

Emília Nobre Barata Roxo Cortesão

CARACTERIZAÇÃO CLÍNICA E MOLECULAR DA SINDROME MIELODISPLÁSICA - IMPLICAÇÕES NO PROGNÓSTICO E TERAPÊUTICA

Tese de Doutoramento em Ciências da Saúde, Ramo de Medicina, Especialidade de Medicina Interna (Hematologia),
orientada pelo Senhor Professor José Manuel Borges Nascimento Costa e pela Senhora Professora Ana Bela Sarmento Antunes Cruz Ribeiro,
e apresentada na Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra

Agosto 2014



UNIVERSIDADE DE COIMBRA



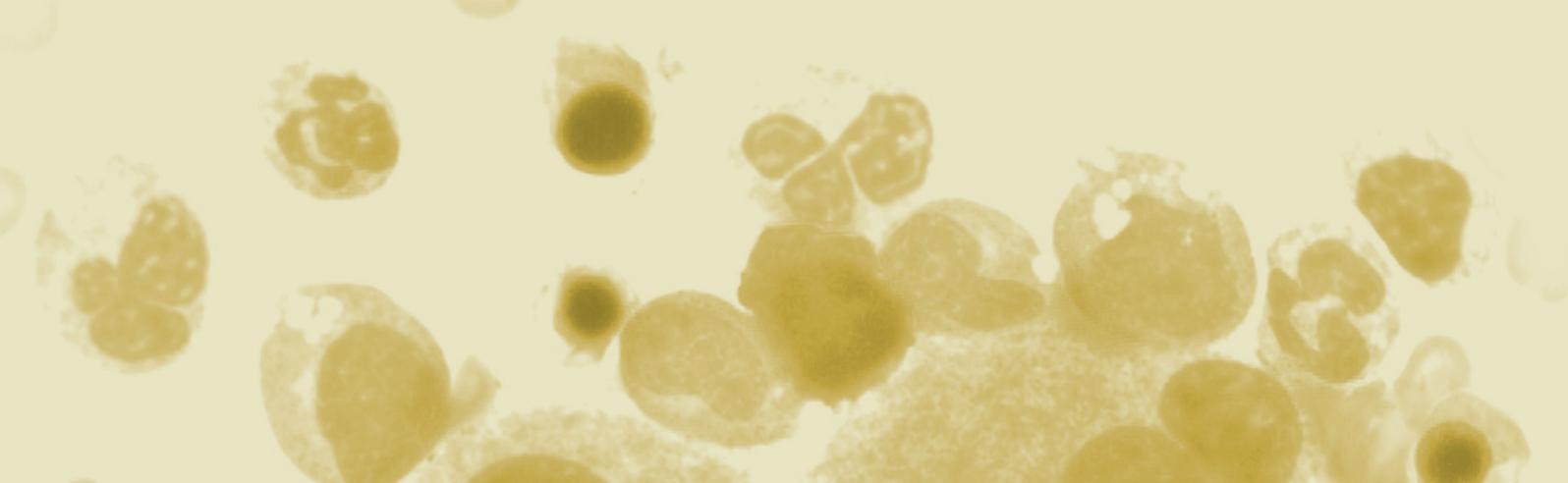
UNIVERSIDADE DE COIMBRA
FACULDADE DE MEDICINA

**CARACTERIZAÇÃO CLÍNICA E MOLECULAR
DA SÍNDROME MIELODISPLÁSICA
- IMPLICAÇÕES NO PROGNÓSTICO E TERAPÊUTICA**

Emília Nobre Barata Roxo Cortesão

Coimbra, 2014

Tese de Doutoramento em Ciências da Saúde, Ramo de Medicina, Especialidade de Medicina Interna (Hematologia), orientada pelo Senhor Professor José Manuel Borges Nascimento Costa e pela Senhora Professora Ana Bela Sarmento Antunes Cruz Ribeiro e apresentada na Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra.

A microscopic view of various cells, likely from a blood smear, showing different shapes and sizes, some with prominent nuclei. The background is a light, warm yellow color.

AGRADECIMENTOS

Um doutoramento é, pela sua índole académica, um trabalho individual, mas convoca contributos de natureza diversa que emprestam vontade e incitam à investigação. Na preparação desta tese, foram muitas as pessoas e as instituições que, transmitindo-me confiança e apoio ou apresentando-me ideias e sugestões, marcaram presença neste cativante momento de aprofundar o saber científico na área da Hematologia. Não posso, por isso, deixar de realçar estas colaborações, manifestando o meu reconhecido agradecimento.

Aos meus orientadores Professor Doutor José Manuel Nascimento Costa e Professora Doutora Ana Bela Sarmento Ribeiro, o meu sincero agradecimento pelo estímulo intelectual, a partilha do saber, a crítica construtiva e oportuna e o tempo que generosamente me dedicaram.

À Doutora Letícia Ribeiro, directora do Serviço de Hematologia do Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra, pelo apoio, incentivo e amizade desde o meu início na Hematologia.

À Dr.^a Adriana Teixeira à Dr.^a Maria Isabel Sousa pelo incentivo à realização deste trabalho e pela presença desafiadora e confiante durante esta viagem.

A todos os meus colegas e amigos, em especial, ao Dr. José Pedro Carda, à Dr.^a Catarina Geraldês, à Dr.^a Emília Magalhães, ao Dr. Luís Rito, à Dr.^a Marília Gomes, à Dr.^a Paula César, à Dr.^a Rita Tenreiro, à Dr.^a Mónica Santos, à Dr.^a Sofia Ramos e à Dr.^a Raquel Guilherme por terem acreditado neste projeto e terem contribuído ativamente no encaminhamento de doentes que permitiram a realização deste trabalho.

À Dr.^a Lénia Jorge e à Dr.^a Teresa Silva pelo precioso contributo na avaliação morfológica das amostras.

Ao Dr. Carlos Moucho, Dr.^a Lénia Jorge e Dr.^a Nélia Jerónimo pela realização dos estudos citogenéticos, imprescindíveis nesta patologia.

Ao Professor Doutor Artur Paiva pela contribuição na análise por citometria de fluxo.

Ao Professor Doutor Santos Rosa, director do serviço de Imunologia, pelo apoio e colaboração prestados ao longo deste tempo.

À Dr.^a Vera Alves pelo contributo através dos estudos realizados por citometria de fluxo.

À minha amiga e colega de Doutoramento, Dr.^a Ana Cristina Gonçalves, pela preciosa colaboração no trabalho laboratorial, em particular os estudos moleculares.

Ao Professor Doutor Alexandre Silva e Dr.^a Marta Pereira, pelo indispensável contributo com a análise estatística.

À Dr.^a Amélia Pereira, diretora do serviço de Medicina do Hospital da Figueira da Foz, sempre disponível e empenhada no envio de amostras e dados clínicos dos doentes.

Ao Victor Hugo, sempre disponível, pelo magnífico *design* desta tese.

Aos Enfermeiros do Serviço de Hematologia, sempre disponíveis.

A todos os doentes que, embora de forma anónima, contribuíram para este estudo e, conseqüentemente para o avanço da investigação nesta área do conhecimento.

À CIMAGO, Centro de Investigação em Meio Ambiente, Genética e Oncobiologia, em especial ao Professor Doutor Carlos Freire de Oliveira, pelo apoio financeiro, sem o qual não teria sido possível dar continuidade ao projeto desenvolvido no Mestrado.

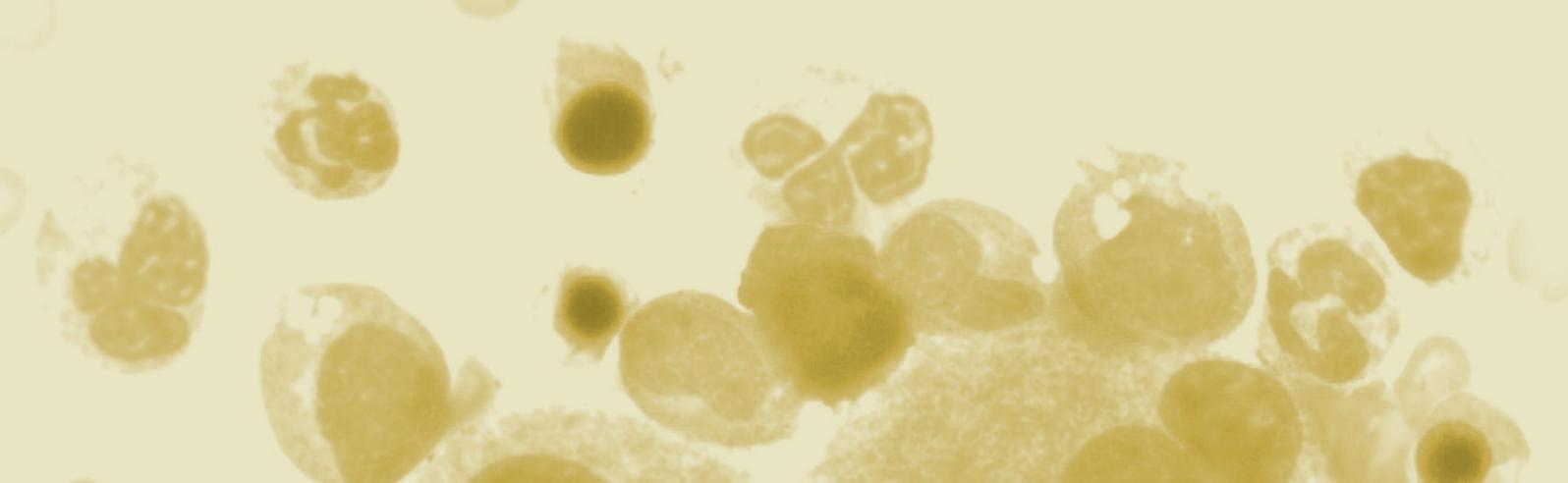
Aos meus amigos, pela fraternal e sólida amizade.

À Dr.^a Ana Isabel Espadana, colega e amiga, com quem tenho vindo a trabalhar desde que terminei a especialidade de Hematologia, pela amizade e ternura, pela convivência franca e produtiva, pelos ensinamentos que me fizeram crescer.

À Laura e ao Nuno, pelo amor feito de sorrisos, pela compreensão e cumplicidade, pela força transmitida por palavras e olhares confiantes em todos os momentos desta caminhada.

Aos meus pais, à minha irmã e à minha avó Luísa, pelo apoio incondicional, pela doce presença e pelo amor e carinho imensuráveis.

O meu profundo e sentido agradecimento a todas as pessoas que, ao longo do meu Doutoramento, me ajudaram a abraçar o meu sonho e a realizar mais esta etapa no meu percurso académico e profissional.



ÍNDICE

RESUMO	XI
ABSTRACT	XV
ABREVIATURAS	XIX
1. Introdução. Síndrome Mielodisplásica	1
1.1. Definição e breve perspetiva histórica	1
1.2. Epidemiologia	2
1.3. Etiologia	3
1.4. Fisiopatologia	6
1.4.1. Suscetibilidade a lesão e/ou instabilidade genómica	9
1.4.2. Modificações epigenéticas	10
1.4.3. Alterações citogenéticas e genéticas	22
1.4.3.1. Alterações citogenéticas	22
1.4.3.2. Alterações genéticas – mutações e translocações	27
1.4.3.2.1. Mutações em genes envolvidos na metilação do ADN	28
1.4.3.2.2. Mutações nos genes da remodelação da cromatina	31
1.4.3.2.3. Mutações nos genes do spliceossoma	32
1.4.3.2.4. Mutações no gene <i>TP53</i>	34
1.4.3.2.5. Mutações no gene <i>RAS</i>	35
1.4.3.2.6. Mutações nos genes <i>JAK</i> e <i>MPL</i>	36
1.4.3.2.7. Mutações nos recetores de tirosina cinase	36
1.4.3.2.8. Translocações mais frequentes na SMD	37
1.4.4. Micro-ARNs	39
1.4.5. Alterações nas vias de sinalização celular	40
1.4.5.1. Vias de proliferação celular	42

1.4.5.2. Vias de morte celular programada	45
1.4.6. Desregulação do sistema imune e ambiente medular	50
1.5. Características clínicas	52
1.6. Características laboratoriais	53
1.7. Diagnóstico, classificação e prognóstico	54
1.8. Tratamento	58
1.9. Prognóstico e Evolução	61

2. Objectivos 63

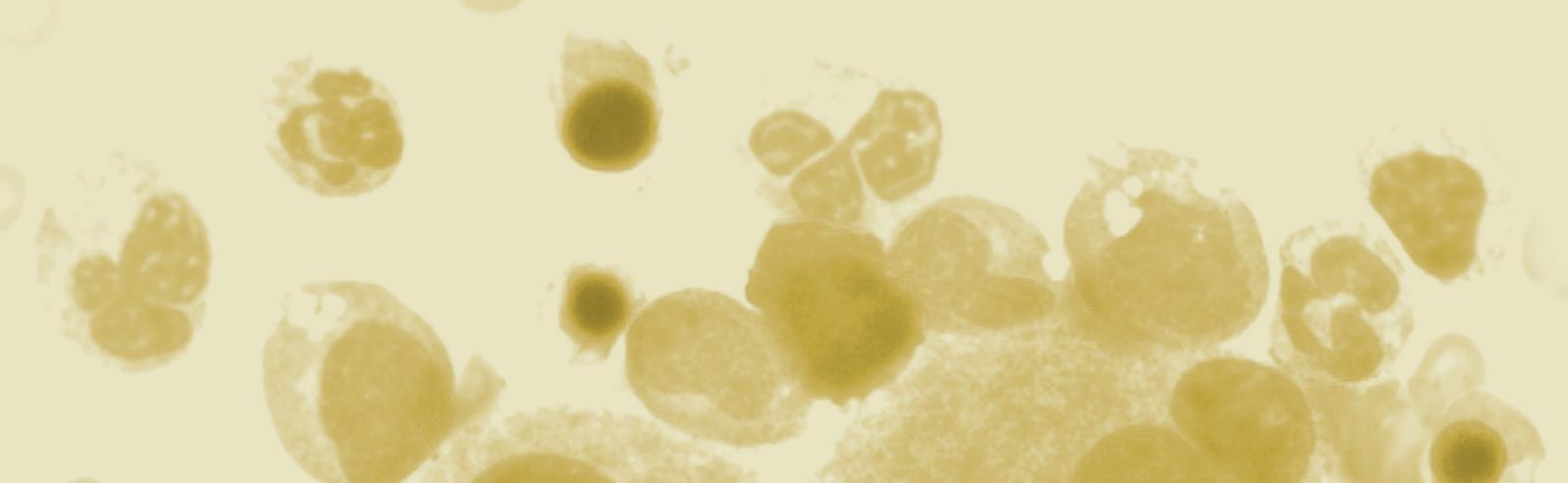
3. Materiais e Métodos 65

3.1. Estudos realizados em doentes com Síndrome Mielodisplásica e controlos	65
3.1.1. Seleção dos doentes	65
3.1.2. Determinação dos parâmetros hematológicos e bioquímicos dos doentes	67
3.1.3. Análise das amostras dos doentes por citometria de fluxo	67
3.1.3.1. Isolamento e caracterização de células estaminais pluripotenciais	67
3.1.3.2. Avaliação de marcadores moleculares envolvidos nas vias de sinalização da apoptose	68
3.1.4. Análise do perfil de metilação dos doentes	70
3.1.4.1. Extração e quantificação do ADN genómico	70
3.1.4.2. 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> . ..	71
3.1.5. Detecção de mutações no gene <i>FLT3</i>	73
3.1.6. Análise genotípica das variantes polimórficas da enzima metilenotetrahidrofolato redutase dos doentes e controlos ...	73
3.2. Estudos realizados na linha celular de Mielodisplasia humana	75
3.2.1. Caracterização e manutenção da linha Celular F-36P	75
3.2.2. Avaliação do Efeito Citotóxico e Citostático de Fármacos Anticancerígenos	76
3.2.2.1. Estabelecimento de Curvas Dose-Resposta	76

3.2.2.2. Avaliação do tipo de Morte Celular Induzida por Fármacos Anticancerígenos	77
3.2.3. Detecção de mutações dos genes <i>RAS</i> e <i>FLT3</i>	79
3.2.3.1. Gene <i>RAS</i> – Extração, quantificação e detecção de ADN ...	79
3.2.3.2. Gene <i>FLT3</i> – Detecção das mutações ITD e D825V	84
3.2.4. Análise do mecanismo de ação dos fármacos anticancerígenos	86
3.2.4.1. Avaliação da expressão de laminas, conjugados da ubiquitina e moléculas da apoptose, por citometria de fluxo .	86
3.2.4.2. Análise do perfil de metilação dos genes <i>p15</i> e <i>p16</i> por MS-PCR	87
3.3. Análise estatística	88
4. Resultados	91
4.1. Resultados na amostra de doentes com SMD	91
4.1.1. Caracterização da amostra	91
4.1.2. Caracterização clínica, laboratorial e molecular dos doentes com SMD segundo o subtipo da OMS	95
4.1.2.1. Análise de parâmetros hematológicos	96
4.1.2.2. Análise do perfil citogenético	98
4.1.2.3. Análise dos parâmetros bioquímicos	98
4.1.2.4. Análise do perfil de metilação	100
4.1.2.5. Análise das moléculas de apoptose	101
4.1.2.6. Análise das mutações <i>FLT3</i>	103
4.1.3. Análise da célula estaminal por citometria de fluxo	104
4.1.4. Análise dos polimorfismos da MTHFR	106
4.1.5. Análise dos doentes que evoluíram para LMA e determinação de um novo índice de progressão para Leucemia Aguda	109
4.1.5.1. O novo índice de progressão para Leucemia Aguda (IPLA) ..	109
4.1.6. Análise dos doentes que faleceram	110
4.1.7. Análise da sobrevivência	110
4.2. Estudos efetuados na linha celular F-36P	114
4.2.1. Caracterização da linha celular F-36P	114
4.2.2. Detecção de mutações nos genes <i>RAS</i> e <i>FLT3</i>	115
4.2.2.1. Detecção de mutações nos genes <i>RAS</i> por sequenciação	115

4.2.2.2. Detecção de mutações no gene <i>FLT3</i>	116
4.2.3. Análise do efeito citotóxico e citostático de novos fármacos anticancerígenos nas células F-36P	117
4.2.3.1. Análise da viabilidade e densidade celular pelo método do Azul de Tripãno – Curvas Dose-Resposta	117
4.2.3.2. Análise da morte celular induzida pelos fármacos anticancerígenos nas células F-36P	123
4.2.3.2.1. Avaliação da morte celular por microscopia ótica	124
4.2.3.2.2. Avaliação da morte celular por citometria de fluxo recorrendo à marcação por anexina V	127
4.2.4. Análise dos mecanismos envolvidos na citotoxicidade induzida pelos novos fármacos anticancerígenos na linha celular F-36P	128
5. Discussão	133
5.1. Influência da análise de parâmetros clínicos, laboratoriais e moleculares no diagnóstico, prognóstico e avaliação de grupos de risco em doentes com SMD	133
5.1.1. Caracterização clínico-laboratorial dos doentes com SMD.....	133
5.1.2. Caracterização celular e molecular dos doentes com SMD.....	135
5.1.2.1. Influência da célula estaminal pluripotencial no diagnóstico e prognóstico dos diferentes subtipos de SMD	135
5.1.2.2. Avaliação da influência da apoptose no diagnóstico e prognóstico dos diferentes subtipos de doentes com SMD.....	137
5.1.2.3. Influência do perfil de metilação de genes no diagnóstico e prognóstico de doentes com SMD	138
5.1.2.4. Influência dos polimorfismos da MTHFR no perfil de metilação e prognóstico em doentes com SMD	143
5.1.3. Análise dos doentes que evoluíram para LMA	147
5.1.3.1. Identificação de um novo índice de progressão para Leucemia Aguda (IPLA)	148
5.1.4. Análise de sobrevivência	148
5.2. Estudos efetuados na linha celular de SMD.....	149
5.2.1. Avaliação da eficácia terapêutica dos fármacos	150

5.2.1.1. Avaliação da eficácia terapêutica do inibidor da farnesiltransferase	151
5.2.1.2. Avaliação da eficácia terapêutica do inibidor do proteasoma.	154
5.2.1.3. Avaliação da eficácia terapêutica do inibidor da tirosina cinase.	157
5.2.1.4. Avaliação da eficácia terapêutica dos agentes epigenéticos.	158
5.3. Limitações do estudo e perspectivas futuras	160
5.3.1. Limitações do estudo	160
5.3.2. Perspetivas para investigações futuras	161
6. Conclusão	163
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	167
ANEXOS	199



RESUMO

A Síndrome Mielodisplásica (SMD) é um grupo heterogêneo de doenças hematológicas caracterizado por citopenia(s) periférica(s) com medula hiperclular, hematopoiese ineficaz devido a aumento da apoptose e proliferação anormal de blastos. Esta patologia está associada a elevado risco de progressão para leucemia aguda com sobrevivência global baixa e resistência às terapêuticas convencionais.

A etiologia e patogênese da SMD permanecem pouco esclarecidas. Para além da falência medular e das citopenias periféricas, comuns nas diversas formas de Síndrome Mielodisplásica, a proliferação clonal de progenitores hematopoiéticos associada a mutações genéticas e/ou epigenéticas hereditárias ou adquiridas pode também estar presente.

Apesar de múltiplas tentativas para explicar os mecanismos moleculares desta entidade, pouco se sabe sobre a patogênese do passo promotor ou do estágio inicial.

As alterações epigenéticas têm sido reconhecidas na última década como fatores importantes no desenvolvimento do fenótipo maligno.

Os padrões aberrantes de metilação são um mecanismo comum nas neoplasias humanas, especialmente do sistema hematopoiético. Podem estar envolvidos vários genes, dentro dos quais o *p15*, um gene frequentemente inativado na SMD por metilação aberrante das ilhas 5'CpG. A inativação deste gene tem vindo a ser associada ao risco de evolução da doença para Leucemia Mieloblástica Aguda (LMA), conferindo mau prognóstico. Outros genes, como o *p16*, *p53*, *DPAK*, *MGMT* e recetores do TRAIL, têm sido menos estudados em séries de doentes com Síndrome Mielodisplásica.

Os polimorfismos funcionais em genes chave, nomeadamente, da enzima metilenotetrahidrofolatoreductase (MTHFR), também podem influenciar a metilação do ADN. São conhecidos dois polimorfismos no gene da MTHFR, C677T e A1298C.

Até à data, a Leucemia Mieloblástica Aguda e a Síndrome Mielodisplásica constituem desafios terapêuticos porque o único tratamento curativo é o transplante de células pluripotenciais hematopoiéticas. No entanto, a maioria destes doentes apresenta uma média de idades superior a 70 anos, estando mais suscetível aos efeitos colaterais da quimioterapia. Estas dificuldades podem ser ultrapassadas por terapêuticas dirigidas a alvos moleculares que passem pela modulação dos mecanismos epigenéticos envolvidos na patogênese destas neoplasias.

