtipos de SMD, podemos observar que a percentagem de 5mC varia ao longo dos vários subtipos, no entanto, observamos valores mais reduzidos no subtipo CRDM. Por outro lado, nos doentes com AREB-2 observam-se valores de 5-metilcitosina mais elevados, relativamente aos restantes subtipos.

Também na análise da percentagem de 5-metilcitosina nos vários grupos de risco do IPSS verificámos que os doentes incluídos no grupo de risco intermédio-1 apresentam níveis mais reduzidos de 5mC. Por outro lado, os doentes de risco do grupo intermédio-2 apresentam os valores mais elevados de 5mC de entre os três grupos em estudo.

Este resultado parece apontar uma tendência para aumento da metilação do ADN nos doentes com subtipos mais agressivos de SMD. No entanto, a quantificação da 5-metilcitosina não nos permite afirmar se este aumento da metilação se deve à metilação específica de genes ou à metilação de sequências repetitivas do genoma, que previnem a instabilidade genómica bem como possíveis rearranjos (Crider *et al.*, 2012). De modo a

determinar se o aumento dos níveis de 5-metilcitosina observados nos doentes com SMD se deve à metilação específica ou à metilação de sequências repetitivas do genoma, iremos continuar este estudo com a quantificar os níveis de metilação das sequências ALU e LINE-1.

Por último, fomos verificar se diferentes concentrações séricas de folato e de vitamina B12 poderão estar associadas a diferentes percentagens de 5-metilcitosina, e consequentemente, a diferentes níveis de metilação. No caso do folato, podemos observar uma relação inversa entre os valores de 5mC e as concentrações de folato no sangue, uma vez que parece haver uma tendência para aumento da percentagem de 5mC com o aumento dos níveis de folato. Embora tenhamos observado valores muito semelhantes desta base metilada nos grupos B e A.

No caso da Vitamina B12, não existem grandes variações dos valores de 5-metilcitosina entre os três grupos de doentes com diferentes valores de vitamina B12. No entanto, os doentes incluídos no grupo A têm valores de 5mC ligeiramente inferiores aos restantes dois grupos de doentes.

Um dos fatores que poderá influenciar os valores de folato e vitamina B12 é a enzima metilenotetrahydrofolato redutase (MTHFR), extremamente importante no ciclo do folato, uma vez que catalisa de forma irreversível a conversão do 5,10-metilenotetrahydrofolato em 5-metiltetrahydrofolato (Crider *et al*, 2012). No entanto, esta enzima apresenta dois polimorfismos, C677T e A1298C que estão associados a redução da atividade desta enzima. Um dos estudos focado no polimorfismo C677T, concluiu que este polimorfismo influencia os níveis de metilação através da interação com os níveis de folato. Esta conclusão surgiu após observarem que os doentes portadores do genótipo 677TT apresentam níveis baixos de metilação do ADN, quando comparados a portadores do genótipo 677CC, tendo em conta que apenas os doentes com genótipo 677TT com baixos níveis de folato apresentam diminuição da metilação (Friso *et al*, 2002). Estes polimorfismos têm sido associados a várias neoplasias, como por exemplo as neoplasias hematológicas. Um destes estudos verificou que o genótipo *MTHFR* 677TT está associado ao aumento do risco para LLA (Kim *et al*, 2009). Também um dos estudos efetuados no nosso laboratório demonstrou existir uma forte associação entre valores baixos de folato e de vitamina B12 e SMD, e entre o polimorfismo 677CT e a SMD (Cortês, 2010). Também no nosso estudo se verificou que a maioria dos doentes apresenta baixos valores séricos de folato e vitamina B12.

Todos estes dados, sugerem, no entanto, que os níveis de metilação observados nos nossos doentes, bem como os níveis de folato e vitamina B12 poderão estar condicionados pelas variantes polimórficas da enzima MTHFR. De modo a confirmar a participação das variantes polimórficas da enzima MTHFR na relação entre os níveis de folato e de vitamina B12 e o perfil de metilação nestes doentes, será realizada futuramente a genotipagem desta enzima nos doentes incluídos neste estudo.

Discussão



Conclusão

6. Conclusão

De seguida apresentam-se as principais conclusões obtidas após a análise de todos os dados recolhidos na realização deste trabalho, focado na avaliação do perfil de metilação no sangue periférico e na medula óssea em doentes com Síndrome Mielodisplásica.