Os objetivos deste trabalho foram avaliar as alterações moleculares envolvidas na Síndrome Mielodisplásica, nomeadamente a relevância clínica da célula estaminal leucémica, das alterações epigenéticas e da apoptose na patogênese dos vários subtipos da Organização Mundial de Saúde (OMS), na evolução para Leucemia Aguda, sobrevivência e grupos de risco prognóstico. Além disso, pretendeu-se analisar o potencial terapêutico de fármacos dirigidos a alvos moleculares, como um inibidor da farnesiltransferase (α -HFGPA), um inibidor do proteasoma (MG262), um inibidor tirosina cinase (Imatinib) e moduladores epigenéticos (Tricostatina A e Decitabina), identificando a associação com menor dose e maior eficácia terapêutica.

Para o efeito estudámos o perfil de metilação de genes reguladores do ciclo celular, *p15*, *p16* e *p53*, genes moduladores da apoptose, *DAPK* e recetores do *TRAIL*, e genes envolvidos na reparação do ADN, como o *MGMT*, em células da medula óssea de 102 doentes com SMD *de novo*, utilizando a *Polymerase Chain Reaction* (PCR) específica de metilação (MS-PCR). Os polimorfismos da *MTHFR* (C677T e A1298C) foram analisados por *PCR Restriction Fragment Length Polymorphism* (RFLP). A identificação e caracterização da célula estaminal hematopoiética (HSC) e estaminal leucémica (LSC) foi efetuada por citometria de fluxo recorrendo às marcações CD34/CD117/CD123/IL-6/TNF- α . A avaliação das proteínas reguladoras da apoptose (via membrana e mitocondrial), em particular as proteínas da família BCL-2, BCL-2 e BAX, o TRAIL e seus recetores, o FAS-L, a IAP survivina, a caspase 3, o citocromo C e a p53, foi também realizada por citometria de fluxo utilizando anticorpos monoclonais marcados com sondas fluorescentes.

O potencial terapêutico de fármacos em monoterapia e em associação foi avaliado em uma linha celular de SMD/LMA em cultura, as células F-36P, através de ensaios de viabilidade e proliferação celular recorrendo ao teste de azul de tripano ou ao teste da resazurina. O tipo de morte celular foi analisado por citometria de fluxo, através da dupla marcação com anexina V e iodeto de propídeo, e por microscopia ótica, após coloração das células com May-Grümwald-Giemsa.

Os doentes têm idade mediana de 74 anos (22-89), com uma razão Masculino/Feminino de 0,8. Os subtipos de SMD segundo a Organização Mundial de Saúde são: Citopenia Refractária com displasia multilinha (CRDM) (n=52), Citopenia Refractária com displasia unilinha (CRDU) (n=12), Anemia Refractária

com Excesso de Blastos (AREB)-1 (n=8), AREB-2 (n=8), Anemia Refractária com sideroblastos em anel (n=6), Síndrome 5q- (n=4) e Leucemia Mielomonocítica Crônica (LMMC) (n=12) com o seguinte *International Prognostic Scoring System* (IPSS): baixo (n=37), intermédio-1 (n=39), intermédio-2 (n=10) e alto (n=1). Onze dos 102 doentes evoluíram para LMA. Evidencia-se um predomínio de subtipos menos agressivos, o que se reflete em índices de prognóstico de risco baixo e intermédio.

A análise de parâmetros bioquímicos permitiu identificar a eritropoietina como fator de mau prognóstico, quando elevada, estando associada aos doentes que evoluíram para LMA e a taxas de sobrevivência inferiores. Além disso, os níveis de plaquetas (média mais baixa), a maior percentagem de blastos (média mais elevada) e de células estaminais mielóides com expressão de IL-6 (CD34+/CD117+/IL-6+) e os índices de prognóstico (riscos intermédio e alto) são entre todos os parâmetros avaliados os que podem influenciar a evolução para LMA ($p < 0,05$). Destas variáveis estudadas, somente a LDH e a eritropoietina relevaram impacto na sobrevivência, quando os seus níveis séricos estão elevados.

A análise da célula estaminal hematopoiética permitiu a identificação de dois grupos de células, um com características fenotípicas “normais”, as HSC, e outro com características neoplásicas, as LSC, as quais expressam diferencialmente IL-6 e TNF- α . No entanto, os resultados são mais evidentes nos doentes do subtipo AREB-2 (a IL-6 predomina na HSC e o TNF- α na LSC). Estes resultados sugerem a relevância destes dois marcadores na distinção destes dois grupos de células estaminais.

O estudo da apoptose mostrou uma diminuição significativa da caspase 3 no subtipo AREB-2, em comparação com os outros subtipos. Estes resultados corroboram o envolvimento da apoptose na SMD, em particular a resistência à apoptose nos doentes de alto risco, podendo a caspase 3 vir a constituir um novo marcador de diagnóstico e prognóstico em doentes com SMD.

Os resultados do perfil de metilação mostram que mais de 50% dos doentes apresentam dois ou mais genes metilados e que, somente 14,7% da população estudada não apresenta metilação de nenhum gene. Como a metilação é um evento mais frequente nos subtipos iniciais da SMD, nesta população, sugere a interferência da metilação numa fase inicial da doença. Os genes mais frequentemente encontrados metilados são os genes *p15* e *DAPK*, em 56% e 54% dos doentes, respetivamente.

Neste sentido, elaborámos uma proposta de um novo índice de progressão, que denominámos Índice de Progressão para Leucemia Aguda (IPLA). Este índice é caracterizado por uma pontuação que corresponde à soma dos parâmetros: hematológicos e bioquímicos, célula estaminal, metilação e apoptose, quando

alterados. Com este tipo de análise verificámos que os doentes com os subtipos da OMS que apresentavam as pontuações mais elevadas foram os que evoluíram para LMA. Desta forma, este novo índice de prognóstico, poderá constituir uma nova “ferramenta” para avaliar o risco de progressão para LMA.

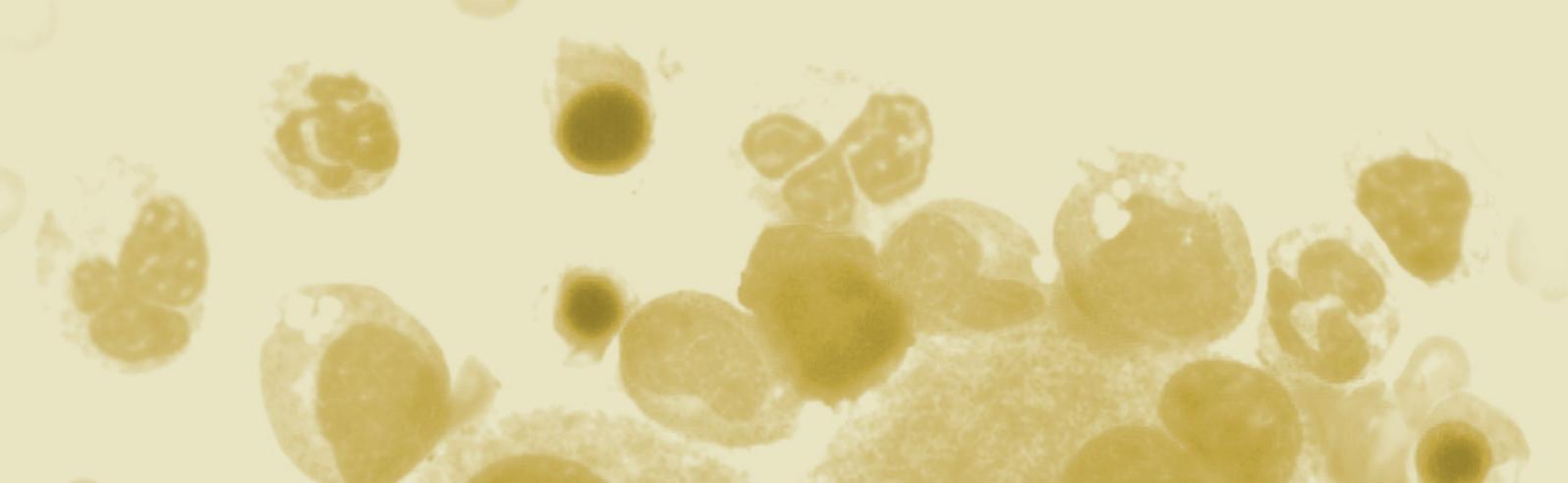
O genótipo AC do polimorfismo A1298C da MTHFR mostrou associação com a SMD, mas sem relação estatística com os doseamentos séricos do folato e da vitamina B12 ou com o *status* de metilação dos genes estudados.

Os estudos efetuados na linha celular de SMD permitiram a obtenção de dados experimentais relativamente ao potencial terapêutico de novos fármacos em SMD, nomeadamente das associações do α -Hfpa com MG262 e/ou Imatinib e da TSA A com a DEC, mostrando que estas combinações induzem diminuição da proliferação das células F-36P de modo dependente da concentração, do tempo de exposição, do modo e esquema de administração dos fármacos, induzindo morte celular preferencialmente por apoptose.

Em conclusão, este estudo sugere um papel da metilação na SMD, sobretudo nos grupos de baixo risco, o que poderá alterar a atual abordagem terapêutica. Revelou ainda uma associação entre o genótipo AC do polimorfismo A1298C da MTHFR com a SMD. Permite ainda identificar fatores de mau prognóstico, como a eritropoietina e a LDH, e um novo índice de risco de progressão para Leucemia Aguda.

Além disso, os novos fármacos testados na linha celular poderão constituir uma nova abordagem terapêutica na SMD, em monoterapia ou em esquemas terapêuticos combinados, o que permitirá a diminuição da toxicidade secundária, melhorando a qualidade de vida e a sobrevivência destes doentes.

Palavras-chave: síndrome mielodisplásica, epigenética, metilação, polimorfismos MTHFR, apoptose, célula estaminal, prognóstico, índice de risco, terapêuticas dirigidas.



ABSTRACT

Myelodysplastic syndromes (MDS) are a heterogeneous group of hematologic disorders characterized by peripheral blood cytopenias with a hypercellular marrow, ineffective hematopoiesis due to increased apoptosis, and an abnormal proliferation of blast cells. These disorders associate with an increased risk of progression to secondary acute leukemia, with a markedly decreased overall survival and resistance to conventional antileukemic drugs.

The etiopathogenesis of MDS remains unclear. In addition to the features of bone marrow failure and peripheral cytopenias that are common in MDS, a clonal proliferation of hematopoietic progenitor cells is characteristic of the disorder, resulting from genetic mutations and/or hereditary or acquired epigenetic changes.

Despite ongoing attempts at clarifying the molecular mechanisms of this pathologic entity, data about the pathogenesis of the promoting step and of the initial stages of the disease remain scarce.

Over the last decade, epigenetic changes have emerged as an important factor in the development of the malignant phenotype.

Aberrant patterns of methylation are a common pathogenic mechanism in human neoplastic disorders, especially within the hematopoietic system. Several genes can be involved, including *p15*, a gene that is frequently inactivated in MDS through the aberrant methylation of 5'CpG islands. The inactivation of this gene associates with an increased risk of progression to acute myeloid leukemia (AML), and with a worse prognosis. Other genes, including *p16*, *p53*, *DPAK*, *MGMT* and *TRAIL* receptors, have been less extensively studied *in vivo*.

Functional polymorphisms in key genes, such as the enzyme methylenetetrahydrofolate reductase (*MTHFR*), can affect DNA methylation. Two such polymorphisms have been described in the *MTHFR* gene: C677T and A1298C.

AML and MDS are still major therapeutic challenges, with the only curative treatment being the transplantation of hematopoietic pluripotent cells. However, affected patients have an average age over 70 years old, which renders them more susceptible to the adverse effects of chemotherapy. These limitations can be overcome by therapies directed at molecular targets, including those responsible for the modulation of the epigenetic mechanisms involved in the pathogenesis of these neoplasms.

This study aims to evaluate the molecular changes involved in MDS, especially the clinical relevance of the leukemic stem cell phenotype, of epigenetic changes, and of apoptosis, in the pathogenesis of the different World Health Organization (WHO) MDS subtypes, in the evolution to acute leukemia, and in survival rates and prognostic risk groups. Additionally, the therapeutic potential of drugs directed at specific molecular targets - such as a farnesyltransferase inhibitor (α -HFPA), a proteasome inhibitor (MG262), a tyrosine kinase inhibitor (imatinib) and two epigenetic modulators (trichostatin A and decitabine) - was studied, and the association using the lowest dose with the highest efficacy was identified.

The methylation profile of the cell cycle regulator genes *p15*, *p16* and *p53*, the apoptosis modulator genes *DAPK* and *TRAIL* receptors, and the DNA repair gene *MGMT*, was characterized in bone marrow cells from 102 patients with *de novo* MDS, through methylation-specific polymerase chain reaction (MS-PCR). The C677T and A1298C polymorphisms of the *MTHFR* gene were identified through PCR restriction fragment length polymorphism (RFLP). The identification and characterisation of the hematopoietic stem cell (HSC) and the leukemic stem cell (LSC) was achieved through the flow cytometric assessment of CD34, CD117, CD123, IL-6 and TNF- α . The expression of apoptosis regulator proteins from the mitochondrial pathway and the cell membrane pathway, such as the BCL-2 family proteins BCL-2 and BAX, TRAIL and its receptors, FAS-ligand, IAP survivin, caspase 3, cytochrome C and p53 was also analysed through flow cytometry.

The therapeutic potential of the cited drugs, both in monotherapy and in association, was determined in an MDS/AML cell line (F-36P), through cell proliferation assays and the trypan blue exclusion assay. The type of cell death was determined through flow cytometry, using annexin V and propidium iodide, and through optical microscopy, using the May-Grümwald-Giemsa stain.

Patients had a median age of 74 years old (range: 22-89), with a male:female ratio of 0.8. Patients were diagnosed according to WHO criteria as refractory cytopenia with multilineage dysplasia (RCMD) (n=52), refractory cytopenia with unilineage dysplasia (RCUD) (n=12), refractory anemia with excess blasts (RAEB)-1 (n=8), RAEB-2 (n=8), refractory anemia with ring sideroblasts (RARS) (n=6), 5q- syndrome (n=4) and chronic myelomonocytic leukemia (CMML)

(n=12), and were classified according to the International Prognostic Scoring System (IPSS) as low risk (n=37), intermediate-1 (n=39), intermediate-2 (n=10) and high risk (n=1). Eleven of the 102 patients progressed to AML. The higher rate of less aggressive WHO subtypes translated into a higher prevalence of low and intermediate risk prognostic groups.

The analysis of biochemical parameters identified increased erythropoietin as a negative prognostic factor, associating with decreased overall survival and higher rates of progression to AML. Increased lactate dehydrogenase (LDH) levels were the only other biochemical predictor of decreased overall survival. On the other hand, decreased absolute platelet counts, increased percentage of blasts, increased percentage of IL-6-expressing (CD34+/CD117+/IL-6+) myeloid stem cells, and high IPSS risk groups were also predictors of the evolution to AML.

Our analyses of the hematopoietic stem cell identified two groups of cells, one with a canonical phenotype (HSC) and the other with neoplastic characteristics (LSC), which a different expression of IL-6 and TNF- α . Although our results suggest that these two markers are useful for the distinction of the two groups of stem cells, those differences were more marked in RAEB-2, with IL-6 prevailing in HSC, and TNF- α in LSC.

Apoptosis studies showed a trend towards an decrease of caspase 3 in RAEB-2 subtype, corroborating the previously described role of caspase 3 in MDS, and suggesting that it might be a new diagnostic and prognostic marker.

Methylation profiles revealed that over half of patients had two or more methylated genes, while only 14.7% had none. Considering that, in our sample, aberrant methylation is more frequent in early-stage disease, this suggests that methylation is involved primarily in the initial stages of MDS. The genes that were most frequently methylated were *p15* and *DAPK*, in 56% and 54% of patients, respectively.

As a result of our findings, we developed a proposal for a new prognostic index, the Acute Leukemia Progression Index (ALPI), calculated through the sum of altered hematologic, biochemical, stem cell, methylation and apoptosis parameters. We observed that patients with the highest scores were the most likely to progress to AML, suggesting that this new prognostic index could be a useful tool to evaluate the risk of progression to over leukemia.

The AC genotype of the A1298C MTHFR polymorphism associated with MDS, but had no association with serum folate or vitamin B12 levels, or with the methylation status of the studied genes.

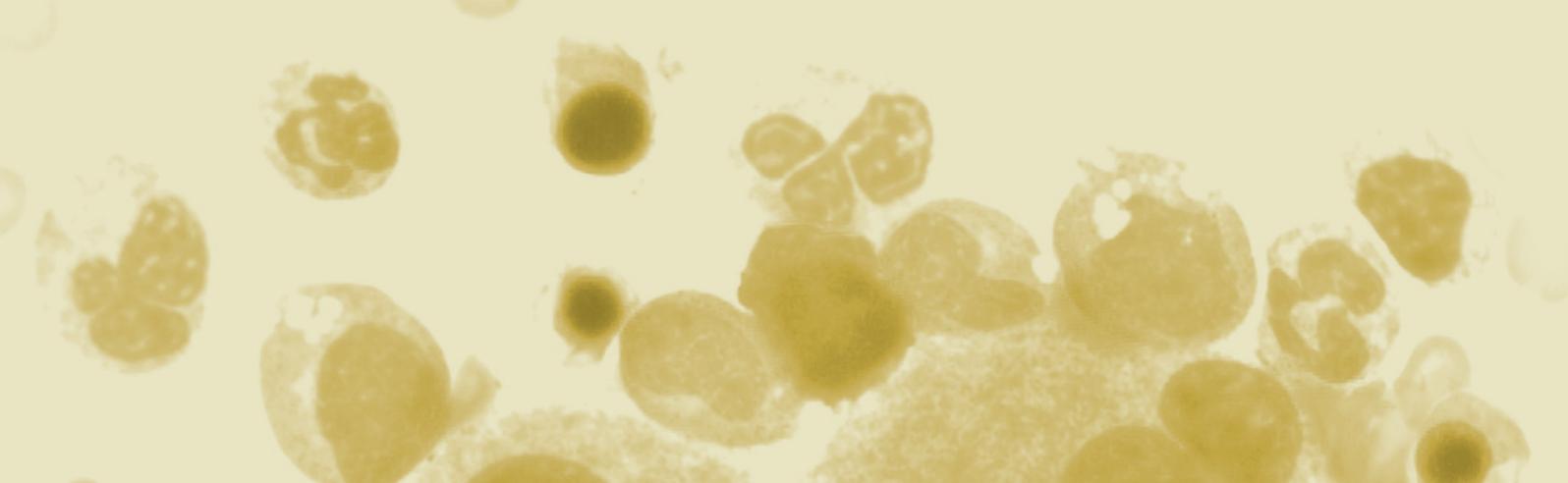
Cell proliferation assays contributed new data on the therapeutic potential of novel drugs in MDS, especially of the associations of α -HFGPA with MG262 and/or imatinib, and of trichostatin A and decitabine, which were shown to

decrease the proliferation of F-36P cells and induce cell death mostly through apoptosis, in a concentration-dependent mode influenced by the duration of exposure, and the protocol of administration.

In conclusion, this study suggests methylation plays a role in MDS, especially in low-risk groups, which could in the future affect the rationale behind current therapeutic approaches. In addition, it showed an association between the AC genotype of the MTHFR A1298C polymorphism and MDS. It also identified negative prognostic markers, such as increased erythropoietin and LDH levels, and proposed a new prognostic index for the progression to AML.

The drugs tested *in vitro* could be a new therapeutic approach in MDS, in monotherapy or in combination, reducing the adverse effects of treatment, while improving the quality of life and overall survival of patients.

Key words: myelodysplastic syndrome, epigenetics, methylation, MTHFR polymorphisms, apoptosis, stem cell, prognosis, risk score, target therapies.



ABREVIATURAS

- α -HFPA** – *alfa-hydroxyfarnesyl phosphonic acid*
- ADN** – ácido desoxirribonucleico
- ALIPs** – precursores imaturos em localização anormal
- AML1** – *acute myeloid leukemia 1*
- APAF-1** – *apoptotic protease-activating factor-1*
- AR** – Anemia Refratária
- ARDM** – Anemia Refratária com displasia multilinear
- AREB** – Anemia Refratária com Excesso de Blastos
- AREB-t** – Anemia Refratária com Excesso de Blastos em transformação
- ARN** – ácido ribonucleico
- ARSA** – Anemia Refratária com Sideroblastos em Anel
- ASXL1** – *additional sex combs like transcriptional regulator 1*
- ATG** – globulina antitimócito
- BAP1** – *BRCA1-associated protein 1*
- BCOR** – *BCL6 corepressor*
- CDC** – *Cell-Division Control*
- c-FLIP** – *FADD-like interleukin-1 beta-converting enzyme (FLICE) celular*
- CRDM** – Citopenia Refratária com displasia multilinear
- CTNNA1** – *alpha-E-catenin*
- DAPK** – *death-associated protein kinase*
- dATP** – desoxiadenosina trifosfato
- DEC** – decitabina
- DISC** – complexo sinalizador de indução de morte
- DNMT** – ADN metiltransferases
- ECACC** – *European Collection of Cell Cultures*
- EPO** – eritropoietina
- EPO-R** – recetor da eritropoietina
- ERK** – *Extracellular Signal-Regulated Kinase*
- ETS** – *E-twenty six*
- EVI-1** – *Ecotropic viral integration site 1*

EZH2 – *enhancer of zeste homolog2*
FAB – Franco-Américo-Britânico
FADD – domínio de morte associado à proteína FAS
FADH – *flavin adenine dinucleotide*
FDA – *Food and Drug Administration*
FISH – *Fluorescence in situ hybridization*
FITC – fluoresceína isotiocianato
FLICE – *FADD-like interleukin-1 beta-converting enzyme*
FLT3 – *FMS-like tyrosine kinase 3*
FSC – *forward scatter*
FT – fatores de transcrição
G-CSF – fator estimulador de colónias de granulócitos
GDP – guanosina difosfato
GM-CSF – fator estimulador de colónias de granulócitos e monócitos
GRAF – *GTPase regulator associated with the focal adhesion kinase pp125FAK*
GSTT1 – glutationa transferase teta 1
GTP – guanosina trifosfato
HAT – histona acetiltransferase
HDACi – inibidores das deacetilases das histonas
HDACs – histonas deacetilases
HSC – *hematopoietic stem cell*
IAP – proteínas inibidoras da apoptose
ICE – enzima de conversão da interleucina-1 α
IDH – isocitrate dehydrogenase
IPLA – índice de progressão para Leucemia Aguda
IL-3 – interleucina 3
IL-6 – interleucina 6
IP – iodeto de propídeo
IPSS – *International Prognostic Scoring System*
IRF-1 – fator regulador do interferão 1
JAK – cinase Janus
LLA – leucemia linfoblástica aguda
LMA – leucemia mieloblástica aguda
LMC – leucemia mielóide crónica
LMMC – leucemia mielomonocítica crónica
LMMJ – leucemia mielomonocítica juvenil
LSC – *leukemic stem cell*
MAPK – *Mitogen-Activated Protein Kinases*
MBP – *Methyl Binding Proteins*
M-CSF – fator estimulador das colónias de monócitos
MEK – *MAP Kinase/ERK Kinase*
MGMT – *O-6-methylguanine-DNA methyltransferase*

MLL – *myeloid/lymphoid ou mixed lineage leukemia*
MN1 – meningioma 1
MS-PCR – *Methylation-Specific Polymerase Chain Reaction*
MTHFR – metilenotetrahidrofolato reductase
MTRR – 5-metiltetrahidrofolato homocisteína metiltransferase
NADH – nicotinamida adenina dinucleotídeo
NADPH – fosfato de nicotinamida adenina dinucleotídeo
NF1 – neurofibromatose 1
NMP – neoplasia mieloproliferativa
NPM-MLF1 – *nucleophosmin/myeloid leukemia factor 1*
NQQ1 – NADPH quinona oxirredutase
NUP98 – nucleoporina 98 kDa
OMS – Organização Mundial de Saúde
OR – *Odd's Ratio*
PARP – PoliADP Ribose Polimerase
PBS – tampão fosfato
PCR – *Polymerase Chain Reaction*
PDGFR – fator de crescimento derivado das plaquetas
PI3K – fosfatidil inositol-3-cinase
PIK3CG – *phosphoinositide-3-kinase, catalytic, gamma polypeptide*
PLC γ – Fosfolipase C γ
PLP – piridoxal fosfato
PPTM – poro de permeabilidade transitório mitocondrial
PTI – púrpura trombocitopénica idiopática
RFLPs – *restriction fragment length polymorphisms*
RTK – recetor da tirosina cinase
SAH – s-adenosilhomocisteína
SAM – adenosilmetionina
SF3B1 – *splicing factor 3b, subunit 1*
SPARC – *protein acidic and rich in cysteine*
SMD – Síndrome Mielodisplásica
SOD – superóxido dismutase
SPSS – *Statistical Package for Social Sciences*
SRC – Sarcoma de Rous
SRSF2 – *serine/arginine-rich splicing factor 2*
SSC – *side scatter*
STATs – *Signal Transducers and Activators of Transcription*
TEL – *ETS variant gene 6*
TET – Ten-eleven-translocation
TGF- β – fator de crescimento tumoral β
TNF- α – fator de necrose tumoral α
TPO – trombopoietina

TRADD – *Tumor necrosis factor receptor type 1 associated death domain protein*

TRAIL – ligando indutor da apoptose relacionado com o TNF

TRAIL-R – recetor do ligando indutor da apoptose relacionado com o TNF

TSA – tricostatina A

U2AF1 – *U2 small nuclear RNA auxiliary factor*

VEFG – fator de crescimento do endotélio vascular

ZRSR2 – *zinc finger, RNA-binding motif nad serine/arginine rich*

Introdução. Síndrome Mielodisplásica

1.1. Definição e breve perspectiva histórica

As Síndromes Mielodisplásicas (SMD) são um grupo heterogéneo de doenças clonais da célula estaminal hematopoiética caracterizadas por medula hiperclular e displásica, com hematopoiese ineficaz, que conduz à insuficiente produção de células sanguíneas periféricas (citopenias). A denominação errónea de SMD deve-se às características morfológicas de displasia, no sangue periférico e medula, embora na realidade se trate de uma doença neoplásica.

O reconhecimento e a classificação das SMD evoluíram ao longo dos anos à medida que o conhecimento sobre a patologia foi aumentando. A primeira descrição de SMD foi efetuada por Leube em 1900, com a denominação de *leukanamie*, uma anemia macrocítica em progressão para leucemia aguda, sem resposta ao tratamento e cuja etiologia se pensava ser infecciosa. Décadas mais tarde, foram descritos grupos de doentes com leucemia aguda precedida por anemia macrocítica, com as mesmas características clínicas (Eva Hellström-Lindberg, 2008).

Em 1942, Chevallier e colaboradores, apresentaram formalmente as *odo-leucemias* (*odo*, do grego, significa início), ou seja doenças com elevado risco de evoluir para leucemia. Chevallier propôs a terminologia *leucoses* para designar genericamente as leucemias, embora sem sucesso. Em 1949, Hamilton-Paterson utilizou o termo anemia pré-leucémica para descrever doentes com leucemia mieloblástica aguda (LMA) precedida por anemia refractária (Eva Hellström-Lindberg, 2008).

Mais tarde, em 1953, Block e a sua equipa (Block, Jacobson, & Bethard, 1953) expandiram o conceito de modo a incluir neste tipo de entidades nosológicas outras citopenias, para além da anemia. Estes autores relataram 12 casos de doentes com evidência clínica de falência medular que desenvolveram LMA após uma fase pré-leucémica com 27 meses de duração. Este facto levou a uma

nova denominação, de *pré-leucemia*, que se manteve até 1970s, data em que se constatou que muitos destes doentes nunca evoluíam para leucemia aguda porém, faleciam devido às complicações infecciosas secundárias à neutropenia. Deste modo, a terminologia *pré-leucemia* caiu em desuso e o termo *Síndrome mielodisplásica* tornou-se reconhecido há mais de 50 anos (Nimer, 2008b).

Numa conferência sobre leucemias não classificadas, em 1975, Marcel Bessis e Jean Bernard (Abrégé d'hématologie) sugeriram o termo *displasia hematopoiética*, mais tarde abreviado para *mielodisplasia*, para um grupo de doenças com um curso mais indolente do que a LMA. Em 1982, o Grupo Cooperativo Franco-Americo-Britânico (FAB) designou formalmente este grupo heterogêneo de doenças por Síndromes Mielodisplásicas (Nimer, 2008b).

1.2. Epidemiologia

As SMD são as neoplasias hematológicas mais frequentes nos idosos (idade mediana 70 anos), provavelmente refletindo a intervenção prolongada de múltiplos agentes leucemogênicos para o desenvolvimento da doença (Eva Hellström-Lindberg, 2008). De facto, exceto nas SMD secundárias à radiação ou quimioterapia administrada por outra neoplasia, este tipo de patologias é rara antes dos 50 anos (M. T. Smith *et al.*, 2001). No entanto, pode ocorrer em qualquer idade, incluindo na infância (1/milhão/ano entre os 5 meses e os 15 anos). De salientar que a maioria dos casos diagnosticados na infância está relacionada com doenças hereditárias que predispõem para SMD, como a Síndrome de Down, a Síndrome de Bloom, a Síndrome de Schwachman-Diamond e a Anemia de Fanconi, e apresentam características diferentes da SMD do adulto. Assim, os subtipos Anemia Refractária com Sideroblastos em Anel (ARSA) e a Síndrome 5q- raramente são observados em crianças, ao contrário das alterações do cromossoma 7. De facto, em cerca de 30% dos casos de SMD diagnosticados na infância são detetadas alterações do cromossoma 7, enquanto nos adultos estas só se observam em 10% dos doentes (Niemeyer, 2002).

A verdadeira incidência de SMD é difícil estabelecer, devido a diversos fatores, nomeadamente poucos estudos estatísticos e à existência de doentes com citopenias ligeiras, potencialmente SMD, que não são estudados. Os dados obtidos em estudos europeus mostram que a taxa de incidência anual global de SMD é de 3 a 5/100000 indivíduos/ano na população em geral, aumentando para 20 a 50/100000 indivíduos/ano após os 70 anos de idade (Ulrich Germing *et al.*, 2004) (Williamson, Kruger, Reynolds, Hamblin, & Oscier, 1994) (Aul, Gattermann, & Schneider, 1992). Nos Estados Unidos da América,

ocorrem cerca de 15000 novos casos/ano, o que indica que as SMD são pelo menos tão comuns como a Leucemia Linfocítica Crónica, a forma mais comum de leucemia nos países Ocidentais (Aul, Giagounidis, & Germing, 2001).

No entanto, a incidência da doença tem-se mantido estável; o aumento inicial verificado reflete provavelmente um diagnóstico precoce e melhorado, e a tendência crescente em investigar doentes idosos com citopenias (Aul & Germing, 1998) (Reizenstein & Dabrowski, n.d.).

A SMD tem maior incidência no sexo masculino, sendo o rácio masculino: feminino de 1.4:1 (X. Ma, 2012) (X. Ma, Selvin, Raza, Foti, & Mayne, 2007).

1.3. Etiologia

A etiologia e o tempo de latência da maioria dos casos de SMD primária ou *de novo* permanecem desconhecidos. O facto da idade de apresentação ser tardia pode indicar que o processo de envelhecimento medular tem um papel nesta entidade. Além disso, o *stress* oxidativo, mediado por lesão mitocondrial, tem sido frequentemente citado como um dos mecanismos envolvidos no envelhecimento. Embora as alterações mitocondriais estejam bem definidas na ARSA, não se pode concluir a sua relação com o processo de envelhecimento. Por outro lado, apesar de estarem descritas famílias em que mais do que um elemento tem o diagnóstico de SMD, não existe evidência de que esta patologia tenha uma base hereditária (S. S. Strom, Gu, Gruschkus, Pierce, & Estey, 2005) (A. H. West, Godley, & Churpek, 2014).

Numa minoria de casos (15%), a exposição prévia a quimioterapia ou radiação ionizante, está identificada como fator de risco, designando-se SMD secundária ou relacionada com a terapêutica. Nestes casos, o período de latência varia entre 1 a 41 anos, nos casos de exposição prévia a diferentes radiações, e 1 a 10 anos nos casos de terapêutica com agentes alquilantes. Os subtipos mais frequentemente associados são a ARSA e a Leucemia Mielomonocítica Crónica (LMMC). As alterações cromossómicas, embora qualitativamente semelhantes às SMD *de novo*, estão presentes em proporções diferentes, assim como as alterações genéticas (Tabela 1). Além disso, a taxa de sobrevivência destes doentes é inferior à dos doentes com SMD *de novo*, 7 meses *versus* 32 meses, respetivamente.

A radiação ionizante é um agente leucemogénico bem conhecido, cujos efeitos são dependentes da dose e duração da exposição. Os mecanismos incluem quebras nas cadeias do ácido desoxirribonucleico (ADN) que podem resultar em deleções ou translocações cromossómicas. Um estudo envolvendo

TABELA 1

Frequência das mutações genéticas na SMD <i>de novo</i> e na SMD e LMA secundárias à terapêutica	Tipo de gene	Nome do gene	Frequência em SMD <i>de novo</i> (%)	Frequência em SMD-t (%)	Frequência em LMA <i>de novo</i> (%)	Frequência em LMA-t (%)
	Supressor tumoral	p53 p.m.	5-10	25-30	10-15	20-25
	Tirosina cinase	FLT3 ITD JAK2 p.m.	raro 2-5	raro 2-5	35-50 raro	10 raro
	Via RAS/BRAF	KRAS/NRAS p.m. PTPN11 p.m.	10* 3-5**	10 3-5	10 3-5	10 3-5
	Fatores de transcrição	AML1 c.r. CBFB c.r. MLL c.r. RAR c.r. EVI1 c.r. AML1 p.m. NPM1 p.m. CEBPA p.m.	raro raro raro raro raro 10-15 raro raro	2 raro raro raro raro 15-30 4-5 raro	7-10 5-8 5-7 5-10 2-3 5-10 40-50 15-20	5-7 2-3 5-7 2-3 2-3 2-3 15 raro

p.m.: point mutation; ITD: internal tandem duplication; c.r.: chimeric rearrangement;
SMD-t: SMD secundária a tratamento; LMA-t: LMA secundária a tratamento

* 15-20% na leucemia mielomonocítica juvenil.
** 30-40% na leucemia mielomonocítica juvenil.

(Adaptado de Pedersen-Bjergaard Jens *et al.*, 2007)

neoplasias hematológicas induzidas por radiação, em sobreviventes da bomba atômica, mostra que estão associadas a mutações do gene *acute myeloid leukemia 1* (AML1), em particular nos doentes que desenvolveram SMD e/ou LMA (Harada, Tanaka, Kimura, & Inaba, 2003).

Por outro lado, os citostáticos mais frequentemente associados à SMD são os agentes alquilantes e os inibidores da topoisomerase II, frequentemente utilizados para o tratamento de linfomas e tumores sólidos. No entanto, o risco aumenta com a idade e é proporcional ao tempo de exposição, sendo a incidência máxima 5 a 7 anos após a exposição ao agente, com um intervalo de tempo entre 1 a 10 anos. Estes fármacos podem provocar lesão do ADN e das suas enzimas de reparação, levando a perda da integridade cromossômica. Além disso, nos doentes com linfoma, mieloma múltiplo ou neoplasia sólida, submetidos a transplante autólogo de medula, o risco de desenvolver SMD relacionada com o condicionamento é variável, segundo os estudos, entre 1 a 12%. A maioria dos casos ocorre 5 anos após o transplante e os fatores de risco incluem a idade e o condicionamento utilizado (Del Cañizo *et al.*, 2000).

Os agentes alquilantes podem causar deleções, monossomias ou perda dos braços longos dos cromossomas 5 e/ou 7, que podem ser consequência da maior suscetibilidade à quebra centromérica, após exposição a estes fármacos. As mais comuns incluem deleções ou perda do braço longo do cromossoma 7 (7q) ou monossomia 7, sem alterações do cromossoma 5, resultando em mutações do gene *RAS* e metilação do promotor do gene *p15*. Seguem-se as deleções ou perda do braço longo do cromossoma 5 (5q) ou monossomia 5, frequentemente associadas a mutações do gene *p53*. Além do referido, existem também casos de SMD em doentes previamente tratados para outras neoplasias hematológicas mielóides, como a leucemia promielocítica, devido à sua elevada taxa de sobrevivência. No entanto, a existência de outras patologias,

como a Anemia de Fanconi e a Anemia Aplástica, pode aumentar a predisposição para a ocorrência de SMD (Sara S. Strom, Vélez-Bravo, & Estey, 2008).

Recentemente, tem sido referida uma hipótese que procura relacionar a existência de polimorfismos de determinados genes, que codificam proteínas envolvidas na metabolização de fatores ambientais, com a maior suscetibilidade para a ocorrência de SMD. Como exemplos podemos citar as enzimas envolvidas no metabolismo dos carcinogénios (glutathione S-transferase), na defesa contra o *stress* oxidativo (superóxido dismutase - SOD, catalase e glutathione peroxidase) e na reparação do ADN (RAD51) (Jawad, Seedhouse, Russell, & Plumb, 2006).

O benzeno tem sido referido como um dos tóxicos ambientais que frequentemente se encontra associado ao desenvolvimento de SMD. As principais fontes de exposição a baixas concentrações de benzeno no quotidiano são o fumo do tabaco e a gasolina (Du, Fryzek, Sekeres, & Taioli, 2010) (M. T. Smith, 2001). Os dados biológicos *in vitro* suportam o papel da citotoxicidade do benzeno nas células hematopoiéticas, em baixas doses, mas ainda não existe uma forte evidência epidemiológica para esta ocorrência (M. T. Smith & Rothman, 2000). Por outro lado, a exposição a elevadas concentrações de benzeno provoca, inequivocamente, toxicidade medular, normalmente aplasia, que pode evoluir para mielodisplasia e/ou LMA (M. T. Smith & Rothman, 2000). A reduzida atividade da enzima fosfato de nicotinamida adenina dinucleotídeo (NADPH) quinona oxirreductase, que inativa o metabolito do benzeno altamente tóxico, a benzoquinona, está associada com o aumento do risco leucémico (M. T. Smith *et al.*, 2001) (Rothman *et al.*, 1997).

As principais diferenças entre SMD relacionada com a terapêutica e SMD *de novo* incluem: idade de apresentação mais jovem, elevada incidência de evolução para leucemia aguda, citopenias mais graves, displasia medular mais marcada (displasia trilinear), diminuição da celularidade medular com fibrose, elevada incidência de alterações clonais citogenéticas e resistência à terapêutica. Globalmente, estes doentes apresentam um pior prognóstico (Bacher, Haferlach, Kern, Haferlach, & Schnittger, 2007).

Alguns autores têm reportado uma associação com doença autoimune, a preceder ou a coincidir com o diagnóstico de SMD, encontrando-se documentada em estudos epidemiológicos (Kristinsson *et al.*, 2011) (Zervas, Geary, & Oleesky, 1974) (Voulgarelis, Giannouli, Ritis, & Tzioufas, 2004) (Farmakis *et al.*, 2005) (Ramadan, Fouad, Summa, Hasan, & Lo-Coco, 2012) (Olnes & Sloand, 2011) (Vignon-Pennamen *et al.*, 2006) (Cohen, 2007) (Enright & Miller, 1997). Uns sugerem que cerca de 10% das SMD representam uma doença relacionada com o sistema imune (Voulgarelis *et al.*, 2004). Em particular, uma mielodisplasia marcada e mantida por SMD pode ocorrer após o início de certas doenças cutâneas, como o Síndrome de Sweet, o pênfigo bolhoso, várias formas de vasculite e de doenças reumatológicas, incluindo

policondrite, polineuropatia e doença inflamatória intestinal (Voulgarelis *et al.*, 2004) (Olnes & Sloand, 2011) (Vignon-Pennamen *et al.*, 2006) (Cohen, 2007) (Enright & Miller, 1997). A resolução da doença cutânea e da SMD associada pode ocorrer em simultâneo com a terapêutica dirigida.

1.4. Fisiopatologia

A etiologia e patogênese da SMD permanecem pouco esclarecidas. Para além da falência medular e das citopenias periféricas comuns nas diversas formas de SMD, a proliferação clonal de progenitores hematopoiéticos associada a mutações genéticas hereditárias ou adquiridas e/ou ao silenciamento de genes por modificações epigenéticas, pode também estar presente.

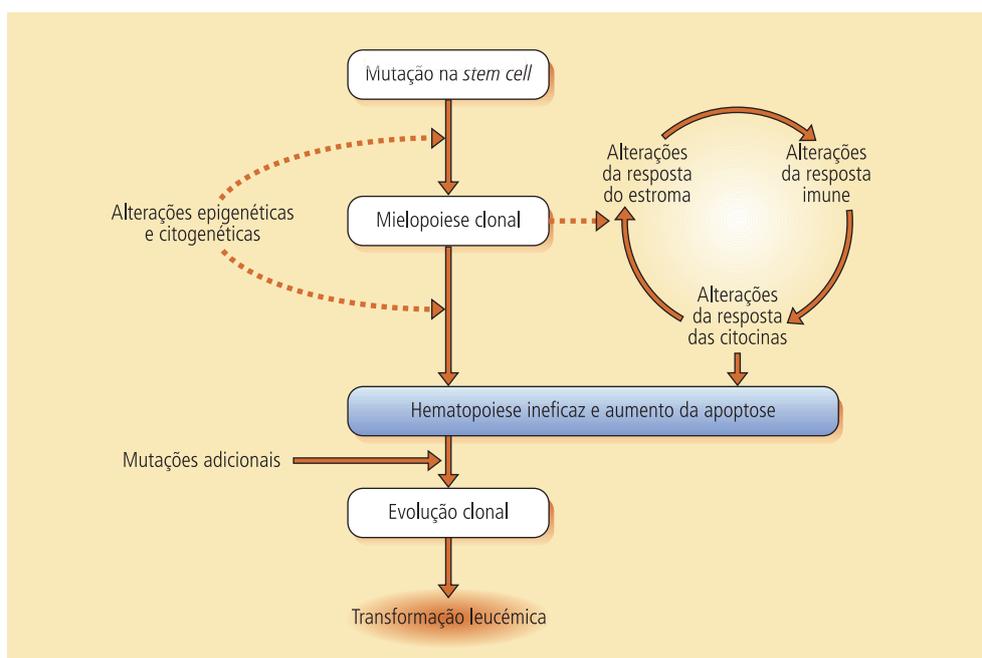
Assim, a história natural da SMD é altamente variável, refletindo o conjunto de alterações genéticas e epigenéticas associadas a esta patologia. Por outro lado, o desenvolvimento da SMD e a sua frequente progressão para leucemia aguda ocorre em várias etapas e engloba múltiplos mecanismos e fatores, hereditários e ambientais, que atingem a célula estaminal hematopoiética, levando à alteração da função celular e à emergência e conseqüente evolução clonal (Figura 1) (Pfeilstöcker *et al.*, 2007). Este clone apresenta instabilidade genómica, vantagem de crescimento, displasia e disfunção celular, como por exemplo, aumento de secreção local de citocinas inibitórias, hematopoiese ineficaz e alteração da diferenciação (Nimer, 2008a).

FIGURA 1

Potenciais mecanismos celulares e moleculares envolvidos na SMD.

A SMD tem origem provavelmente em uma *stem cell* hematopoiética primitiva geneticamente transformada. No entanto, alterações genéticas e epigenéticas adicionais contribuem para a diversidade fenotípica, (in)eficiência hematopoiética e susceptibilidade à transformação leucémica. O tipo de respostas envolvendo o estroma, o sistema imune e a produção de citocinas também contribuem para o fenótipo da doença, em particular para a hematopoiese ineficaz e aumento da apoptose.

(Adaptado de Tefferi A., 2009).



Um dos paradoxos da SMD é a presença de citopenias periféricas com uma medula hiperclular. O clone mutado evidencia uma aceleração da proliferação, especialmente na linhagem mielóide. No entanto, o aumento da taxa de proliferação da população clonal na medula é rapidamente equilibrado por um aumento da apoptose. A morte celular pode ser iniciada por linfócitos T ativados (na tentativa de eliminar o clone maligno), pela secreção de proteínas de morte celular (FAS/FAS-Ligando) e/ou citocinas pró-inflamatórias (fator de necrose tumoral – TNF- α e interleucina-6 – IL-6), pela expressão de proteínas pró-apoptóticas da família BCL-2 (BAX, BAD, BAK, entre outras), e/ou através da deficiência de fatores de crescimento hematopoiéticos (alterações do estroma) (Nimer, 2008b) (Mufti, 2004).

Apesar de múltiplas tentativas para explicar os mecanismos moleculares envolvidos na SMD, pouco se sabe sobre a patogénese do passo promotor ou do estágio inicial. Tem sido referido o envolvimento de várias vias de tradução de sinal, nomeadamente a via de sinalização envolvendo as proteínas RAS. Por outro lado, a inativação do gene supressor tumoral *p53* tem sido detetada em 5 a 10% das SMD, principalmente em estádios avançados ou com cariótipos instáveis, indicando que estas mutações podem ter um papel na progressão leucémica da SMD (Nimer, 2008b) (Valko *et al.*, 2007).