 A amostra de doentes em estudo inclui maioritariamente doentes de subtipos menos agressivos da doença, nomeadamente da Citopenia Refratária com Displasia de Multilinhagens, que é transposto para os grupos de risco do IPSS, dos quais predomina o grupo de risco intermédio-1

 Estes resultados apontam para elevadas frequências de metilação aberrante em vários genes na Síndrome Mielodisplásica, tendo em conta os valores obtidos para os vários genes em estudo, nomeadamente dos genes p15 e DAPK. Os genes que codificam recetores do TRAIL também apresentam metilação em SMD, no entanto em frequências mais reduzidas. Os genes p53 e MGMT não apresentam metilação em nenhuma das amostras. De um modo geral, as amostras apresentam elevadas frequências de metilação em pelo menos um dos genes, valor que diminui quando avaliamos a metilação de dois ou mais genes, mas que se mantem em valores bastante consideráveis. Deste modo, a metilação de ADN parece estar fortemente associada à patogénese de SMD.

 A metilação de ADN observada neste estudo parece ser transversal a todos os subtipos de SMD, bem como a todos os grupos de risco do IPSS. No entanto, o padrão de metilação dentro dos subtipos e dos grupos de risco parece ser específico de cada gene, variando consoante o gene em estudo. Este fato poderá indicar que a metilação do ADN tem um papel em todo o processo de progressão da Síndrome Mielodisplásica.

 A nossa amostra evidência uma predominância de doentes com baixas concentrações séricas de folato e de vitamina B12. Sendo que, se verifica aumento do número de doentes com metilação em grupos com elevados níveis destes nutrientes, isto é, a metilação de ADN é mais evidente nos grupos de doentes com níveis de folato e vitamina B12 altos a elevados. Estes resultados evidenciam o importante papel destes nutrientes, folato e vitamina B12, no processo de metilação.

Conclusão

 A análise dos níveis de 5-metilcitosina nos doentes com Síndrome Mielodisplásica, demonstrou um aumento dos mesmos quando em comparação aos valores obtidos nos controlos. No entanto, a relação da percentagem de 5mC e os subtipos de SMD não é muito definida, mas evidencia aumento dos mesmos em subtipos mais agressivos, como o AREB-2. Dados muito semelhantes foram obtidos na sua relação com os grupos de risco do IPSS. Os resultados obtidos após análise da relação entre os níveis de 5-metilcitosina e os níveis de folato/vitamina B12, evidenciam maior percentagem de 5mC em doentes com baixos níveis de folato, sendo que estes dois fatores se relacionam de forma inversa. No entanto, no caso da vitamina B12 não se observa um padrão definido, uma vez que os níveis de 5mC são muito semelhantes entre os vários grupos com diferentes concentrações de vitamina B12.

 Os resultados sugerem uma forte correlação do perfil de metilação analisada nas amostras de sangue periférico e amostras de medula óssea, observada através de elevados graus de concordância entre as duas amostras, nomeadamente para os genes p15 e DAPK. Esta forte correlação poderá evidenciar o potencial clínico do sangue periférico como biomarcador tumoral na SMD.



Bibliografia

Aggerholm, A., Holm, M. S., Guldberg, P., Olesen, L. H., Hokland, P. (2006) **“Promoter hypermethylation of p15INK4B, HIC1, CDH1, and ER is frequent in myelodysplastic syndrome and predicts poor prognosis in early-stage patients”** European Journal of Haematology 76(1):23-32.

Al-Ameri, A., Cherry, M., Garcia-Manero, G., & Quintás-Cardama, A. (2011) **“Standard Therapy for Patients with Myelodysplastic Syndromes”** Clinical Lymphoma, Myeloma & Leukemia 11(4):303-313.

Ashkenazi, A. (2008). **“Directing cancer cells to self-destruct with pro-apoptotic receptor agonists”** Nature Reviews Drug Discovery 7:1001-1012.

Bartlett J. M. S. & White A. in: **“Methods in Molecular Biology: PCR Protocols”** by Jonh M. S. Bartlett & David Stirling, 2nd Edition, Humana Press, Inc. 226:29-32.