Além disso, vários estudos têm demonstrado evidência do aumento da apoptose nos estádios iniciais ou diminuição da taxa de morte celular com a progressão da doença (Nishino & Chang, 2005). Embora, o aumento da morte celular programada na SMD possa ocorrer como uma tentativa inicial de controlo celular ou resposta compensatória à proliferação clonal desregulada, como mencionado, pode também representar uma consequência fisiopatológica das alterações epigenéticas associadas à biologia desta patologia.

Um dos mecanismos envolvidos na morte celular por apoptose pode estar relacionado com o *stress* oxidativo (Farquhar & Bowen, 2003) (Gonçalves *et al.*, 2013), em particular com a produção de radicais livres de oxigénio (Valko *et al.*, 2007) e a disfunção mitocondrial (N. Gattermann, 2000). O *stress* oxidativo persistente pode também causar respostas adaptativas nas células neoplásicas, conferindo resistência à apoptose (Toyokuni, Okamoto, Yodoi, & Hiai, 1995) e, conseqüentemente, à terapêutica (Ziemann, Bürkle, Kahl, & Hirsch-Ernst, 1999). Alguns estudos mostram expressão ou atividade aumentada de antioxidantes derivados de tióis, assim como de enzimas antioxidantes, como a superóxido dismutase, a glutatona peroxidase e a catalase, em alguns tecidos tumorais quando comparados com controlos normais (Ziemann *et al.*, 1999) (Sarmiento-Ribeiro *et al.*, 2012).

O aumento da expressão e libertação do ligando indutor da apoptose relacionado com o TNF (TRAIL), também conhecido como ligando Apo2 (Apo2L), a nível medular altera provavelmente a eritropoiese contribuindo para a anemia, a principal característica da SMD (Campioni *et al.*, 2005).

O mecanismo pelo qual o TRAIL elimina as células é desconhecido. Uma hipótese é a expressão diferencial dos recetores apoptóticos do TRAIL, TRAIL-R1 e -R2, também denominados, DR4 e DR5, e/ou dos seus recetores anti-apoptóticos, TRAIL-R3 e -R4, também designados por recetores *decoy*, DcR1 e DcR2 (Zang, Goodwin, Loken, Bryant, & Deeg, 2001). Um mecanismo alternativo seria a expressão diferencial ou defeitos funcionais dos inibidores citoplasmáticos da apoptose como a proteína inibidora da enzima de conversão da interleucina-1 α (ICE), o domínio de morte associado à proteína FAS (FADD), a proteína inibidora do *FADD-like interleukin-1 beta-converting enzyme* (FLICE) celular (c-FLIP), ou outras proteínas inibidoras da apoptose (IAP) como a survivina, tal como referido em outros tumores (Badran *et al.*, 2003).

Os padrões aberrantes de metilação são outro mecanismo comum nas neoplasias humanas, especialmente do sistema hematopoiético. Podem estar envolvidos vários genes, dentro dos quais o *p15*, um gene importante na regulação do ciclo celular na transição da fase G1 para S. Este gene codifica uma proteína inibidora da cinase dependente da ciclina CDK-1 e encontra-se frequentemente inativado na SMD por metilação aberrante das ilhas 5'CpG. A inativação deste gene tem vindo a ser associada com o risco de evolução da doença para LMA, conferindo mau prognóstico (Hirai, 2003). Numa amostra de 26 doentes, os resultados sugerem que a metilação pode constituir um mecanismo precoce na etiopatogenia da SMD (Emília Cortesão, Tese 2011; Cortesão E., Atualizações em Oncologia 2012; Jorge J., 8th YES 2013).

Os grupos metilo necessários para as reacções de metilação podem derivar de produtos da dieta como o folato e a vitamina B12 (Ulrey, Liu, Andrews, & Tollefsbol, 2005) (Figura 2). Permanece no entanto controversa a relação entre a ingestão/*status* do folato e a metilação do ADN.

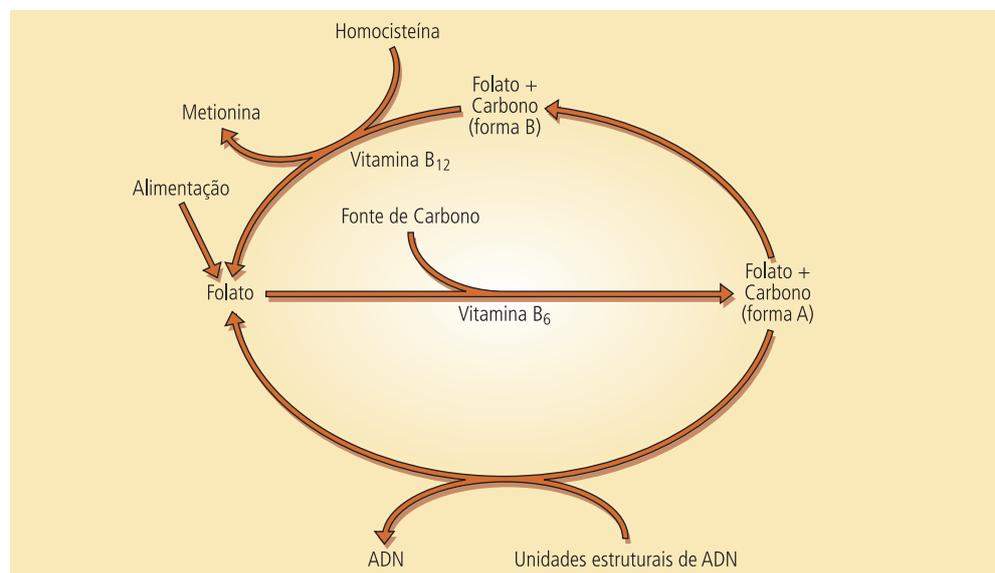


FIGURA 2

Folato e Vitamina B12 como dadores de grupos metilo para as reacções de metilação.

(Adaptado de Stefan de Vogel, 2008).

Os polimorfismos funcionais em genes chave também podem influenciar a metilação do ADN, nomeadamente, os relacionados com a enzima metileno-tetrahidrofolato reductase (MTHFR). São conhecidos dois polimorfismos no gene da MTHFR, o C677T e o A1298C.

O genótipo da MTHFR parece influenciar a metilação, uma vez que, numa amostra de 26 doentes com SMD, a maioria dos doentes heterozigóticos CT para o polimorfismo C677T e AC para o A1298T apresentam metilação do *p16* e/ou *p15*. Além disso, o genótipo CT do polimorfismo C677T da MTHFR parece ser fator de risco para SMD (OR 3,982), nessa população (Emília Cortesão, Tese 2011).

1.4.1. Suscetibilidade a lesão e/ou instabilidade genómica

Como mencionado, a SMD pode emergir de uma mutação somática da célula progenitora hematopoiética. A confirmação da clonalidade foi efetuada por análise citogenética e estudos de inativação do cromossoma X em doentes com SMD (Abrahamson *et al.*, 1991) (Delforge, 2003). No entanto, também existe suporte científico de que as alterações citogenéticas, frequentemente observadas nesta patologia, podem ser adquiridas durante a progressão da doença, não refletindo o evento clonal inicial (Delforge, 2003) (Nilsson *et al.*, 2002). Independentemente da instabilidade genómica ser um evento primário ou secundário, esta tem um papel importante na patogénese da SMD, evidenciada pela frequência das alterações citogenéticas observadas nesta patologia. Estas alterações citogenéticas resultam da acumulação da lesão genómica e/ou da falência de reparação da lesão do ADN.

Por outro lado, o *stress* oxidativo parece igualmente implicado na fisiopatologia da SMD, como referido. Alguns autores têm demonstrado existir uma associação entre défices e/ou polimorfismos de enzimas antioxidantes, como a glutathione transferase teta 1 (GSTT1), a NADPH quinona oxirredutase (NQO1) (Farquhar & Bowen, 2003), a superóxido dismutase (Gonçalves *et al.*, 2010) e o aumento do risco de SMD. De facto, vários estudos mostram que o desequilíbrio redox induzido pelo *stress* oxidativo na célula pode estar relacionado com a estimulação oncogénica, e que a lesão oxidativa do ADN interfere com a expressão de genes envolvidos na regulação de várias vias de transdução de sinal, podendo estar implicadas no processo de carcinogénese (Valko *et al.*, 2007).

Outro mecanismo possível para a instabilidade genómica envolve a dinâmica dos telómeros e a enzima telomerase. O encurtamento dos telómeros pode resultar na fusão da parte terminal dos cromossomas e consequente instabilidade cromossómica. Além disso, a redução do comprimento do

telómero tem sido reportada como fator de mau prognóstico nos doentes com SMD (Engelhardt, Wäsch, & Guo, 2004) (Ohyashiki *et al.*, 1994) (Paiva & Calado, 2014) (Dong, Qian, & Yang, 2014) (Poloni *et al.*, 2013).

1.4.2. Modificações epigenéticas

Nos organismos multicelulares, os diversos tipos celulares têm genótipos idênticos mas, são funcional e morfológicamente diferentes. Esta diversidade de fenótipos não é, no entanto, totalmente explicada pela genética clássica. De facto, durante o desenvolvimento de um organismo são estabelecidos diferentes padrões de expressão génica que são regulados por mecanismos epigenéticos.

O conceito de epigenética foi introduzido em 1939 por C.H. Waddington (Waddington, 1939), quando se referiu às interações entre os genes e os seus produtos que produzem um determinado fenótipo. Mais tarde, a epigenética foi relacionada com as alterações hereditárias na expressão génica que não se devem a alterações na sequência do ADN (Esteller, 2008).

Assim, o termo epigenética refere-se a um número de modificações bioquímicas da cromatina que, não alterando a sequência primária do ADN, têm um importante papel na regulação e controlo da expressão génica (Attwood, Yung, & Richardson, 2002) (Nakayama *et al.*, 1998) (Tsukamoto, Morita, Karasawa, & Omine, 1992). Deste modo, a transmissão de informação através dos níveis de expressão dos genes opõe-se à genética que se refere à informação transmitida na base da sequência dos nucleótidos. Herdada durante a divisão celular, para além da sequência de ADN (Feinberg, 2007), a epigenética mantém a integridade do genoma e a identidade celular (Weber *et al.*, 2007). Contrariamente às alterações genéticas observadas no cancro, as modificações epigenéticas são de início gradual e progressivas, os efeitos são dose-dependentes e potencialmente reversíveis.

As modificações epigenéticas podem ocorrer a nível do ADN (ex. metilação do ADN) e/ou afetar a estrutura das proteínas da cromatina (código das histonas), entre outras, ambas potencialmente reversíveis (Yoo & Jones, 2006).

De facto, a metilação do ADN é um importante mecanismo epigenético de regulação da expressão dos genes e da manutenção da integridade e estabilidade do ADN, contribuindo para o aparecimento de modificações cromosómicas e desenvolvimento de mutações (Mulero-Navarro & Esteller, 2008). Consiste na adição de um grupo metilo ao C5 do anel de resíduos de citosina que precedem as guaninas, os dinucleótidos CpGs, numa reação catalizada pelas enzimas ADN metiltransferases. Esta reação leva à formação de metil-

citosina e utiliza S-adenosil-metionina (SAM) como dador de grupos metilo. Existem três ADN metiltransferases (DNMT) biologicamente ativas: a DNMT1, a DNMT3a e a DNMT3b. Nas células neoplásicas a DNMT1 parece ser responsável pela maior parte da metilação do ADN. Além disso, as DNMTs parecem também contribuir para a formação de cromatina inativa por diferentes mecanismos. Através da sua interação direta com as desacetilases das histonas (HDACs), podem recrutá-las para as regiões promotoras dos genes, impedindo a transcrição desses genes (Figura 3) (Herman & Baylin, 2003).

O genoma humano apresenta uma percentagem muito pequena de dinucleotídeos CpG dispersos ao longo do genoma, encontrando-se quase sempre metilados. No entanto, estes não se encontram distribuídos aleatoriamente, existindo regiões ricas em CpG, denominadas ilhas CpG, que ocupam a região reguladora dos genes (promotor) em cerca de 50% (Esteller, 2008), nomeadamente genes supressores tumorais, ou outras regiões intergénicas, estando quase sempre não metilados (Figura 4). Por outro lado, estes dinucleótidos estão pouco representados no genoma global devido à desaminação espontânea da 5-metilcitosina em timidina.

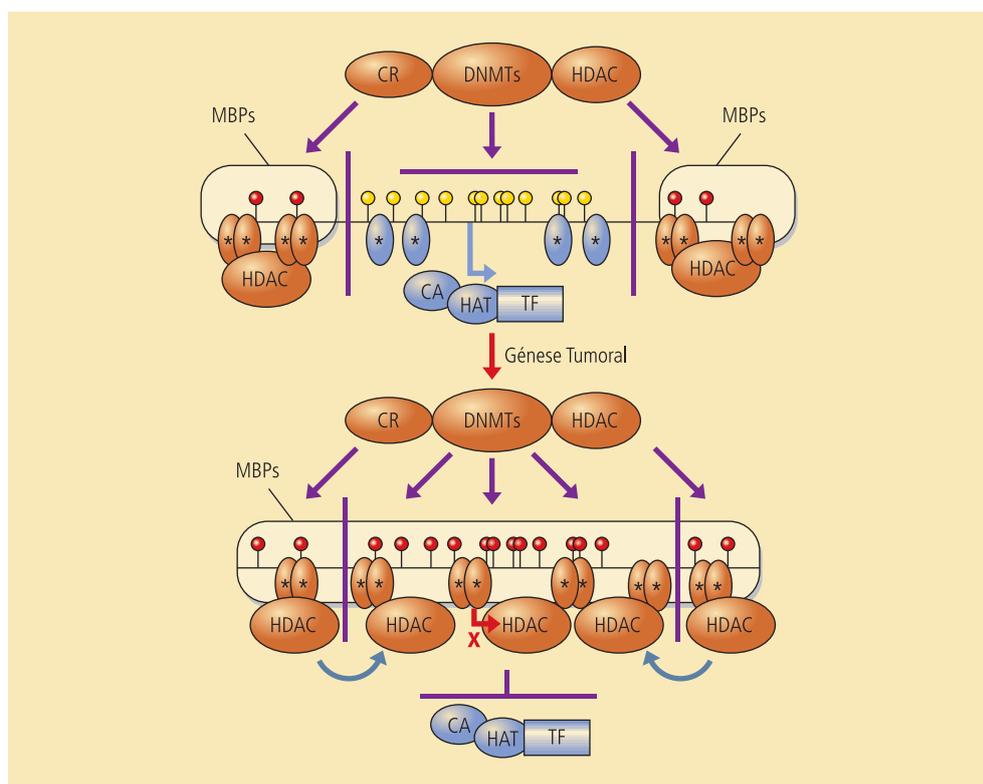


FIGURA 3

Aspectos da cromatina envolvendo as ilhas CpG no promotor de um gene numa célula normal e neoplásica.

Os locais desmetilados correspondem a genes ativamente transcritos numa célula normal (círculos a amarelo), enquanto que os locais hipermetilados na célula cancerígena estão representados por círculos a vermelho (silenciamento de genes). TF-transcription factors; HAT-histone acetyltransferase; CA-coactivators; CR-corepressors; MBPs-methylcytosine-binding proteins; HDAC-histone deacetylases; DNMTs-DNA methyltransferases.

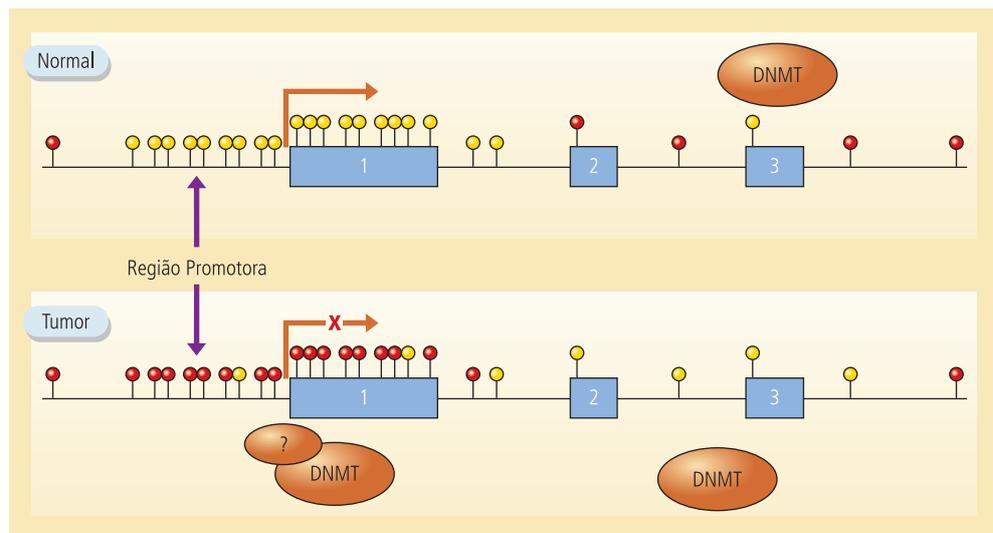
(Adaptado de Herman J. G., 2003).

FIGURA 4

Perfil de metilação dos dinucleótidos CpG no genoma humano.

A figura representa as diferenças entre o padrão de metilação de uma célula normal e cancerígena. Os círculos a amarelo representam as ilhas CpG não metiladas e os a vermelho representam as ilhas CpG metiladas.

(Adaptado de Herman J. G., 2003).



Assim, numa célula normal, ocorre normalmente hipermetilação global do genoma e hipometilação localizada, sendo que a metilação está associada à inativação da transcrição do gene correspondente (Figura 4). Este perfil de metilação altera-se em vários tipos de neoplasias, como representado na figura 4, levando ao silenciamento de genes supressores tumorais (Herman & Baylin, 2003).

Numa célula normal, a maioria dos elementos intergênicos repetitivos de ADN estão metilados, contrariamente à maioria das regiões promotoras, exceto raros genes localizados no cromossoma X nas mulheres. Deste modo, a metilação fisiológica das regiões intergênicas poderá constituir um processo importante para a estabilidade genómica. Como mencionado, a metilação das ilhas CpG das regiões promotoras está associada ao silenciamento dos genes. Deste modo, a aberrante metilação da região promotora dos genes é funcionalmente equivalente ao silenciamento de genes promovido por deleção ou mutação e, como tal, serve como mecanismo de inativação adicional dos genes supressores tumorais. Por outro lado, a ausência ou diminuição da metilação do ADN da região promotora está relacionada com ativação da expressão génica. Este processo é mediado pelo recrutamento de repressores da transcrição como proteínas que ligam grupos metilo, as *Methyl Binding Proteins* (MBPs), que fazem parte de um complexo proteico que inclui as HDACs (Figura 3). A metilação do ADN também pode inibir a transcrição bloqueando diretamente a ligação dos fatores de transcrição (Mulero-Navarro & Esteller, 2008).

Outro mecanismo de modulação epigenética envolve a modificação das histonas, o denominado “código das histonas”. Existe um grande e crescente número destas modificações (acetilação e desacetilação, metilação

e desmetilação, por exemplo), que podem atuar de uma maneira permissiva ou repressiva na transcrição gênica.

O ADN envolve um core de oito histonas formando os nucleossomas, a unidade estrutural mais pequena da cromatina. Os grupos amina das caudas terminais das histonas projetam-se para fora do nucleossoma estando sujeitos a modificações pós-transdução, incluindo a acetilação pelas histona acetiltransferases (HATs), a metilação da lisina pelas histona lisina metiltransferases (Figura 3) (Quina, Buschbeck, & Di Croce, 2006) (Santos-Rosa & Caldas, 2005), a ubiquitinação, a fosforilação e a sumoilação. Estas modificações são reconhecidas por proteínas específicas que recrutam ativadores da transcrição e correpressores, estabelecendo uma ordem mais elevada da estrutura cromosômica (Hake, Xiao, & Allis, 2004) (Fischle, Wang, & Allis, 2003). Além disso, influenciam o grau de compactação da cromatina e, conseqüentemente, a regulação da expressão gênica. Deste modo, a acetilação dos resíduos de lisina nas histonas H3 e H4 está correlacionada com a cromatina aberta ou ativa, o que permite o acesso de vários fatores de transcrição às regiões promotoras dos genes alvo (Quina *et al.*, 2006) (Santos-Rosa & Caldas, 2005). Pelo contrário, a desacetilação dos resíduos de lisina pelas HDACs resulta na compactação e inativação desses genes (Yoo & Jones, 2006) (Figura 5B).

Deste modo, as HATs e as HDACs estão envolvidas na modificação da cromatina, e, conseqüentemente, na regulação da transcrição gênica. As HDACs incluem um grande número de proteínas agrupadas em três classes diferentes I, II e III. A deacetilação das histonas restaura a carga positiva dos resíduos de lisina no core das histonas, resultando numa interação estreita entre o ADN e as histonas, o que mantém a cromatina num estado de silenciamento da transcrição. Contrariamente, a acetilação das histonas pode afetar as histonas H3 e H4 em resíduos específicos de lisina e neutraliza a carga positiva, quebrando o complexo ADN-histona, o que facilita o acesso aos fatores de transcrição. A quebra deste complexo é a base da utilização de inibidores da deacetilase da histona (HDACi) para a ativação de genes supressores tumorais silenciados (Mihara, Takihara, & Kimura, 2007).

Assim, a desregulação destes mecanismos, metilação do ADN e alteração da estrutura da cromatina, pode conduzir à expressão gênica inapropriada ou silenciamento de genes e, conseqüentemente, a 'doenças epigenéticas' incluindo alterações do desenvolvimento, doenças neurodegenerativas e cancro (Egger, Liang, Aparicio, & Jones, 2004) (Peter A Jones & Baylin, 2002).

Vários tipos de neoplasias apresentam um padrão aberrante de metilação, com hipometilação global do genoma e hipermetilação local gene-específica e modificações da cromatina (Feinberg, 2007) (Lund & van Lohuizen, 2004) (Herman & Baylin, 2003) (L. K. Jones & Saha, 2002) (Peter A Jones, 2002) (Peter A Jones & Baylin, 2002) (Figura 5).