Baylin, S. B. (2005). **“DNA methylation and gene silencing in cancer”** Nature Clinical Practice 2(1):S4-S11.

Bejar, R., & Steensma, D. P. (2012). **“Molecular Genetics of Myelodysplastic Syndromes”** In: eLS. John Wiley & Sons.

Bernasconi, P. (2008). **“Molecular pathways in myelodysplastic syndromes and acute myeloid leukemia: relationships and distinctions - a review”** British Journal of Haematology 142:695-708.

Boultonwood, J. & Wainscoat, J. S. (2007) **“Gene silencing by DNA methylation in haematological malignancies”** British Journal of Haematology 138:3-11.

Christiansen, D. H., Andersen, M. K. & Pedersen-Bjergaard, J. (2003) **“Methylation of p15INK4B is common, is associated with deletion of genes on chromosome arm 7q and predicts a poor prognosis in therapy-related myelodysplasia and acute myeloid leukemia”** Leukemia 17:1813-1819.

Cortesão, E. (2010). **“Nutrição e Alterações Epigenéticas na Síndrome Mielodisplásica”** Tese de Mestrado.

Crider, K. S., Yang, T. P., Berry, R. J. & Bailey, L. B. (2012). **“Folate and DNA Methylation: A Review of Molecular Mechanisms and the Evidence for Folate’s Role”** *Advances in Nutrition* 3:21:38.

Das, P. M., & Singal, R. (2004). **“DNA methylation and Cancer”** *Journal of Clinical Oncology* 22:4632-4642. Das & Singal, 2004

Dehay, C., & Kennedy, H. (2007). **“Cell-Cycle control and cortical development”** *Nature Reviews Neuroscience* 8(6):438-450. Dehay & Kennedy, (2007)

Esteller, M., Hamilton, S. R., Burger, P. C., Baylin, S. B. & Herman, J. G. (1999) **“Inactivation of the DNA repair gene O6-methylguanine-DNA methyltransferase by promoter hypermethylation is a common event in primary human neoplasia”**. *Cancer Research* 59.

Esteller, M., Toyota, M., Sanchez-Cespedes, M., Capella, G., Peinado, M. A., Watkins, D. N., Issa, J-P. J., Sidransky, D., Baylin, S. B., & Herman, J. G. (2000). **“Inactivation of the DNA Repair Gene *O6-Methylguanine-DNA Methyltransferase* by Promoter Hypermethylation Is Associated with G to A Mutations in *K-ras* in Colorectal Tumorigenesis”** *Cancer Research* 60:2368–2371.

Foran, J. M., & Shammo, J. M. (2012). **“Clinical Presentation, Diagnosis, and Prognosis of Myelodysplastic Syndromes”** *The American Journal of Medicine* 125:S6-S13.

Friso, S., Choi, S. W., Girelli, D., *et al.* (2002) **“A common mutation in the 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase gene affects genomic DNA methylation through an interaction with folate status”**. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 99:5606-5611.

Garcia-Manero, G. (2012). **“Myelodysplastic syndromes: 2012 update on diagnosis, risk-stratification, and management”** American Journal of Hematology 87:693-701.

Garcia-Manero, G., & Fenaux, P. (2011). **“Hypomethylating Agents and Other Novel Strategies in Myelodysplastic Syndromes”** Journal of Clinical Oncology 29(5):516-523.

Geraldes, C., Gonçalves., A.C., Alves, R., Pais, A., Cortesão, E., Pereira, M., Sousa, I., Teixeira, A., Nascimento Costa, J., Sarmiento, A. (2013) **“p15 and DAPK methylation in Multiple Myeloma and MGUS: comparison between bone marrow and peripheral blood”** Journal of European Hematology Association. 98(1)

Gonçalves, A. (2008). **“Avaliação do stress oxidativo na Síndrome Mielodisplásica - Papel da mitocôndria e dos agentes antioxidantes”** Tese de Mestrado.

Gonzalez-Gomez, P., Bello, M. J., Lomas, J., Arjona, D., Alonso, M. E., Amiñoso, C., Lopez-Marin, I., Anselmo, N. P., Sarasa, J. L., Gutierrez, M., Casartelli, C., Rey, J. A. (2003). **“Aberrant methylation of multiple genes in neuroblastic tumours: relationship with MYCN amplification and allelic status at 1p”** European Journal of Cancer 39:1478-1485.