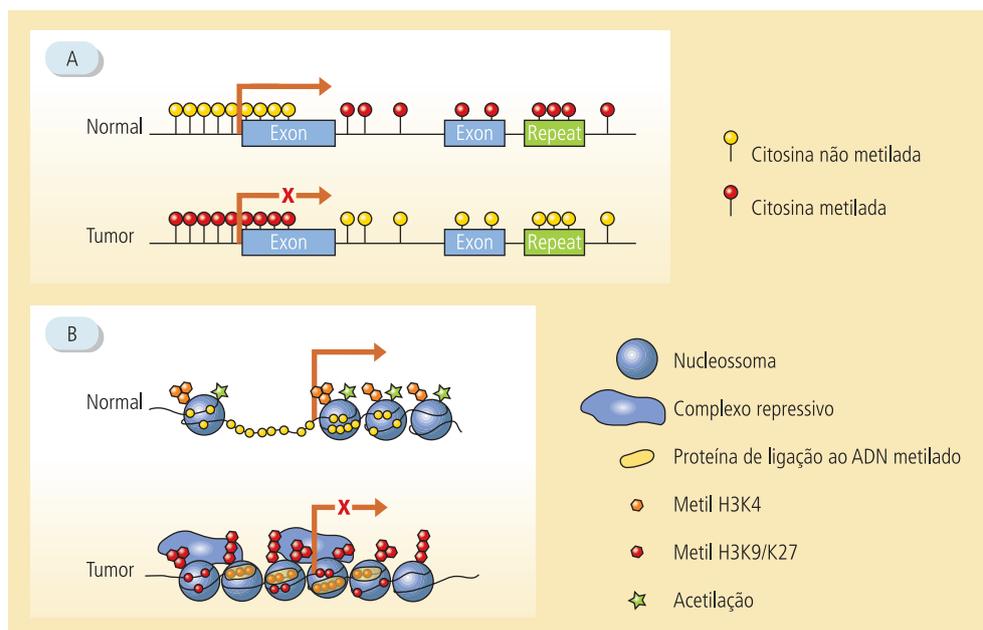
FIGURA 5

Modificações epigenéticas numa célula normal e cancerígena.

As modificações epigenéticas, metilação do ADN (A) e a acetilação das histonas (B), estão profundamente alteradas nas células neoplásicas. Nas células normais, as regiões promotoras dos genes estão desmetiladas (hipometilação localizada), existindo hipermetilação generalizada.

Nas células neoplásicas este perfil de metilação inverte-se. A hipermetilação das ilhas CpG localizadas nas regiões reguladoras de certos genes, como genes supressores tumorais, leva ao seu silenciamento. As modificações da cromatina e das histonas (desacetilação e metilação) também reprimem a expressão gênica através da associação de nucleosomas às regiões promotoras e do recrutamento de outras enzimas, formando um complexo repressivo.

(Adaptado de Gal-Yam E. N. *et al.*, 2008).



A alteração dos padrões de metilação está reconhecida há mais de 20 anos em vários tipos de cancro (Tabela 2). O gene da calcitonina *CALC1* foi um dos primeiros genes em que foi demonstrado estar hipermetilado no cancro. Apesar da aparente inexistência de relação causal com a carcinogénese, a hipermetilação do promotor deste gene é um importante indicador do estado epigenético dos potenciais genes supressores tumorais adjacentes, em neoplasias sólidas e hematológicas. Assim, a hipermetilação deste gene pode indicar transformação leucémica na SMD. Além disso, esta modificação parece ser um marcador clonal nas doenças hematológicas, pelo que os seus níveis elevados podem refletir aumento da massa tumoral, estando associados a um prognóstico desfavorável (Roman *et al.*, 2001).

De facto, a hipometilação global do genoma e a hipermetilação localizada têm sido descritas em neoplasias hematológicas (Attwood *et al.*, 2002) (Nakayama *et al.*, 1998) (Tsukamoto *et al.*, 1992), em particular do gene *p15* (*CDKN2B* ou *p15^{INK4B}*). Este gene codifica uma proteína inibidora da cinase dependente da ciclina CDK-4 e 6, a proteína supressora tumoral *p15^{INK4b}* (Tabela 2), que regula a transição da fase G1 para S do ciclo celular (Obaya & Sedivy, 2002). A hipermetilação deste gene tem sido associada à SMD (Hopfer *et al.*, 2009) (Aggerholm, Holm, Guldberg, Olesen, & Hokland, 2006) (Teofili *et al.*, 2001) (Preisler *et al.*, 2001) (Uchida *et al.*, 1997), estando presente em 30-50% destes doentes. Correlaciona-se com a percentagem de blastos medulares, sendo mais frequente em SMD de alto risco (Quesnel *et al.*, 1998) (Uchida *et al.*, 1997) e com maior tendência para evoluir para LMA (Tien *et al.*, 2001), conferindo mau prognóstico (Hirai, 2003). No entanto, alguns estudos têm

TABELA 2

Tipo de cancro	Alteração epigenética
Cólon	Hipermetilação dos ilhéus CpG (<i>hMLH1</i> , <i>p16^{INK4a}</i> , <i>p14^{ARF}</i> , <i>RARB2</i> , <i>SFRP1</i> e <i>WRN</i>), hipermetilação dos micro-ARNs (<i>miR-124a</i>), hipometilação genómica global, perda da transcrição do <i>IGF2</i> , mutações dos modificadores das histonas (<i>EP300</i> e <i>HDAC2</i>), diminuição das formas monoacetiladas e trimetiladas da histona H4
Mama	Hipermetilação dos ilhéus CpG (<i>BRCA-1</i> , E-caderina, <i>TMS1</i> e recetor do estrogénio), hipometilação genómica global
Pulmão	Hipermetilação dos ilhéus CpG (<i>p16^{INK4a}</i> , <i>DAPK</i> e <i>RASSF1A</i>), hipometilação genómica global, deleções genómicas do <i>CBP</i> e o fator remodelante da cromatina <i>BRG1</i>
Glioma	Hipermetilação dos ilhéus CpG (enzima de reparação do ADN <i>MGMT</i> , <i>EMP3</i> e <i>THBS1</i>)
Leucemia	Hipermetilação dos ilhéus CpG (<i>EXT1</i> , <i>ID4</i> e <i>p15^{INK4b}</i>), translocações dos modificadores das histonas (<i>CBP</i> , <i>MOZ</i> , <i>MORF</i> , <i>MLL1</i> , <i>MLL3</i> e <i>NSD1</i>)
Linfoma	Hipermetilação dos ilhéus CpG (<i>p16^{INK4a}</i> , <i>p73</i> , enzima de reparação do ADN <i>MGMT</i>), diminuição das formas monoacetiladas e trimetiladas da histona H4
Bexiga	Hipermetilação dos ilhéus CpG (<i>p16^{INK4a}</i> , <i>TPEF/HPP1</i>), hipermetilação dos micro-ARNs (<i>miR-127</i>), hipometilação genómica global
Rim	Hipermetilação dos ilhéus CpG (<i>VHL</i>), hipometilação genómica global, perda da transcrição do <i>IGF2</i>
Próstata	Hipermetilação dos ilhéus CpG (<i>GSTP1</i>), amplificação genética da HMT <i>EZH2</i> , modificação aberrante do padrão das histonas H3 e H4
Esófago	Hipermetilação dos ilhéus CpG (<i>p16^{INK4a}</i> , <i>p14^{ARF}</i>), amplificação genética da histona demetilase <i>JMJD2C/GASC1</i>
Estômago	Hipermetilação dos ilhéus CpG (<i>hMLH1</i> , <i>p14^{ARF}</i>)
Fígado	Hipermetilação dos ilhéus CpG (<i>SOCS1</i> e <i>GSTP1</i>), hipometilação genómica global
Ovário	Hipermetilação dos ilhéus CpG (<i>BRCA1</i>)

(Adaptado de Esteller M., 2008)

Alterações epigenéticas em vários tipos de neoplasias

mostrado que a metilação do ADN pode ocorrer em estádios iniciais, podendo constituir um mecanismo precoce na etiopatogenia da SMD (Au *et al.*, 2003) (Emília Cortesão, Tese 2011; Cortesão E, Atualizações em Oncologia 2012; Jorge J, 8th YES 2013). Assim, a hipermetilação de genes supressores tumorais pode contribuir tanto para a iniciação (Au *et al.*, 2003) como para a progressão da doença (Au *et al.*, 2003).

Além disso, a *p15* poderá atuar como um regulador da proliferação e diferenciação em linhagens mielomonocítica e megacariocítica, bloqueando o ciclo celular (Teofili *et al.*, 2001) (Sakashita *et al.*, 2001). Vários estudos sugerem a importância da hipermetilação de promotores de outros genes, como por exemplo do gene *p16* no desenvolvimento de neoplasias, tais como: neoplasia da mama esporádica (Vallian, Sedaghat, Nassiri, & Frazmand, 2009), carcinomas coloreticais em estádios avançados (Goto *et al.*, 2009) e na progressão de neoplasias hematológicas para leucemia aguda.

Como mencionado, a expressão de vários genes supressores tumorais pode ser regulada por modificações epigenéticas, como acontece com os genes *p15^{INK4B}* e *p16^{INK4A}*, entre outros, como referido na Tabela 3. Estes genes estão frequentemente inativados por hipermetilação em vários tipos de cancro (Esteller, 2002) (Peter A Jones & Baylin, 2002), nomeadamente em várias neoplasias hematológicas como a Leucemia Mielóide Crónica (LMC), a LMA e a Leucemia Linfoblástica Aguda (LLA) (Chim, Wong, Loong, Lam, & Srivastava, 2007) (Galm, Herman, & Baylin, 2006) (Esteller, Fraga, *et al.*, 2002) (Baylin,

TABELA 3

Vias alteradas pela hipermetilação de promotores de genes no cancro	Vias	Genes
	Alterações do controlo do ciclo celular	Rb, p16, p15, p14, p73
	Reparação da lesão de ADN	MLH1, O6-MGMT, GST-Pi, BRCA1
	Apoptose	DAP cinase, caspase 8, TMS-1
	Invasão da célula tumoral ou arquitetura tumoral	E-caderina, VHL, APC, LHB1, TIMP-3, THBS1
	Resposta ao fator de crescimento	ER, RAR-beta, SOCS-1

(Adaptado de Herman J. G., 2003)

Belinsky, & Herman, 2000). No entanto, a metilação do gene *p15* é referida como mais frequente em doenças hemato-oncológicas do que a metilação do gene *p16* (Guillermo Garcia-Manero *et al.*, 2002) (Garcia-Manero, 2003) (Guillermo Garcia-Manero, 2003). Contudo, numa população de 26 doentes com SMD verificámos a presença de metilação do *p15* e do *p16* em 38% e 35%, respetivamente, apresentando a maioria dos doentes (77%) um baixo risco segundo o IPSS (Emília Cortesão, 2010).

A metilação do *p15INK4b* também parece estar associada a alterações cromossómicas, incluindo a monossomia e deleção do 7q e à SMD secundária (Au *et al.*, 2003). Na LMMC, outra entidade pertencente ao espectro SMD/neoplasia mieloproliferativa crónica (SMD/NMP) (Harris *et al.*, 2000), a frequência de metilação do *p15* foi variável (Quesnel *et al.*, 1998) (Daskalakis *et al.*, 2002) (Tessem *et al.*, 2003). Além da metilação dos genes *p15* e *p16*, outros genes podem estar envolvidos.

A death-associated protein kinase (DAPK) é uma proteína cinase pró-apoptótica que está desregulada numa variedade de neoplasias. Além do seu papel na apoptose, apresenta um papel importante na autofagia e nas vias de transdução de sinal dos fatores de crescimento (Y. Lin, Hupp, & Stevens, 2010). As regiões promotoras do gene da DAPK estão hipermetiladas em células neoplásicas, em comparação com tecidos normais, incluindo neoplasias do pulmão, bexiga, cabeça e pescoço, rim, mama e em neoplasias de células B (Bialik & Kimchi, 2006) (Zöchbauer-Müller *et al.*, 2001) (Lehmann, Celikkaya, Hasemeier, Länger, & Kreipe, 2002) (Raval *et al.*, 2007). Contudo, a avaliação da hipermetilação em células neoplásicas e em linhas celulares revelou que o gene *DAPK* não está globalmente metilado em todos os tumores. Por exemplo, em neoplasias de células T, como a leucemia aguda linfoblástica T, o gene *DAPK* não está metilado relativamente ao observado em neoplasias de células B que apresentam níveis significativamente mais elevados de metilação (Raval *et al.*, 2007).

A frequente metilação de *DAPK* em tumores humanos, em relação à sua ausência no tecido normal correspondente, levou vários grupos a propor a sua utilização como marcador de diagnóstico e no *follow-up* de diversas neoplasias (Chan *et al.*, 2002) (Rosas *et al.*, 2001) (H. W. Chang *et al.*, 2003) (Wong

et al., 2004) (Yamaguchi, Asao, Nakamura, Ide, & Kuwano, 2003) (Dulaimi, Hillinck, Ibanez de Caceres, Al-Saleem, & Cairns, 2004) (Belinsky *et al.*, 2002) (Fujiwara *et al.*, 2005) (Reesink-Peters *et al.*, 2004) (Gustafson, Furth, Heitjan, Fansler, & Clark, 2004). Consequentemente, a diminuição da expressão de DAPK por metilação é um evento específico do cancro, podendo ser usado no diagnóstico e prognóstico (Yuregir *et al.*, 2010) (Krajnović, Radojković, Davidović, Dimitrijević, & Krtolica, 2013).

Uma proteína fundamental à manutenção da integridade do genoma é a proteína p53. Esta proteína supressora tumoral desempenha um papel crítico na resposta ao *stress* celular através da modulação da transformação, do crescimento celular, da síntese e reparação de ADN, da diferenciação e apoptose (Woods & Vousden, 2001) (Vogelstein, Lane, & Levine, 2000). Quando ocorre lesão do ADN a proteína p53 promove várias vias de resposta, determinando o destino da célula, isto é, a apoptose, o bloqueio do ciclo celular, a senescência ou a reparação do ADN (Vousden & Ryan, 2009). A via intrínseca da apoptose é ativada pela proteína p53 através da proteína BAX, mas também ativa a via extrínseca, através da indução da expressão da *apoptotic protease-activating factor-1* (APAF-1) (Robles, Bemmels, Foraker, & Harris, 2001), do FAS/APO1 (Owen-Schaub *et al.*, 1995), e dos recetores do TRAIL, DR4 e DR5 (Takimoto & El-Deiry, 2000).

Para além das atividades pró-apoptóticas da p53, estudos recentes revelaram o chamado "*dark side of p53*", em que esta atua como um mediador nas vias anti-apoptóticas. Uma variedade de alvos anti-apoptóticos, tais como os recetores do TRAIL, DcR1 e DcR2, o recetor do fator de crescimento epidérmico (EGFR) (Deb, Muñoz, Brown, Subler, & Deb, 1994), e o NF- κ B (Scholl, McLoughlin, Ehler, de Giovanni, & Schäfer, 2000) são direta ou indiretamente modulados pela p53. Por outro lado, a ativação da p53 também depende de outros fatores, tais como a disponibilidade de cofatores, diferenças nos promotores de genes pró- e anti-apoptóticos, e de modificações pós-tradução (Jänicke, Sohn, & Schulze-Osthoff, 2008).

Outro gene supressor tumoral com um papel na apoptose é o TRAIL, uma proteína transmembranar de tipo II, membro da família TNF, que pode induzir apoptose em várias linhas celulares de cancro humano (Wiley *et al.*, 1995), principalmente através da via extrínseca da apoptose (Scaffidi *et al.*, 1998). Estão descritos cinco recetores do TRAIL, incluindo os recetores de morte DR4 (TRAIL-R1) e DR5 (TRAIL-R2) (Chaudhary *et al.*, 1997) (Walczak *et al.*, 1997), os recetores anti-apoptóticos, decoy R1 (DcR1 ou TRAIL-R3) (Schneider *et al.*, 1997) (MacFarlane *et al.*, 1997) e DcR2 (TRAIL-R4) (Marsters *et al.*, 1997), Curr Biol 1997) e a osteoprotegerina (OPG) (Emery *et al.*, 1998). Os recetores transmembranares, DR4 e DR5, contêm um domínio citoplasmático de morte (DD) e atuam como recetores agonistas do TRAIL. No entanto, DcR1 e DcR2 são recetores transmembranares que não possuem caudas citoplasmáticas e atuam como recetores antagonistas. Os estudos têm sugerido um papel fisiológico

do TRAIL na eliminação das células infetadas com vírus e células neoplásicas (Mezosi *et al.*, 2004) (Nieda *et al.*, 2001) (Takeda *et al.*, 2001). A aberrante metilação do promotor e o conseqüente silenciamento dos recetores decoy do TRAIL estão descritos numa variedade de tumores (Venza *et al.*, 2013), mas pouco se sabe sobre a relevância dessa modificação epigenética em SMD.

A O⁶-metiltransferase-metilguanina-ADN (MGMT) é uma enzima de reparação do ADN única que remove os grupos alquil mutagénicos e citotóxicos da posição O⁶ da guanina (Gerson, 2002) (Margison, Povey, Kaina, & Santibáñez Koref, 2003). A deficiência da proteína MGMT induz a acumulação de lesões, predominantemente O⁶-metilguanina, o que conduz à transição de G→A, e à geração de um "fenótipo aberrante" (Esteller & Herman, 2004). A hipermetilação da região promotora do gene *MGMT*, localizado no cromossoma 10q26, foi identificada em algumas neoplasias, incluindo linfomas não-Hodgkin (LNH) e leucemias agudas (Esteller, 2003) (Esteller, Gaidano, *et al.*, 2002). No entanto, na SMD, a frequência da metilação do *MGMT* e o seu potencial valor prognóstico ainda não estão elucidados.

Os grupos metilo necessários para as reações de metilação podem derivar de produtos da dieta como o folato e a vitamina B12 (Ulrey *et al.*, 2005) (Figura 2). Permanece no entanto controversa a relação entre a ingestão/*status* do folato e a metilação do ADN.

Os polimorfismos funcionais em genes chave também podem influenciar a metilação do ADN, nomeadamente, os relacionados com a enzima MTHFR. São conhecidos dois polimorfismos no gene *MTHFR*, o C677T e o A1298C. Enquanto alguns estudos relacionam o polimorfismo C677T com a redução da metilação do ADN em linfócitos humanos, em condições de deficiência de folato; pouco se sabe sobre a influência do polimorfismo isolado A1298C e a alteração da metilação do ADN (McCabe & Caudill, 2005). Um estudo efetuado por E. Cortesão (2011) numa amostra de doentes com SMD evidenciou que a maioria dos doentes heterozigóticos CT para o polimorfismo C677T e AC para o A1298T apresentavam metilação do gene *p16* e/ou *p15*. Além disso, os resultados apontavam para o facto de, nessa população, o genótipo CT do polimorfismo C677T da MTHFR poder ser fator de risco para SMD (OR 3,982) (Emília Cortesão, Tese 2011).

Além do mencionado, as neoplasias hematológicas resultam, frequentemente de modificações de fatores que controlam a transcrição e que envolvem a acetilação de histonas e a estrutura da cromatina, tendo sido demonstrada atividade anómala das HAT e HDAC em leucemias mielóides (Mihara *et al.*, 2007).

Por outro lado, as alterações cromossómicas, estruturais e numéricas, detetadas nas leucemias, podem indicar defeitos na estrutura da cromatina, provavelmente associados a padrões anómalos de metilação regional. Este conceito conduziu as neoplasias hematológicas para o centro da investigação

epigenética. De facto, o papel das modificações epigenéticas é atualmente um dos campos mais estimulantes na investigação clínica e pré-clínica, em particular nas neoplasias mielóides. A presença de mutações em genes reguladores do ciclo celular, como o *p15*, *p16* e *p19*, têm sido raramente descritas na SMD, ao contrário da hipermetilação.

O interesse clínico nestas alterações epigenéticas deve-se a dois factos: por um lado, a deteção de alterações epigenéticas específicas pode ser utilizada como marcador tumoral, no diagnóstico e prognóstico do cancro (Figura 6); por outro lado, como a maioria das alterações epigenéticas são reversíveis *in vivo* e *in vitro*, abrem caminho para o desenvolvimento dos novos agentes terapêuticos no cancro (Figuras 7 e 8), restaurando a função dos genes silenciados (Figura 9).

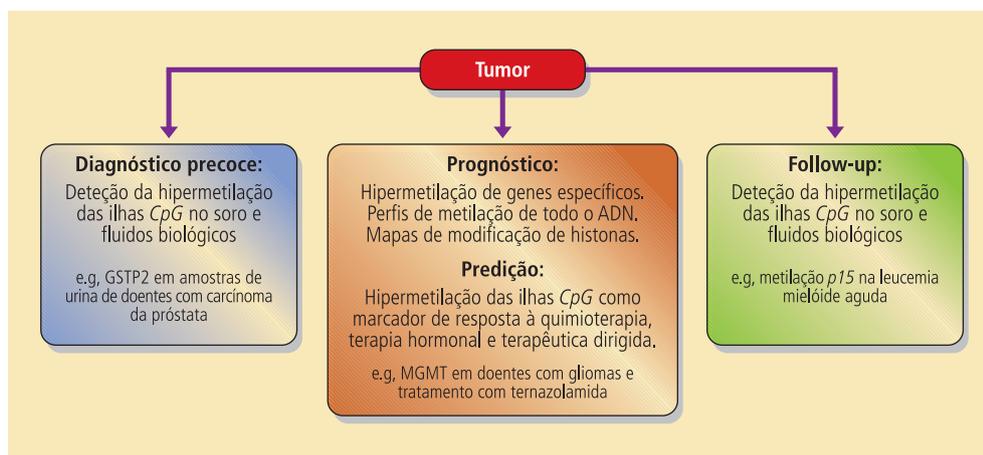


FIGURA 6

Importância da avaliação epigenética no cancro.

(Adaptado de Esteller M., 2008).

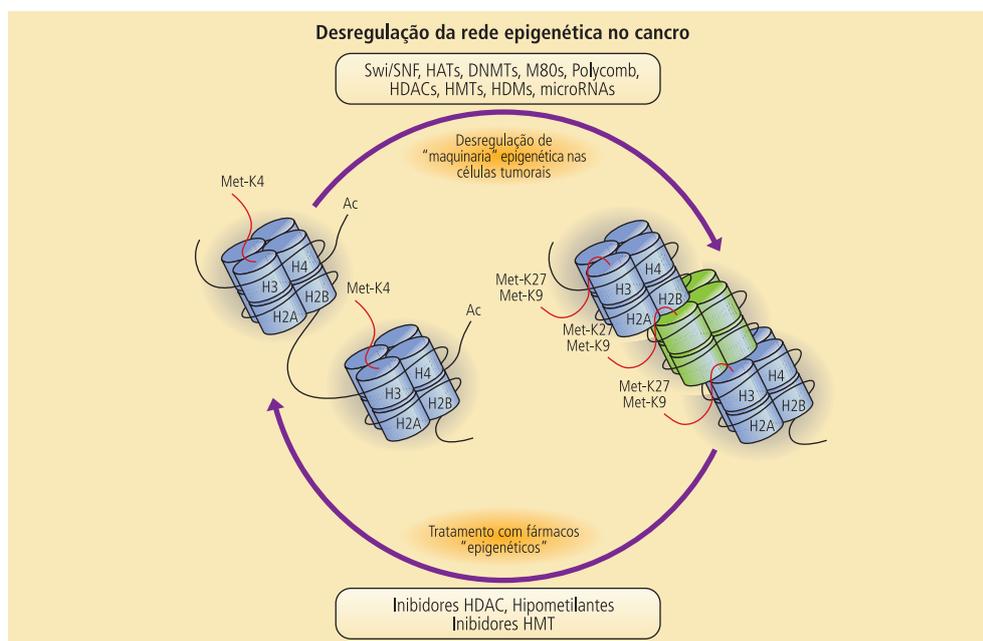


FIGURA 7

Inativação epigenética de genes supressores tumorais como alvo terapêutico no cancro.