Greenberg, P. L. (2010). **“Current therapeutic approaches for patients with myelodysplastic syndromes”** British Journal of Haematology 150:131-143.

Greenberg, P. L. (2012). **“Molecular and genetic features of Myelodysplastic Syndromes”** International Journal of Laboratory Hematology 34:215-222.

Greenberg, P. L., Attar, E., Bennett, J. M., Bloomfield, C. D., De Castro, C. M., Deeg, H. J., *et al.* (2011). **“Myelodysplastic Syndromes”** Journal of the National Comprehensive Cancer Network 9:30-56.

Greenberg, P., Cox, C., LeBeau, M. M., Fenaux, P., Morel, P., Sanz, G., *et al.* (1997). **“International Scoring System for Evaluating Prognosis in Myelodysplastic Syndromes”** Blood 89(6):2079-2088.

Gronbaek, K., Hother, C., & Jones, P. A. (2007). **“Epigenetic changes in cancer”** Acta pathologica, microbiologica, et immunologica Scandinavica 115:1039-1059.

Herman, J. G., Graff J. G., Myohanen S., Nelkin B. D., & Baylin S. B. (1996) **“Methylation-specific PCR: A novel PCR assay for methylation status of CpG islands”** Proceedings of the National Academy of Sciences 93:9821-9826

Herman, J. G., Civin, C. I., Issa, J-P., Collector, M. I., Sharkis, S. J. & Baylin, S. B. (1997) **“Distinct patterns of inactivation of p15INK4B and p16INK4A characterize the major types of hematological malignancies”**. Cancer Research 57(5):837-841.

Hirai, H. (2003). **“Molecular Mechanisms of Myelodysplastic Syndrome”** Japanese Journal of Clinical Oncology 33(4):153-160.

Hofmanna, W. K., Takeuchi, S., Takeuchi, N., Thiel, E., Hoelzer, D., Koeffler, H. P. (2006). **“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”** Leukemia Research 30:1347-1353

Issa, J-P. J. (2007). **“DNA Methylation as a therapeutic target in Cancer”** Clinical Cancer Research 13(6):1634-1637.

Issa, J-P. (2010). **“Epigenetic Changes in the Myelodysplastic Syndrome”** Hematology/Oncology Clinics of North America 24(2):317-330.

Jädersten, M., & Hellström-Lindberg, E. (2009). **“Myelodysplastic syndromes: biology and treatment”** Journal of Internal Medicine 265:307-328.

Jiang, Y., Dunbar, A., Gondek, L. P., et al. (2009) **“Aberrant DNA methylation is a dominant mechanism in MDS progression to AML”**. *Blood* 113(6):1315-1325.

Jones, P. A., & Baylin, S. B. (2007). **“The epigenomics of Cancer”** *Cell* 128:683-692.

Kerbaui, D. B., & Deeg, H. J. (2007). **“Apoptosis and antiapoptotic mechanisms in the progression of myelodysplastic syndrome”** *Experimental Hematology* 35:1739-1746.

Khan, H., Vale, C., Bhagat, T., & Verma, A. (2013). **“Role of DNA Methylation in the Pathogenesis and Treatment of Myelodysplastic Syndromes”** *Seminars in Hematology* 50(1):16-37.

Kim, H. N., Kim, Y-K., Lee, I-K., Yang, D-H., Lee, J-J., Shin, M-H., Park, K-S., Choi, J-S., Park, M. R., Jo, D. Y., Won, J. H., Kwak, J-Y. & Kim, H-J. (2009) **“Association between polymorphisms of folate-metabolizing enzymes and hematological malignancies”** *Leukemia Research* 33(1):82-87.

Kim, J. W., Park, H. M., Choi, Y. K., Chong, S. Y., Oh, D., Kim, N. K. (2011) **“Polymorphisms in genes involved in folate metabolism and plasma DNA methylation in colorectal cancer patients.”** *Oncology Reports* 25:167-72.

Knudson, A. (2001). **“Two genetic hits (more or less) to cancer”** *Nature Reviews Cancer* 1:157-162.

Lee, K. H., Lim, S. W., Kim, H. G., Kim, D. Y., Ryu, S. Y., Joo, J. K., Kim, J. C., & Lee, J. H. (2009) **“Lack of death receptor 4 (DR4) expression through gene promoter methylation in gastric carcinoma”** *Langenbecks Arch Surg* 394:661-670.

Leone, G., D'Alo, F., Zardo, G., Voso, M. T., & Nervi, C. (2008). **“Epigenetic Treatment of Myelodysplastic Syndromes and Acute Myeloid Leukemias”** *Current Medicinal Chemistry* 15:1274-1287.

Lindsley, C., & Ebert, B. L. (2012). **“Molecular Pathophysiology of Myelodysplastic Syndromes”** Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease 8:21-47.

Lyons, R. M. (2012). **“Myelodysplastic Syndromes: Therapy and Outlook”** The American Journal of Medicine 125:S18-S23.

Ma, X. (2012). **“Epidemiology of Myelodysplastic Syndromes”** The American Journal of Medicine 125:S2-S5.

Malcovati, L., Germing, U., Kuendgen, A., Della Porta, M. G., Pascutto, C., Invernizzi, R., *et al.* (2007). **“Time-Dependent Prognostic Scoring System for Predicting Survival and Leukemic Evolution in Myelodysplastic Syndromes”** Journal of Clinical Oncology 25(23)3503-3510.

McDevitt, M. A. (2012). **“Clinical Applications of Epigenetic Markers and Epigenetic Profiling in Myeloid Malignancies”** Seminars in Oncology 39(1):109-122.

Mulero-Navarro, S., & Esteller, M. (2008). **“Epigenetic biomarkers for human cancer: The time is now”** Critical Reviews in Oncology/Hematology 68:1-11. 8

Musolino, C., Sant'Antonio, E., Penna, G., Alonci, A., Russo, S., Granata, A., Russo, S. (2010). **“Epigenetic therapy in Myelodysplastic Syndromes”** European Journal of Haematology 84:463-473.

Shivapurkar, N., Toyookai, S., Toyookai, K., Reddy, J., Miyajima, K., Suzuki, M., Shigematsu, H., Takahashi, T., Parikh, G., Pass, H. I., Chaudhary, P. M., & Gazdar, A. F. (2004). **“Aberrant methylation of TRAIL decoy receptor genes is frequent in multiple tumor types.”** International Journal of Cancer 109:786-792.

Nikoloski, G., & Reijden, B. A. (2012). **“Mutations in epigenetic regulators in myelodysplastic syndromes”** Progress in Hematology 95:8-16.

Nishino, H. T., & Chang, C-C. (2005). **“Myelodysplastic Syndromes - Clinicopathologic features, Pathobiology, and Molecular Pathogenesis”** Archives of Pathology & Laboratory Medicine 129:1299-1310.

Nimer, S. D. (2008). **“Myelodysplastic Syndromes”** Blood 111:4841-4851.

Parker, J. E., & Mufti, G. J. (2001). **“The role of apoptosis in the pathogenesis of the Myelodysplastic Syndromes”** International Journal of Hematology 73:416-428.

Parker, J., Mufti, G., Rassol, F., Mijovic, A., Devereux, S., & Pagliuca, A. (2000). **“The role of apoptosis, proliferation and the Bcl-2-related proteins in the myelodysplastic syndrome and acute myeloid leukaemia secondary to MDS”** Blood 96(12):3932-3938.

Park, M-T., & Lee, S-J. (2003). **“Cell Cycle and Cancer”** Journal of Biochemistry and Molecular Biology 36(1):60-65.

Raza, A., & Galili, N. (2012). **“The genetic basis of phenotypic heterogeneity in myelodysplastic syndromes”** Nature Reviews Cancer 12:849-859.

Quian, J., Yao, D-M., Lin, J., Wang, Y-L., Han, L-X., Xu, W-R. & Wu, C-Y. (2010). **“Methylation of *DAPK1* promoter: frequent but not an adverse prognostic factor in myelodysplastic syndrome”** International Journal of Laboratory Hematology 32:74-81.

Ritchie, E. K. (2012). **“Safety and efficacy of azacitidine in the treatment of elderly patients with Myelodysplastic Syndrome”** Clinical Interventions in Aging 7:165-173.