(Adaptado de Esteller M., 2008).

FIGURA 8

Mecanismo de ação da azacitidina.

A figura mostra a inibição da DNMT pela azacitidina, e, por conseguinte, da metilação da citosina.

(Adaptado de Herman J. G., 2003).

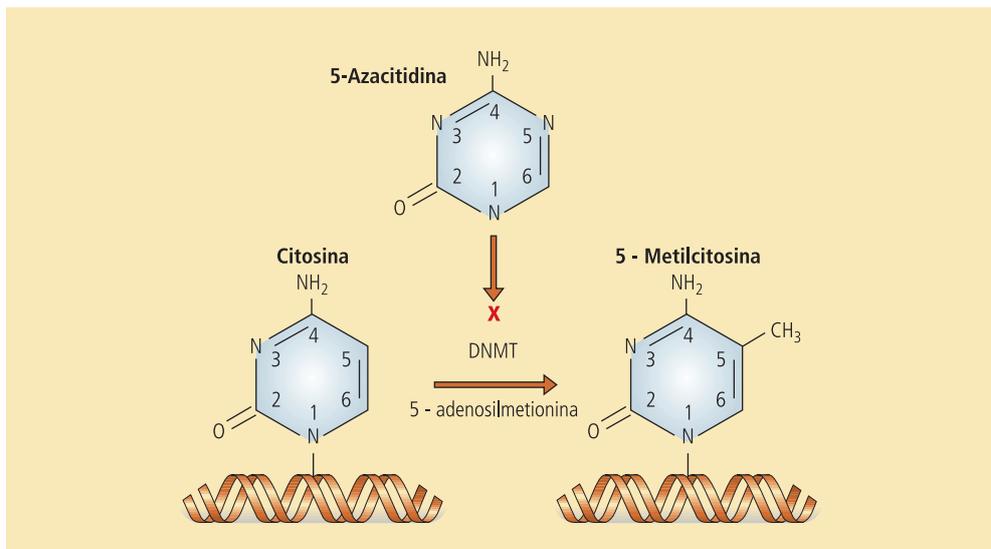
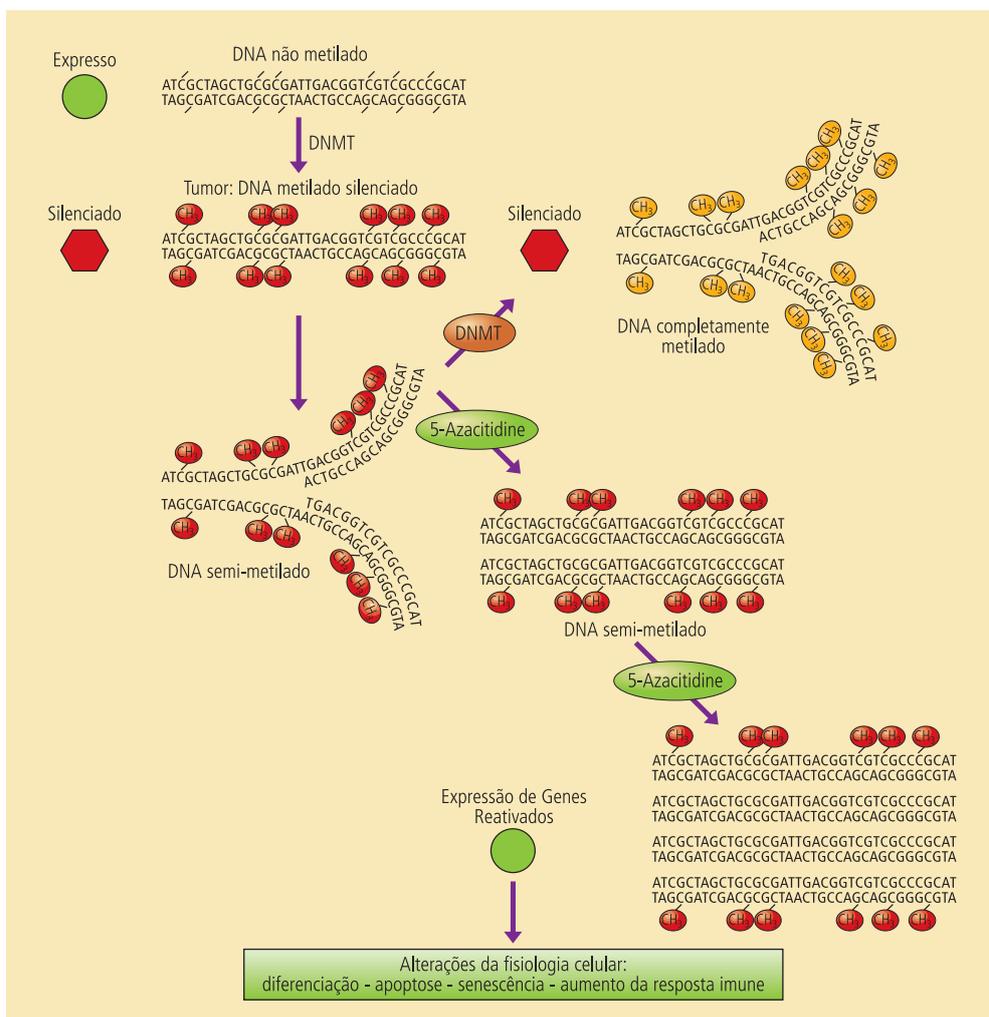


FIGURA 9

Mecanismos prováveis de ação dos inibidores da metilação do ADN.

(Adaptado de Issa J., 2007).



Atualmente, sabemos que a terapêutica epigenética funciona em algumas neoplasias hematológicas devido ao sucesso dos hipometilantes observado primeiramente em SMD e LMA (Figura 10) e dos HDACi nos linfomas cutâneos, os quais apresentam pouco sucesso como agentes isolados nas leucemias. Presentemente, não existe explicação para este facto e pode não depender de alterações moleculares epigenéticas intrínsecas, mas da otimização dose/esquema dos fármacos. A maioria dos estudos não demonstrou uma relação entre a indução da hipometilação do ADN ou a acetilação/desacetilação das histonas e a resposta clínica. No entanto, sendo um dos mecanismos de silenciamento de genes mediado por metilação e pela alteração da conformação da cromatina, através do recrutamento das desacetilases das histonas (Cameron, Bachman, Myöhänen, Herman, & Baylin, 1999), a terapêutica combinada de inibidores da metiltransferase e das desacetilases das histonas poderá constituir uma estratégia terapêutica na SMD (Figura 11).

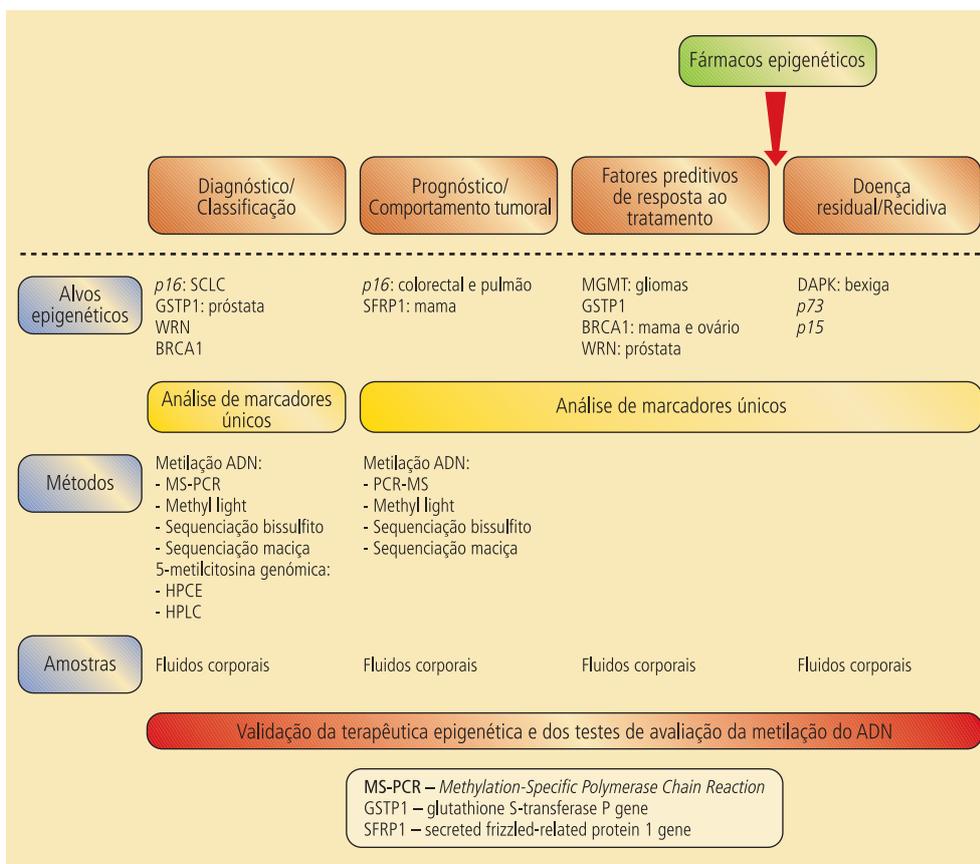


FIGURA 10

Validação da terapêutica epigenética e dos testes de avaliação da metilação do ADN.

WRN-Werner syndrome gene; BRCA1-1-breast cancer 1 gene; MGMT-O-6-methylguanine-DNA-methyltransferase gene; DAPK-death-associated protein kinase gene; HPCE-high performance capillary electrophoresis; HPLC-high performance liquid chromatography.

(Adaptado de Mulero-Navarro S., 2008).

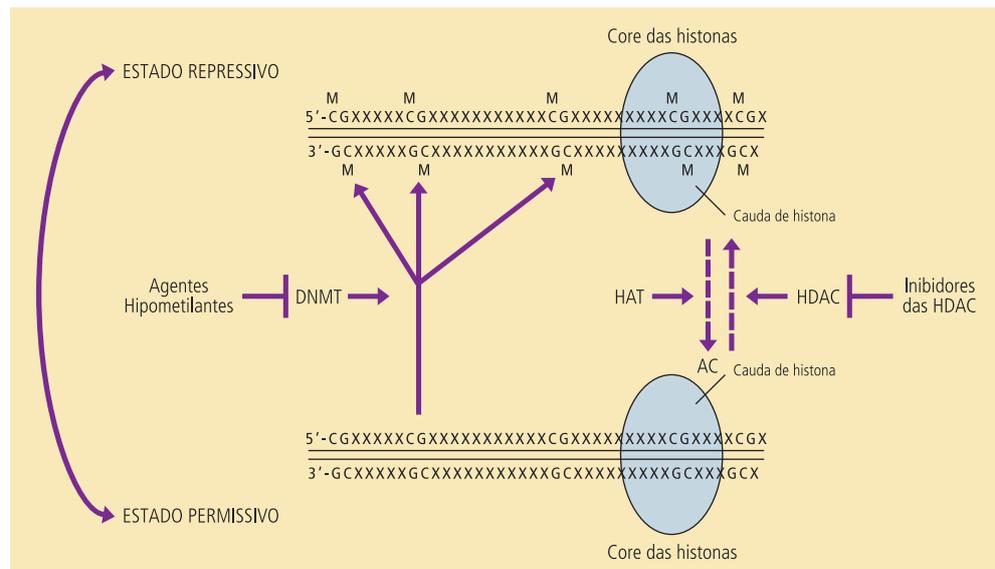


FIGURA 11
Alvos da terapêutica epigenética.

1.4.3. Alterações citogenéticas e genéticas

Como mencionado, o clone SMD deriva da célula pluripotencial. A evidência de clonalidade foi originalmente demonstrada através do mosaicismo da glicose-6-fosfato desidrogenase, mas também é suportada pela análise por *restriction fragment length polymorphisms* (RFLPs), dos genes do cromossoma X, e por FISH. Vários estudos também mostraram evidência de clonalidade na linhagem linfóide, sugerindo que o clone SMD tem origem nas células pluripotenciais mais imaturas com capacidade de diferenciação mielóide e linfóide (Tefferi & Vardiman, 2009).

A perda ou o ganho de função de um gene pode resultar de mutações genéticas pontuais, translocações cromossómicas, e alterações epigenéticas, como o silenciamento da expressão génica por hipermetilação. O resultado é o ganho de função de um oncogene/proto-oncogene ou perda de função de um gene supressor tumoral.

1.4.3.1. Alterações citogenéticas

Além do mencionado, é de salientar que as alterações cromossómicas estão descritas em 40-70% das SMD primárias e em mais de 90% das SMD relacionadas com terapêutica prévia (Delforge, 2003), consistindo normalmente numa perda, delecção ou translocação. Contudo, é surpreendente verificar

em cerca de 30 a 60% dos casos a presença de um cariótipo normal numa doença clonal. A existência de um cariótipo normal traduz bom prognóstico, semelhante ao observado na Síndrome 5q-, 20q-, ou na perda do cromossoma Y. Um cariótipo complexo define-se pela presença de 3 ou mais anomalias citogenéticas diferentes e ocorre em 10 a 20% das SMD primárias e em cerca de 90% das SMD secundárias a tratamento.

A complexidade do cariótipo constitui uma diferença bem documentada entre SMD primária e secundária. As deleções cromossómicas são comuns em SMD, em oposição às translocações equilibradas observadas na LMA. Na última década, a investigação tem-se centrado na identificação de potenciais genes supressores tumorais nas regiões em que ocorre deleção. De seguida, apresentamos as principais alterações cromossómicas na SMD envolvendo os cromossomas 5, 7, 8 e 20, nomeadamente a del5q, del7q, t8 e del20q.

- Cromossoma 5

A perda do cromossoma 5 ou a deleção intersticial do seu braço longo (5q-) é uma das alterações cromossómicas mais comuns na SMD (cerca de 20%) ("Recommendations for a morphologic, immunologic, and cytogenetic (MIC) working classification of the primary and therapy-related myelodysplastic disorders. Report of the workshop held in Scottsdale, Arizona, USA, on February 23-25, 1987. Third MIC Cooperat," 1988), de novo ou secundária, independentemente da existência de outras alterações cromossómicas adicionais (Bernasconi *et al.*, 2005) (Haase *et al.*, 2007) (S. M. Smith *et al.*, 2003). Está associada a exposição prévia a carcinogénios, incluindo benzeno, agentes alquilantes e radiação. Esta anomalia é distinta da Síndrome 5q- que é uma entidade clínica bem caracterizada por anemia macrocítica refractária com desritropoiese, megacariócitos com núcleos mono ou hipolobulados, contagens plaquetares normais ou em número elevado e deleção do 5q como única alteração citogenética. Predomina em mulheres acima dos 50 anos (razão F/M=3/1) e tem o melhor prognóstico dos subtipos de SMD com baixa incidência de transformação leucémica. A deleção presente na Síndrome 5q- é uma deleção intersticial e a heterogeneidade dos pontos de rutura engloba o 5q12 ao 5q35. No entanto, a deleção invariavelmente contém a região 5q31-33. Embora não tenha sido identificado um gene supressor tumoral associado a esta síndrome, a região deletada foi recentemente identificada no intervalo com aproximadamente 1.5-megabase na região 5q31-q32, entre D5S413 e o gene *GLRA1*. Esta região contém 44 genes, 33 dos quais estão expressos nas células hematopoiéticas precursoras CD34+, e são provavelmente responsáveis pela patogénese desta entidade (Boulwood *et al.*, 2002). Um dos genes mais relevantes da região deletada comum em 5q32 é a proteína da subunidade ribossómica RPS14, dado que a perda parcial da sua função devido à interfe-

rência do ARN, causa um fenótipo semelhante ao observado na Síndrome 5q (Ebert *et al.*, 2008). Pellagatti *et al.* (2007) mostraram uma associação entre o gene *SPARC* (*secreted protein acidic and rich in cysteine*) e a Síndrome 5q.

De salientar que, no braço longo do cromossoma 5 existem genes envolvidos na regulação da hematopoiese, incluindo citocinas e seus recetores, reguladores do ciclo celular, fatores de transcrição e mediadores de sinalização celular (Kawankar & Vundinti, 2011). A interleucina 3 (IL-3), a IL-4, a IL-5, o fator regulador do interferão 1 (IRF-1), o fator estimulador das colónias de monócitos (M-CSF) e seu recetor, e o GM-CSF são alguns exemplos. Assim, a perda destes genes pode desempenhar um papel na patogênese da SMD.

Os doentes que apresentam um aumento de blastos medulares e alterações cromossómicas adicionais têm uma sobrevivência global inferior aos doentes com a Síndrome 5q (24 e 25 meses respetivamente, vs. 146 meses) (Giagounidis *et al.*, 2004). Os cariótipos complexos incluem normalmente alterações dos cromossomas 5 e 7 (-5/5q-, -7/7q-) e estão associados a uma evolução clínica desfavorável (Pisani & Rainaldi, 2001). Nestas situações de mau prognóstico, assim como na LMA, as regiões deletadas localizam-se num locus do 5q mais centromérico, nomeadamente 5q31, tendo sido implicados dois genes no desenvolvimento da doença: *EGR1* (*early growth response gene-1*) e *alphaE-catenin gene* (CTNNA1) (Horrigan *et al.*, 2000) (Joslin *et al.*, 2007) (T. X. Liu *et al.*, 2007).

Também podem ocorrer translocações que envolvem o cromossoma 5, por exemplo: a t(3;5)(q25.1;q34), que resulta na proteína quimérica *nucleophosmin/myeloid leukemia fator 1* (NPM-MLF1) associada a SMD em transformação leucémica (Yoneda-Kato *et al.*, 1996); e a t(5;11)(q31;q23), que resulta na fusão dos genes *myeloid/lymphoid* ou *mixed lineage leukemia* (MLL) e *GTPase regulator associated with the focal adhesion kinase pp125FAK* (GRAF) descrita numa criança com leucemia mielomonocítica juvenil (LMMJ) (Borkhardt *et al.*, 2000). As t(5;12)(q33;p13), t(5;17)(q33;p13) e t(5;10)(q33;q21) ocorrem em 20-30% dos casos de LMMC.

- Cromossoma 7

A monossomia do cromossoma 7 e a deleção do seu braço longo estão relacionadas com as SMD *de novo* e secundárias à terapêutica e com a LMA, conferindo mau prognóstico. De facto, cerca de 10% das deleções 7q- são observadas em SMD *de novo* e as restantes após exposição a quimioterapia ou agentes do meio ambiente ou, ainda, em casos relacionados com alterações genéticas familiares (Anemia de Fanconi, Neurofibromatose 1, Neutropenia Congénita) (Mhaweck & Saleem, 2001). A monossomia 7 está associada a citopenias graves refractárias e suscetibilidade a infeções.

Os estudos de tipagem alélica permitiram a identificação de três loci distintos que sofrem frequentemente deleção, 7q22, 7q31.1 e 7q31.3. A região entre 7q22 e 7q36 inclui mais do que um gene supressor tumoral, que podem estar inativados na LMA e SMD (Chen *et al.*, 2005) (Liang *et al.*, 1998). A região 7q22.1 foi sugerida como ponto de quebra típico das neoplasias mielóides (Johnson *et al.*, 1996). Alguns dos genes localizados no braço longo do cromossoma 7 são a eritropoietina, o inibidor do ativador da plasmina, o recetor β da célula T, o gene da asparagina sintetase e da *phosphoinositide-3-kinase, catalytic, gamma polypeptide* (PIK3CG).

A análise de doentes com LMMJ, que frequentemente apresentam monossomia 7, demonstrou que aproximadamente 30% cursam com mutações do gene da *neurofibromatose 1 (NF1)* (Shannon *et al.*, 1994). Este gene supressor tumoral codifica uma proteína com atividade de GTPase, atuando como um regulador negativo da atividade da proteína RAS (Martin *et al.*, 1990). Como referido, a ativação da proteína RAS ocorre numa proporção significativa de adultos com SMD. As mutações do gene *RAS* e a inativação do gene *NF1* parecem desempenhar um papel importante na progressão da SMD com monossomia do 7 (Stephenson, Lizhen, & Mufti, 1995). Além do mencionado, a deleção 7q- está também associada a mutações do gene *AML1* e à hipermetilação do gene *p15* (D H Christiansen, Andersen, & Pedersen-Bjergaard, 2003) (Debes H Christiansen, Andersen, & Pedersen-Bjergaard, 2004).

Não existe uma terapêutica dirigida a este subgrupo de doentes com monossomia 7. O transplante alogénico de células pluripotenciais pode ser realizado se a idade e a performance status o permitir, embora esteja descrito neste grupo o elevado risco de recidivas precoces (Haase, 2008). As alterações do cromossoma 7 estão associadas à exposição a produtos orgânicos, lixos e gases (R. R. West, Stafford, White, Bowen, & Padua, 2000). Segundo Raj *et al.*, os doentes com SMD ou LMA com monossomia do cromossoma 7, tratados com azacitidina demonstram uma boa resposta, com remissões completas mantidas num follow-up de 10 meses.

- Cromossoma 8

A trissomia 8, a mais comum das trissomias, está descrita em diversas neoplasias hematológicas, incluindo a SMD, leucemias agudas e crónicas. Na SMD pode ocorrer isoladamente ou associada a outras alterações citogenéticas. A sua incidência como alteração citogenética única é variável e depende do género, idade, exposição prévia a genotóxicos e morfologia celular. Por exemplo, verificou-se uma maior incidência em mulheres, na SMD de novo e em idosos (Paulsson, Säll, Fioretos, Mitelman, & Johansson, 2001). Curiosamente, observou-se que o clone com trissomia 8 desaparecia no decurso da doença, fenómeno este independente do número de blastos ou

do estágio clínico (Matsuda *et al.*, 1998). Por isso, o seu significado não está ainda totalmente esclarecido. O papel funcional da trissomia 8 na SMD e LMA permanece desconhecido, mas o aumento de genes do cromossoma 8 (por exemplo, *ETO* ou *FGFR1*) e a presença de mutações específicas ou genes de fusão no cromossoma duplicado podem justificar o fenótipo da neoplasia.