Robertson, K. & Jones, P. A. (1998) **“The Human ARF Cell Cycle Regulatory Gene Promoter Is a CpG Island Which Can Be Silenced by DNA Methylation and Down-Regulated by Wild-Type p53”** Molecular and Cellular Biology 18:6457-6473

Russo, A. L., Thiagalingam, A., Pan, H., Califano, J., Cheng, K-H., Ponte, J. F., Chinnappan, D., Nemani, P., Sidransky, D., & Thiagalingam, S. (2005). **“Differential DNA Hypermethylation of Critical Genes Mediates the Stage-Specific Tobacco Smoke-**

Induced Neoplastic Progression of Lung Cancer” *Clinical Cancer Research* 11:2466-2470.

Schernhammer, E., Wolpin, B., Rifai, N. *et al* (2007) **“Plasma Folate, Vitamin B6, Vitamin B12, and Homocysteine and Pancreatic Cancer Risk in Four Large Cohorts.”** *Cancer Research* 67:5553-5560.

Seiter, K. (2013). **“Myelodysplasia: New approaches”** *Current Treatment Options in Oncology*. Seiter, 2013

Stintzing, S., Kemmerling, R., Kiesslich, T., Alinger, B., Ocker, M., & Neureiter, D. (2011). **“Myelodysplastic Syndrome and Histone Deacetylase Inhibitors: "To Be or Not to Be Acetylated?"”** *Journal of Biomedicine and Biotechnology*. Stintzing *et al.*, 2011

Solomon, P. R., Munirajan, A. K., Tsuchida, N., Muthukumarasamy, K., Rathinavel, A., Selvam, G. S. & Shanmugam, G. (2008). **“Promoter hypermethylation analysis in myelodysplastic syndromes: Diagnostic & prognostic implication”** *Indian Journal of Medical Research* 127:52-57.

Suzuki, M., Shigematsu, H., Shivapurkar, N., Reddy, J., Miyajima, K., Takahashi, T., Gazdar, A. F., & Frenkel, E. P. (2006) **“Methylation of apoptosis related genes in the pathogenesis and prognosis of prostate cancer.”** *Cancer Letters* 242:222-230.

Tefferi, A., & Vardiman, J. W. (2009). **“Myelodysplastic Syndromes”** *The New England Journal of Medicine* 361:1872-1885.

Uchida, T., Kinoshita, T., Nagai, H., Nakahara, Y., Saito, H., Hotta, T., Murate, T. (1997). **“Hypermethylation of the p15INK4B gene in Myelodysplastic Syndrome”** *Blood* 90(4):1403-1409.

Vardiman, J. W., Thiele, J., Arber, D. A., Brunning, R. D., Borowitz, M. J., Porwit, A., *et al.* (2009). **“The 2008 revision of the World Health Organization (WHO)**

classification of myeloid neoplasms and acute leukemia: rationale and important changes”
Blood 114:937-951.

Voso, M. T., Scardocci, A., Guidi, F., Zini, G., Di Mario, A., Pagano, L., Hohaus, S., & Leone, G. (2004). **“Aberrant methylation of DAP-kinase in therapy-related acute myeloid leukemia and myelodysplastic syndromes.”** Blood 103:698-700.

Wong, I., Lo, Y., Zhang, J., Liew, C-T., Ng, M., Wong, N., Lai, P., Lau, W., Hjelm, N., & Johnson, P. J. (199) **“Detection of Aberrant p16 Methylation in the Plasma and Serum of Liver Cancer Patients”** Cancer Research 59:71-73.

Yang, H. J., Wang, Y., Chan, K. , Tsang, P., Khoo, U. S., Cheung, A. & Ngan, H. (2004) **“Detection of hypermethylated genes in tumor and plasma of cervical cancer patients.”** Gynecologic Oncology 93(2):435-440.

Yang, X., Lay, F., Han , H., & Jones, P. A. (2010). **“Targeting DNA methylation for epigenetic therapy”** Trends in Pharmacological Sciences 31(11):536-546.

Zang, D. Y., Goodwin, R. G., Loken, M. R., Bryant, E., & Deeg, H. J. (2001). **“Expression of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand, Apo2L, and its receptors in myelodysplastic syndrome: effects on in vitro hemopoiesis”** Blood 98:3058-3065.

Bibliografia