- Cromossoma 17

A deleção do 17p é observada primariamente em doentes com SMD relacionada com terapêutica e caracteriza-se morfológicamente por desgranulopoiese e hipobulção pseudo-Pelger-Huet (Lai *et al.*, 1995). O gene *p53* está localizado na banda 17p13.1 e encontra-se frequentemente afetado quando ocorre esta deleção. O gene *p53* é um gene supressor tumoral crítico com funções no controlo do ciclo celular, na reparação do ADN e na apoptose, bloqueando a passagem da fase G1 para o início da fase S do ciclo celular ou ativando a apoptose em resposta a lesão do ADN. Na ausência da proteína p53 funcional as células continuam a proliferar, mesmo com alterações do ADN, levando à acumulação de anomalias cromossómicas adicionais.

A perda do gene *p53* está descrita em várias neoplasias e em 5 a 10% dos casos de SMD estão presentes alterações da p53. Os doentes com monossomia 17 ou deleção do 17p apresentam, por vezes, uma mutação que inativa o restante gene *p53*, não existindo portanto p53 funcional.

- Cromossoma 20

A deleção do braço longo do cromossoma 20 traduz um prognóstico favorável, quando isolada, e ocorre mais frequentemente na fase inicial da SMD, em aproximadamente 5% das SMD primárias. Morfológicamente existe displasia marcada da série eritroide e megacariocítica, que não se verifica nos granulócitos maduros, sugerindo aumento da apoptose no clone anómalo. Clinicamente os doentes apresentam menor incidência de anemia, e um prognóstico relativamente favorável.

A região crucial delectada está situada entre D20S174 e D20S17 (Asimakopoulos, White, Nacheva, & Green, 1994) que inclui genes como o gene que codifica a fosfolipase C, a adenosina desaminase, a topoisomerase 1, o fator libertador da hormona do crescimento, o gene da leucemia mielóide e o gene *SRC* (o homólogo humano do vírus do sarcoma de Rous).

Outra alteração descrita recentemente em doentes com SMD, sobretudo idosos, é o isocromossoma 20q, i(20q-), com perda do material intersticial. Estes casos apresentam comportamento clínico diferente da Síndrome 20q-, caracterizado por progressão rápida e sobrevivência curta. O i(20q-) pode representar uma evolução do cariótipo 20q, predizendo uma evolução da doença.

Gelsi-Boyer e seus colaboradores identificaram mutações do gene *ASXL1*, em neoplasias mielodisplásicas e mieloproliferativas (Gelsi-Boyer *et al.*, 2009).

- *Outras alterações cromossômicas menos frequentes*

Estão descritas perdas de partes dos cromossomas 3, 11, 12, 13 e Y, assim como, trissomias envolvendo os cromossomas 6, 13 e 21 (Catenacci & Schiller, 2005). As alterações que envolvem as regiões 3q26, 11q23 e 17p ocorrem frequentemente nas SMD relacionadas com a terapêutica, e afetam normalmente os genes *EVI1* localizados na região 3q26, *MLL* na 11q23, *KIP1* e *ETV6* na 12p13, e *TP53* na 17p13.1.

A perda do cromossoma Y pode ocorrer em doenças hematológicas e não hematológicas, e por si só não representa evidência diagnóstica de patologia hematológica. No entanto, quando presente na SMD (ocorre em cerca de 10%), acarreta um prognóstico favorável, à semelhança da *del(20q)*. A classificação da OMS refere que estas alterações cromossômicas quando isoladas, sem displasia celular, não são critérios diagnósticos para SMD (Swerdlow SH, WHO Classification 2008).

1.4.3.2. Alterações genéticas – mutações e translocações

As alterações cromossômicas estruturais recorrentes estão relacionadas com diferentes prognósticos e continuam a representar um dos mais importantes fatores de risco, quando os doentes são estratificados ao diagnóstico. No entanto, aproximadamente 50% dos doentes com SMD apresentam uma citogenética normal, sem alterações estruturais recorrentes, o que sugere a presença de outros eventos moleculares na patogénese da doença. Com a utilização da sequenciação global do ADN, verificou-se que as mutações somáticas são mais frequentes do que se esperava inicialmente e, que existem algumas mutações idênticas em doentes com SMD e LMA sem alterações citogenéticas.

Estudos recentes demonstraram a presença de mutações em genes que codificam os componentes da maquinaria de *splicing* em doentes com SMD (Tabela 4), e o seu valor prognóstico (Tabela 5).

TABELA 4

Frequência das mutações de genes em doentes com SMD

Gene	Função do gene	Descrição da mutação	Frequência da mutação na SMD (%)
<i>DNMT3A</i>	Metilação de ADN <i>de novo</i>	Mutação missense recorrente heterozigota no R882	8
<i>IDH1/2</i>	Cataliza a interconversão de isocitrato e α -KG	Mutação missense <i>IDH1</i> -heterozigota no R132 e <i>IDH2</i> -heterozigota no R172 ou R140	4-11
<i>TET2</i>	Oxida a 5-mC em 5-hmC	Mutações primárias bifalicas, resultando em perda de função	19-26
<i>EZH2</i>	Trimetilação progressiva da H3K27	Mutações de inativação e sobreexpressão observada em neoplasias mielóides	6,4
<i>ASXL1</i>	Fator de transcrição que mantém a expressão do gene <i>HOX</i>	Mutações truncadas primárias heterozigotas, que eliminam o domínio PHD	14
<i>MLL</i>	Metiltransferase H3K4	Translocações envolvendo o <i>MLL</i> que resultam em proteína de fusão ou mutações parciais em tandem do <i>MLL</i>	rara
<i>SF3B1</i>	Gene do spliceosoma importante para a repressão do gene <i>HOX</i>	Mutação missense predominantemente heterozigota em R625, H662 e K700	80% na ARSA e 6% na SMD sem sideroblastos em anel
<i>SRSF2</i>	Gene do spliceosoma implicado na estabilidade genómica	Mutação missense heterozigota em P95	2% na ARSA e 12% na SMD sem sideroblastos em anel
<i>U2AF35</i>	Gene do spliceosoma implicado no <i>splicing</i> dos genes	Mutação missense heterozigota em S34 e Q157	12% na SMD sem sideroblastos em anel

PHD - plant homeodomain

(Adaptada de Larsson C.A., 2013)

TABELA 5

Implicações prognósticas das mutações de genes em doentes com SMD

Gene	Doentes (n.º)	% com mutação	Prognóstico dos doentes com mutação vs. <i>wild type</i>
<i>DNMT3A</i>	150	8	Pior prognóstico (<i>log-rank</i> $P=0.005$), pior SLE ($P=0.009$), elevada taxa de evolução em LMA ($P=0.007$) ¹
<i>TET2</i>	439	20	Sem impacto na sobrevivência ²
	96	23	Fator de prognóstico independente para SG [HR, 5.2 (95% IC, 1.6-16.3); $P=0.005$] ³
<i>ASXL1</i>	439	14	Pior SG [HR, 1.38 (95% IC, 1.00-1.89); $P=0.006$] ²
<i>EZH2</i>	439	6	Pior SG [HR, 2.13 (95% IC, 1.36-3.33); $P=0.001$] ²
<i>SF3B1</i>	354	20	Prognóstico favorável, maior SLE [HR, 0.1 (95% IC, 0.0-0.7); $P=0.02$] ⁴
<i>U2AF1</i>	193	7	Rápida evolução para LMA [HR, 2.53 (95% IC, 0.9-7.13); $P=0.079$]; sem impacto na SG [HR, 1.49 (95% IC, 0.54-4.1); $P=0.44$] ⁵

IC - intervalo de confiança; SLE - sobrevivência livre de eventos; SG - sobrevivência global

(Adaptada de Larsson C.A., 2013)

1 - Walter M.J. *et al.*, 2011.

2 - Bejar R. *et al.*, 2011.

3 - Kosmider O. *et al.*, 2009.

4 - Papaemmanuil E. *et al.*, 2011.

5 - Thol F. *et al.*, 2012.

1.4.3.2.1. Mutações em genes envolvidos na metilação do ADN

A regulação da expressão génica através da reprogramação epigenética é fundamental para o desenvolvimento e diferenciação celular dos eucariotas, como referido. Como vimos, a principal modificação epigenética no Homem é a metilação do ADN e o status de metilação é regulado pelas ADN metiltransferases (DNMT) e pelas desmetilases, influenciando a expressão de genes (Figura 12).

O processo denominado de desmetilação ativa parece ser necessário para ativar genes específicos ou apagar a marca epigenética durante o desenvolvi-

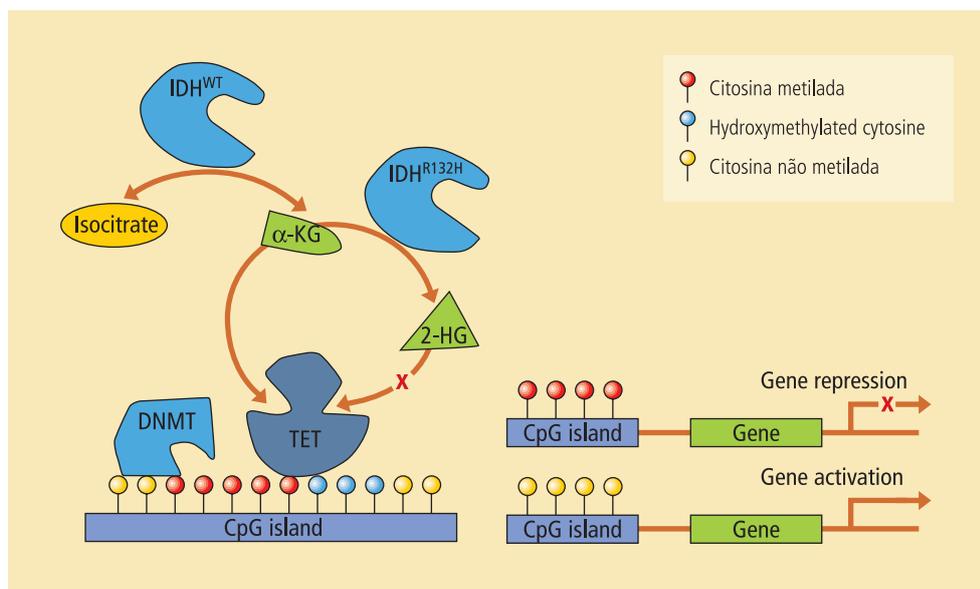


FIGURA 12

Papel das proteínas, codificadas por genes mutados na SMD, na metilação do ADN.

As DNMTs catalizam a adição de um grupo metil à citosina. As enzimas IDH são responsáveis pela conversão do isocitrato em α -KG e CO₂. O α -KG é necessário às proteínas TET para a oxidação de 5-mC em 5-hmC, um intermediário na desmetilação do ADN. As proteínas IDH mutadas metabolizam o α -KG em 2-HG, um oncometabolito que inibe competitivamente a atividade enzimática das proteínas TET.

(Adaptada de Larsson C.A., 2013).

mento ou em respostas a perturbações ambientais. A desmetilação ainda pode ser passiva quando não há envolvimento de desmetilases e ocorre quando a manutenção pelas metiltransferases é inativa durante o ciclo celular. Assim, o nível e o padrão de 5-mC são determinados por ambos os processos de metilação e desmetilação, e as enzimas envolvidas nesses processos devem estar altamente reguladas (Morgan, Dean, Coker, Reik, & Petersen-Mahrt, 2004).

A 5-metilCitosina, um marcador de metilação do ADN, pode também ser modificado pelas oxigenases dependentes de α -cetoglutarato (α -KG) TET1, TET2 e TET3, que catalizam a conversão de 5-mC em 5'-hidroximetilcitosina (5-hmC) (Figuroa *et al.*, 2010). O α -KG obtém-se do isocitrato num processo catalizado pela desidrogenase do isocitrato 1 (IDH1) no citoplasma e pela IDH2 na mitocôndria. A sequenciação de amostras de doentes de SMD e LMA revelou a presença de mutações em genes importantes na metilação do ADN como o TET2, IDH1/2 e DNMT3A. Estas mutações estão associadas a um padrão de metilação aberrante, o que é uma característica comum de SMD e LMA (Ley *et al.*, 2010) (Delhommeau *et al.*, 2009).

i. DNMT3A

O gene DNMT3, que codifica a DNMT3, está relacionado com os genes DNMT1 e DNMT3b, e encontra-se mutado em aproximadamente 8% dos doentes com SMD. A mutação mais comum é uma mutação missense que resulta na substituição da arginina (R882) por histidina, cisteína, prolina ou serina (Ley *et al.*, 2010) (Yan *et al.*, 2011). Esta alteração genética conduz à redução da metilação do ADN, sugerindo que a mutação R882 reduz a

atividade da metiltransferase (Ley *et al.*, 2010). No entanto, as diferenças na expressão gênica, nos padrões de metilação ou na quantidade de 5-mC não foram robustamente relacionadas com o status mutacional do gene DNMT3A (Ley *et al.*, 2010) (Challen *et al.*, 2012). A perda da metilação de novo impede a potencial diferenciação das HSCs, o que poderá explicar o papel destas mutações na patogênese da SMD.

As mutações DNMT3A, tipicamente a R882, ocorrem em todos os subtipos de SMD e correlacionam-se com uma sobrevivência global curta e aumento de risco de evolução para LMA (Walter *et al.*, 2011).

ii. TET2

A dissomia uniparental e as deleções que abrangem o cromossoma 4q24 foram inicialmente descritas em doentes com neoplasias mielóides (Delhommeau *et al.*, 2009). A sequenciação da região mais frequentemente deletada revelou a presença de mutações somáticas adquiridas no gene TET2 (the ten-eleven-translocation gene 2) em 19 a 26% de doentes com SMD (Delhommeau *et al.*, 2009) (Langemeijer *et al.*, 2009). Estas mutações estão presentes na maioria das células precursoras hematopoiéticas (incluindo progenitores CD34+) (Langemeijer *et al.*, 2009), e podem ocorrer simultaneamente com as mutações NPM1, FLT3, JAK2, RUNX1, CEBPA, CBL e KRAS. Contudo, são mutuamente exclusivas com as mutações IDH1/2 (Rafael Bejar *et al.*, 2011), sugerindo uma via comum para inativação da TET2 (Weissmann *et al.*, 2012). É frequente a presença de mais do que uma mutação TET2 (Delhommeau *et al.*, 2009). As mutações missense ocorrem frequentemente em regiões conservadas e são tipicamente mutações *C-terminus truncation*, que resultam na perda de função da proteína TET2 (Langemeijer *et al.*, 2009). A TET2 cataliza a oxidação de 5-mC a 5-hmC, um intermediário da desmetilação (Ko *et al.*, 2010) (Tahiliani *et al.*, 2009). No entanto, o papel desta mutação na patogênese e na evolução da SMD ainda não está totalmente esclarecido. Geralmente, a perda da função TET2 leva a uma diminuição global dos níveis de 5-hmC e acumulação de 5-mC, o que é uma característica da hipermetilação levando à repressão de genes (Tahiliani *et al.*, 2009). No entanto, o fenótipo displásico da SMD não pode ser atribuído unicamente à presença desta mutação. O mesmo se verifica nas neoplasias mieloproliferativas, onde as características displásicas são frustres, mas a mutação TET2 é relativamente frequente.

Bejar R e colaboradores (R. Bejar *et al.*, 2014) demonstraram que 20% dos doentes com SMD apresentavam esta mutação, com citogenética normal e sem impacto na sobrevivência. Contrariamente, outros investigadores apresentaram um impacto favorável da mutação TET 2 na sobrevivência global (SG) (Kosmider *et al.*, 2009). Surpreendentemente, a sua presença parece melhorar as taxas de resposta de doentes com SMD de alto risco tratados com azacitidina, embora

sem impacto na sobrevivência global (Itzykson *et al.*, 2011). Devido a estas disparidades de resultados, esta mutação não é utilizada correntemente como marcador de prognóstico na prática clínica.

iii. IDH1 e IDH2

A IDH1/2 são enzimas que catalizam a interconversão de α -KG e isocitrato. As mutações nos genes que codificam estas enzimas partilham uma característica: a redução do α -KG a 2-hidroxioglutarato (2-HG). O 2-HG é presumivelmente um oncometabolito que contribui para a carcinogénese, inibindo competitivamente a atividade enzimática de dioxigenases que requerem α -KG como cofactor (Figueroa *et al.*, 2010) (Figura 12). Ou seja, as proteínas TET são dioxigenases que metabolizam α -KG, e os elevados níveis de 2-HG inibem a atividade enzimática das proteínas TET. As mutações situam-se nos codões R132 do IDH1 e R140 ou R172 do IDH2. As mutações IDH1/2 são menos frequentes em SMD (4-11%), comparativamente a LMA (14-19%), e estão relacionadas com uma menor SG (Thol *et al.*, 2010). No entanto, tal como as mutações TET2, o seu valor prognóstico mantém-se controverso, necessitando de investigação.

1.4.3.2.2. Mutações nos genes de remodelação da cromatina

Embora a metilação do ADN seja a modificação epigenética melhor caracterizada, a sequenciação de genes permitiu a identificação em SMD de mutações recorrentes nos genes de remodelação da cromatina, sugerindo um papel na sua patogénese (Tabela 4). Assim, foram identificadas mutações em genes que codificam modificadores da histona, como o *ASXL1* (*additional sex-comb like-1*) e *EZH2* (membros da família polycomb-group - PcG). Os membros da família PcG formam complexos proteicos que mantêm a repressão da transcrição de genes como, por exemplo, o gene *HOX*.

i. ASXL1

Este gene apresenta uma dupla função, mantendo simultaneamente a ativação e a repressão dos genes *HOX*, dependendo da proteína modificadora de histonas que interage com a ASXL1 (Park, Yoon, Park, Kim, & Um, 2011). As mutações ASXL1 foram identificadas em 3 a 22% dos doentes com SMD ou LMA, e correlacionam-se com pior SG (Tabela 5) (Patel *et al.*, 2012) (Rafael Bejar *et al.*, 2011). A ASXL1 é um cofactor essencial na atividade enzimática do BCRA1 - *associated protein 1* (BAP1), e os ensaios de imunoprecipitação mostraram que a ASXL1 forma um complexo com a BAP1 nas células leucémicas

mielóides humanas que não apresentam a mutação ASXL1. A haploinsuficiência seletiva de BAP1 nas células hematopoiéticas de ratos induz um fenótipo mielodisplásico remanescente de LMMC, sugerindo que o eixo ASXL1-BAP1 pode ter um papel importante na SMD (Ding *et al.*, 2012). Num estudo com 439 doentes com SMD, as mutações do gene ASXL1 foram detetadas em 14% dos doentes sendo fator de prognóstico independente para a sobrevivência (Rafael Bejar *et al.*, 2011).

ii. EZH2

A EZH2 faz parte do componente catalítico do complexo repressivo polycomb 2 (PRC2), onde interage com EED e SUZ12. As mutações destes genes foram descritas em LLA T (Zhang *et al.*, 2012). O gene EZH2 está sobreexpresso em diferentes neoplasias epiteliais e linfomas, enquanto as mutações que o inativam são observadas em neoplasias mielóides, sugerindo que as alterações no PcG (polycomb-group proteins que apresenta atividade histona metiltransferase) apresentam consequências biológicas tecido-dependentes (Ernst *et al.*, 2010). Nos doentes com SMD, as mutações EZH2 são normalmente missense ou mutações truncadas que alteram ou eliminam o domínio SET, levando à redução dos níveis de H3K27 me3 (histone H3 on lysine 27) (Ernst *et al.*, 2010) (Nikoloski *et al.*, 2010). Estas mutações foram observadas em 6% dos doentes com SMD e estão associadas com pior sobrevivência global, comparativamente com os doentes não mutados (Rafael Bejar *et al.*, 2011) (Ernst *et al.*, 2010) (Nikoloski *et al.*, 2010). Este facto não é surpreendente, uma vez que este gene se situa no cromossoma 7, que é uma área genómica frequentemente perdida nesta patologia, e associada a muito mau prognóstico.

iii. BCOR

O gene *BCOR* codifica o corepressor do BCL6. Foi observada uma mutação deste gene em amostras de 26 doentes com SMD (Yoshida *et al.*, 2011). O *BCOR* interage com HDACs, e as mutações deste estão associadas às mutações DNMT3A, o que implica um mecanismo epigenético cooperativo na patogénese da SMD. O estudo também demonstrou que as mutações BCOR conferem uma sobrevivência global inferior (Grossmann *et al.*, 2011).

1.4.3.2.3. Mutações dos genes do spliceossoma

O spliceossoma é um complexo de ARN e de subunidades proteicas que removem os intrões e exões alterados dos transcriptos primários (pré-mARN), para depois ligar os exões reconhecidos no ARN maduro (Figura 13).

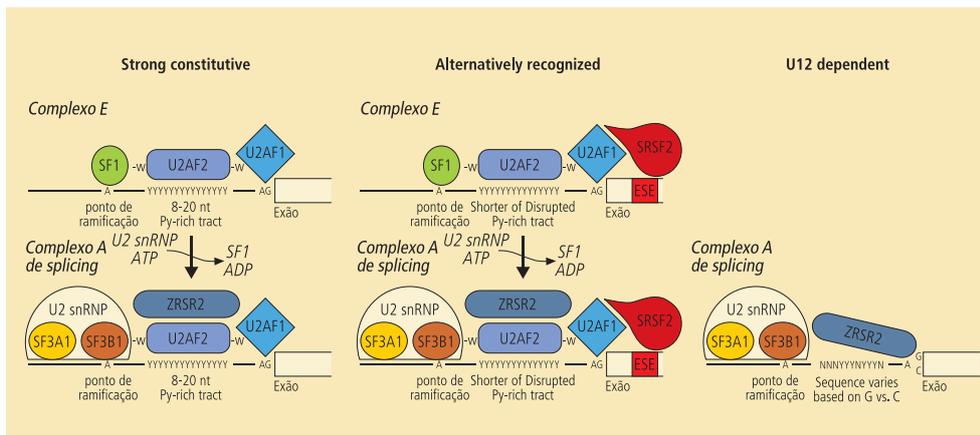


FIGURA 13

Mutações em LMA e SMD em genes do spliceossoma.

As mutações somáticas foram evidenciadas em todos os genes *major* envolvidos no reconhecimento do *splicing* em 3' e comprometimento do spliceossoma. Estes incluem os genes *SF1*, *U2AF2*, e *U2AF1*, muito importantes para a formação do complexo E; assim como, os genes *SF3A1*, *SF3B1*, e *ZRSR2*, que codificam proteínas essenciais para a estabilização do complexo *splicing* A.

(Adaptada de Larsson C.A., 2013).

Foram descritas mutações somáticas em 8 genes do core do spliceossoma - SF3B1, SRSF2, U2AF35 (U2AF1), ZRSR2, SF3A1, PRPF40B, U2AF65 (U2AF2) e SF1, sendo mais frequentes nos 4 primeiros. A maioria das mutações, exceto no ZRSR2, são missense, e não nonsense ou frameshift, sugerindo ganho de função e não redução dos níveis de fator de *splicing*.

As mutações dos genes do spliceossoma são altamente específicas dos doentes com anemia refractária com sideroblastos em anel (84,9%), ou SMD sem sideroblastos em anel (43,9%), e na leucemia mielomonocítica crônica (54,5%), comparativamente com doentes com LMA de novo (6,6%) ou neoplasias mieloproliferativas (9,6%). Este espectro de mutações parece ser específico do tipo de doença (Yoshida K, Nature 2011).

i. SF3B1

O gene *SF3B1* codifica a subunidade 155-kDa do complexo SF3B, que se liga ao complexo U2snRNP durante a formação do complexo A (Figura 13). Estas mutações estão presentes em mais de 80% dos doentes com ARSA, encontrando-se apenas em 6% das SMD sem sideroblastos em anel, sugerindo um papel na patogénese deste subtipo de SMD (Yoshida *et al.*, 2011) (Visconte, Makishima, Maciejewski, & Tiu, 2012). Comparativamente com os doentes sem mutação SF3B1, verificou-se um prognóstico mais favorável em doentes com a mutação e SMD, SMD/NMP ou ARSA, para além de uma menor progressão para LMA (Papaemmanuil *et al.*, 2011) (Visconte *et al.*, 2012). Outros genes com *splicing* de ARN aberrante incluem: *ASXL1*, *CBL*, *EZH* e *RUNX*.

ii. SRSF2

O *SRSF2* é o segundo gene de *splicing* mais mutado. As mutações são normalmente missense e são mais prevalentes na LMMC (28%), do que na

ARSA (1,5%), na SMD sem sideroblastos em anel (11,6%) ou na LMA (7%) (Yoshida *et al.*, 2011). As SMD com a mutação SRSF2 estão associadas a um elevado risco de transformação em LMA e baixa SG (Thol *et al.*, 2012). Verificou-se, também, uma associação com as mutações IDH1 e RUNX1 (Makishima *et al.*, 2012). Esta coexistência das mutações SRSF2 e RUNX1 pode justificar o facto de a desregulação nos dois genes conduzir a um fenótipo e prognóstico semelhantes.

iii. ZRSR2

As mutações do gene *ZRSR2* ocorrem em cerca de 8% das SMD e 8% das LMMC; são sobretudo mutações nonsense ou frameshift, traduzindo um papel de perda de função. Damm e colaboradores (2012) (Damm *et al.*, 2012) verificaram uma relação desta mutação com os subtipos AREB e trombocitopenia mais grave; e também um maior risco de transformação em LMA e, conseqüentemente, pior SG.

iv. U2AF1

Estas mutações não foram observadas em doentes com ARSA, mas ocorrem com frequência relativamente semelhante em doentes com SMD sem sideroblastos em anel (11,6%), LMMC (23%) e LMA (11%) (Yoshida *et al.*, 2011) (Papaemmanuil *et al.*, 2011) (Visconte *et al.*, 2012) (Abdel-Wahab & Levine, 2011). Ocorrem exclusivamente nos codões S34 ou Q157 e correlacionam-se com uma transformação mais rápida para LMA, embora o seu impacto na SG não esteja definido (Thol *et al.*, 2012). As mutações U2AF1, à semelhança das mutações SRSF2, estão implicadas no *splicing* anormal de certos genes como o RUNX1 e o TET2, e estão também associadas às mutações ASXL1 e TET2.

As mutações SF3B1, SRSF2, ZRSR2 e U2AF1 são as mais frequentes alterações genéticas que ocorrem em todos os subtipos e são mutuamente exclusivas.

1.4.3.2.4. Mutações no gene *TP53*

O gene *TP53* é o gene supressor tumoral mais frequentemente mutado nas neoplasias humanas, ocorrendo em cerca de 10% das SMD de novo e LMA, e em mais de 25% dos doentes com SMD e LMA relacionadas com a terapêutica. Atualmente, sabe-se que estes doentes apresentam cariótipos complexos (Mrózek, 2008), resultado de um evento denominado chromothripsis (Figura 14), que ocorre segundo duas hipóteses. A primeira baseia-se no encurtamento dos telómeros, o que justificaria este evento ser mais frequente na LMA do idoso com *TP53* mutado, e o aumento de LMA com cariótipo complexo com a

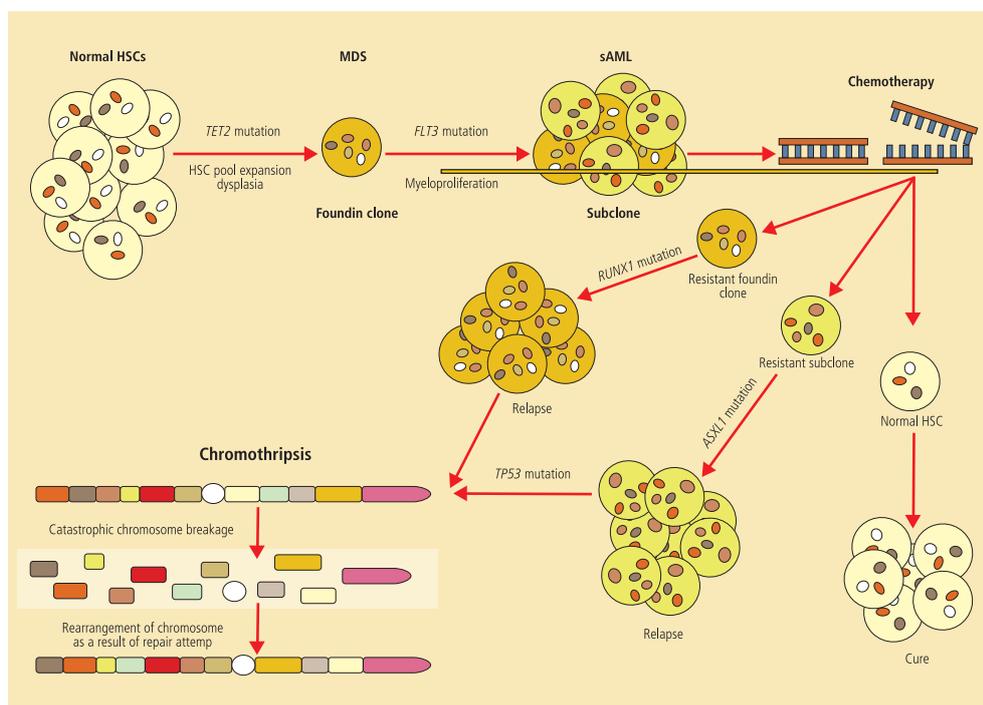


FIGURA 14

Representação da potencial via de aquisição de alelos mutantes na SMD, evolução para LMA, e recidiva após resposta à quimioterapia *standard*.

A *stem cell* normal adquire aleatoriamente centenas de mutações não patogênicas ao longo do do tempo. Em determinado ponto, uma mutação "driver" é adquirida (por exemplo, TET2) que confere uma vantagem de crescimento a um determinado clone. Mutações previamente adquiridas migram com a mutação "driver", estando presentes em toda a sua descendência. Estas mutações perturbam a maturação mielóide normal e induzem rasgos displásicos clinicamente compatíveis com SMD. A subsequente aquisição de alelos mutantes no clone (por exemplo, FLT3) pode resultar na transformação leucêmica (LMA secundária). Os doentes com LMA recebem tratamento de indução seguido por quimioterapia de consolidação. Alguns destes doentes podem estar curados pela erradicação do clone e de sub-clones com composição mutacional mais complexa. No entanto, uma percentagem significativa dos doentes recidiva após quimioterapia devido à resistência e reexpansão subsequente de clones resistentes. Esta sequência de eventos é impulsionada pela aquisição de novas mutações (por exemplo, RUNX1, ASXL1, e TP53), no clone ou num sub-clone como uma consequência da selecção induzida pelo tratamento ou como resultado de lesão no DN directamente induzida pela quimioterapia citotóxica. As mutações no gene TP53 têm sido associados a um fenómeno denominado *chromothripsis*, podendo ocorrer em qualquer ponto durante a patogénese da LMA. Esta induz fragmentação cromossómica resultante de quebras na cadeia dupla do ADN. O resultado é um conglomerado de rearranjos cromossómicos, adicionando complexidade genómica à proporcionada pelas inúmeras mutações pontuais presentes nos genomas e constitui a base genética para o crescimento de tumores e resistência aos tratamentos.

(Adaptada de Larsson C.A., 2013).

idade do doente. A outra hipótese sugere que a *chromothripsis* ocorre quando as quebras da dupla hélice do ADN causada por radiação ionizante ou agentes que causem lesão do ADN, são reparadas pela via dominante nas células com défice de TP53 - NHF (nonhomologous end joining) (Rausch *et al.*, 2012).

A função da TP53 foi também implicada na patogénese da Síndrome 5q- (Barlow *et al.*, 2010) (Dutt *et al.*, 2011).

1.4.3.2.5. Mutações no gene *RAS*

A família do gene *RAS* é a mais estudada em SMD, sendo que 10 a 40% destes doentes apresentam mutações do gene *RAS*. Os genes *RAS*, *H-*, *K-* e *N-*, codificam proteínas de transdução de sinal que atuam na via de sinalização dos recetores dos fatores de crescimento. Após ativação do recetor do fator de crescimento, ocorre ativação das proteínas *RAS* por ligação a guanosina trifosfato (GTP) promovendo um sinal de proliferação celular. Posteriormente, após a hidrolização do GTP a guanosina difosfato (GDP), as proteínas *RAS* tornam-se inativas. A proteína mutada tem menor atividade GTásica, mantendo-se persistentemente na forma ativa, ou seja ligada a GTP, promovendo um sinal contínuo para o núcleo o que se traduz por um aumento do nível de proliferação celular. As mutações no gene *N-RAS* estão associadas a elevado risco de transformação para LMA e a pior prognóstico.

1.4.3.2.6. Mutações nos genes *JAK* e *MPL*

A evidência de casos com características de SMD e NMP resultou em investigações que exploraram o status mutacional dos genes *JAK* e *MPL*, frequentemente implicados nas NMP Philadelphia negativas. Szpurka e colaboradores (Szpurka *et al.*, 2006) analisaram um grupo de 57 doentes com SMD/NMP e verificaram que onze doentes, particularmente com o subtipo ARSA-T, apresentavam a mutação *JAK2* (V617F). Este estudo foi seguido por outros que revelaram que as mutações *JAK2* ocorrem em aproximadamente 50% dos doentes com ARSA-T, mas é extremamente rara em doentes com ARSA e contagem plaquetar normal (Malcovati *et al.*, 2009) (Boissinot, Garand, Hamidou, & Hermouet, 2006) (Ceesay *et al.*, 2006) (Ingram *et al.*, 2006) (Remacha *et al.*, 2006) (Renneville *et al.*, 2006) (Wang *et al.*, 2006) (Norbert Gattermann *et al.*, 2007) (Olsen *et al.*, 2008) (Raya *et al.*, 2008) (Schmitt-Graeff *et al.*, 2008) (Schnittger *et al.*, 2008). Estas mutações também foram observadas numa percentagem de doentes com LMMC e SMD/NMP, mas são raras na SMD em geral. Os doentes com *JAK2* (V617F) positivo apresentam valores de hemoglobina e leucócitos significativamente superiores, mas não se verificaram diferenças na SG e na presença de fibrose medular comparativamente com os doentes *JAK2* (V617F) negativo ($p=0.38$) (Raya *et al.*, 2008). Malcovati (Blood 2009) (Malcovati *et al.*, 2009) detetou a mutação *JAK2* (V617F) em 53% de doentes com ARSA-T (90 doentes num grupo de 187 doentes com $\geq 15\%$ de sideroblastos em anel e/ou plaquetas $> 450 \times 10^9/L$) e em 2/5 de doentes com o subtipo SMD/NMP. Dois destes doentes apresentavam também a mutação *MPL*, e um doente evidenciou a mutação *JAK2* do exão 12. Ainda outro estudo investigou o status do *JAK2* em 97 doentes com SMD e del(5q) (Ingram *et al.*, 2006) e identificou a mutação em 6 casos, todos com del(5q) isolada. Estes doentes apresentavam contagens plaquetares superiores, mas não diferiam em outros parâmetros dos doentes sem mutação. Recentemente, foi reportado um caso que descrevia um doente com a mutação *JAK2* e a del(5q) detetadas em diferentes clones (Sokol *et al.*, 2010).

1.4.3.2.7. Mutações nos recetores de tirosina cinase

Outras mutações descritas na SMD incluem as do recetores de tirosina-cinase, *FLT3* (5% dos casos) e *c-KIT*. Estes recetores transmembranares de classe III activam vias de sinalização celular mitogénicas, desempenhando um papel importante na hematopoiese.

Existem dois tipos de mutações no gene *FLT3*, as duplicações internas em tandem (*FLT3/ITD*) no domínio justamembranar, e as mutações ativadoras em *looping* (*FLT3/ALM*) no domínio citoplasmático de tirosina-cinase (D H Christiansen, Andersen, Desta, & Pedersen-Bjergaard, 2005). A mutação *ITD* do gene *FLT3*

está presente, como mutação somática, em 15-20% das LMA e 5% das SMD, sugerindo ser um evento genético tardio. Estes doentes têm pior prognóstico o que sugere uma associação com a transformação leucêmica.

A sobreexpressão de c-KIT tem sido relatada em associação a neoplasias mieloproliferativas e síndromes mielodisplásicas, mas os dados sobre as mutações no C-KIT em doentes com neoplasias mielóides são escassos. Além disso, a prevalência de mutações no C-KIT em amostras de medula óssea de indivíduos com mastocitose sistêmica é em grande parte desconhecido. Fritsche-Polanz R (2001) (Fritsche-Polanz *et al.*, 2001) demonstraram que as síndromes mielodisplásicas sem evidência histológica ou citológica de mastocitose não apresentavam mutações somáticas nos exons 10, 11, 12, 16, 17 e 18 de C-KIT. Nas síndromes mielodisplásicas, os níveis de c-KIT parecem variar de acordo com os subtipos, com maior expressão nas formas mais avançadas da doença. Embora o papel funcional de c-KIT ainda não esteja esclarecido, os resultados disponíveis na literatura sugerem que os níveis séricos de c-KIT podem refletir as diversas fases de doenças hematológicas (Kawakita *et al.*, 1995).

1.4.3.2.8. Translocações mais frequentes na SMD

A t(5;12)(q33;p13) foi inicialmente descrita por Srivastava A. (1988) (Srivastava *et al.*, 1988) em doentes com LMMC e eosinofilia. Trata-se de uma alteração cromossômica recorrente que resulta na fusão entre o gene *PDGFR-β* no cromossoma 5 e o gene *E-twenty six (ETS)-like, ETS variant gene 6 (TEL)*, no cromossoma 12 (TEL/ETV6) (Golub, Barker, Lovett, & Gilliland, 1994) (Figura 15). Sabe-se que esta translocação ocorre num grupo extenso de neoplasias mielóides com características mieloproliferativas e mielodisplásicas simultaneamente. Os membros da família ETS atuam como ativadores da transcrição, enquanto o *PDGFR-β* é um recetor de tirosina cinase que ativa múltiplas vias de sinalização intracelulares, incluindo a via das proteínas RAS-RAF.

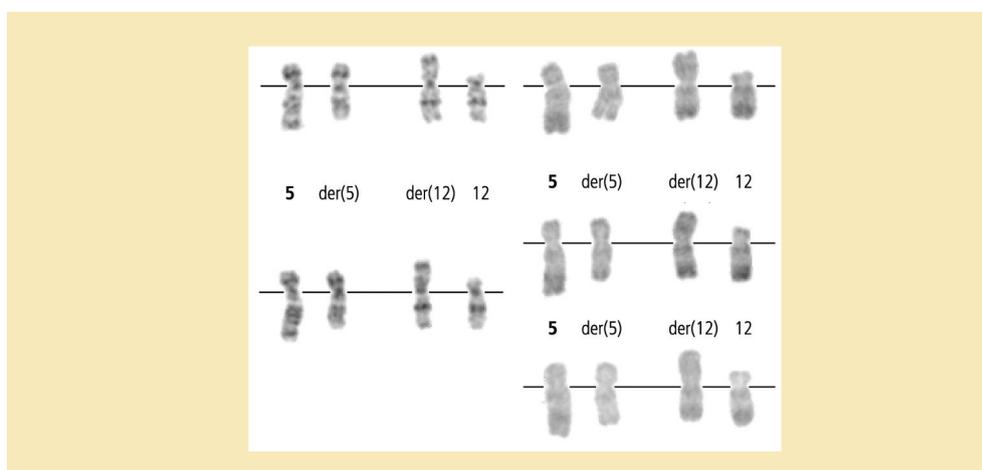


FIGURA 15

A t(5;12)(q33;p13).

(adaptado de <http://atlasgeneticsoncology.org/Anomalies/t0512.html>).

A fusão do gene *TEL* também foi descrita em associação com outros genes como o *Arylhydrocarbon Recetor Nuclear Translocator*, meningioma 1 (*MN1*), *Ecotropic Viral Integration Site 1* (*EVI-1*) e *acyl CoA synthetase 2* em doentes com SMD com translocações variadas (Salomon-Nguyen *et al.*, 2000).

Outro gene identificado como membro de fusão em doentes com LMA relacionada com a terapêutica e SMD com translocações cromossômicas envolvendo o cromossoma 11p15.5, é o gene da *nucleoporina 98* (*NUP98*), que codifica as nucleoporinas, moléculas envolvidas na importação e exportação de proteínas e ARNs.

A $t(6;9)(p23;q34)$ pode ocorrer em doentes com LMA ou SMD e resulta numa proteína de fusão entre os genes *DEK* e *CAN* no cromossoma 6 e 9, respetivamente. O *CAN* é estruturalmente semelhante ao componente do complexo do poro nuclear, *NUP214*, que também promove a importação e exportação do ARN e proteínas (Kraemer, Wozniak, Blobel, & Radu, 1994).

As translocações que envolvem a banda 11q23 estão classicamente descritas nas SMD ou LMA secundárias a tratamento com inibidores das topoisomerasas da classe II, nas leucemias bifenotípicas, nas leucemias monocíticas e nas leucemias das crianças (Ayton & Cleary, 2001). Os casos de SMD associados à translocação 11q23 ocorrem cerca de 2 anos após a exposição ao etoposido e estão associados a alto risco de progressão para LMA. O oncogene *MLL* reside no 11q23, uma região cromossômica que se encontra alterada em doentes com SMD com história de exposição a este fármaco. Quando presente nos doentes com LMA normalmente confere mau prognóstico.

No entanto, não está esclarecido o mecanismo exato do gene *MLL* na SMD primária, sugerindo-se que atue como regulador homeostático da transcrição. Embora as translocações convencionais que envolvem a banda 11q23, como a $t(4;11)(q21;q23)$ e a $t(9;21)(q21;q23)$, não se encontrem na SMD primária, outras como a $t(11;19)(q23;p13.1)$ e a $t(11;16)(q23;p13)$ têm sido reportadas. Também a duplicação em série do gene *MLL* tem sido descrita em doentes com SMD (Kreuziger, Porcher, Ketterling, & Steensma, 2007) (Siew-Gek Lee *et al.*, 2004) (Cao *et al.*, 2012).

As alterações no cromossoma 3 que envolvem as bandas 3q21 e 3q26, onde se localiza o gene *EVI-1*, ocorrem em mais de 2% dos doentes com LMA e SMD, conferindo mau prognóstico (Hirai, 2003).

A Síndrome 3q21q26 foi descrita em doentes com anomalias da megacariocitopoiese, trombocitose e mau prognóstico (Jotterand Bellomo, Parlier, Mühlematter, Grob, & Beris, 1992). Nesta região estão incluídos os genes da transferina e do seu recetor, da lactoferrina, da melanotransferina, do *CALLA/CD10* e do *EVI-1*. A $inv(3)(q21q26)$ e a $t(3;3)(q21;q26)$ estão incluídas nesta Síndrome. A $t(1;3)(p36;q21)$ resulta na ativação do gene *MEL1*, homólogo do *EVI-1*, sob o

controle da riboforina I, localizado na região 3q21 (Mochizuki *et al.*, 2000). Está associada a displasia trilinear e a dismegacariocitopoiese. A t(3;21)(q26;q22) gera um gene quimérico, o *AML1/EVI-1*, observado na LMA/SMD relacionada com terapêutica e na crise blástica de LMC (Mochizuki *et al.*, 2000). A fisiopatologia da leucemogénese mediada pelo *EVI-1* não está clara, mas pode estar relacionada com efeitos na sinalização do TGF- β (Izutsu *et al.*, 2001).

Buonamici S. e seus colaboradores (2004) (Buonamici *et al.*, 2004) desenvolveram recentemente um modelo murino de mielodisplasia com alterações no gene *EVI-1*. Estes animais desenvolveram uma pancitopenia fatal acompanhada de medula hipercelular e desitropoiese.

A t(3;5)(q25.1;q34) pode ocorrer na SMD e na LMA, e envolve o gene *NPM* na região 5q34 e o gene *MLF1* na região 3q25.1 (Yoneda-Kato *et al.*, 1996). O gene *NPM* está relacionado com o transporte das nucleoproteínas ribossômicas entre o nucléolo e o citoplasma. O gene de fusão resultante pode afetar o crescimento celular através de alterações na replicação do ADN, no processamento do ARN ou na expressão génica.

1.4.4. Micro-ARNs

Os micro-ARNs (miARNs) são uma classe de pequenas moléculas de ARN não codificantes, recentemente identificadas, que regulam a expressão génica pós-transcricional, apresentando um papel na regulação da expressão proteica reprimindo a tradução ou destabilizando o ARNm alvo. No Homem, foram identificados 2246 miRNAs maduros (miRBase 19.0, agosto 2012) que regulam 1/3 dos genes humanos. Desde a sua descoberta, estes foram associados às várias funções celulares: proliferação, diferenciação e apoptose. Têm também um papel importante no desenvolvimento de neoplasias e na manutenção das características biológicas do embrião, adulto e células hematopoiéticas precursoras tumorais (Hatfield & Ruohola-Baker, 2008) (Shcherbata *et al.*, 2006). Adicionalmente, há evidência de um papel crucial no desenvolvimento hematopoiético (Felli *et al.*, 2005) (Georgantas *et al.*, 2007). Embora os miRNAs tenham sido identificados como reguladores importantes na hematopoiese e a sua expressão aberrante tenha sido associada a vários tipos de leucemia, só recentemente foram implicados na patogénese da SMD. O perfil de expressão dos miRNAs e a investigação em ratos permitiram identificar quais os implicados na SMD (Figura 16). No entanto, o seu papel na evolução de SMD para LMA permanece por esclarecer.

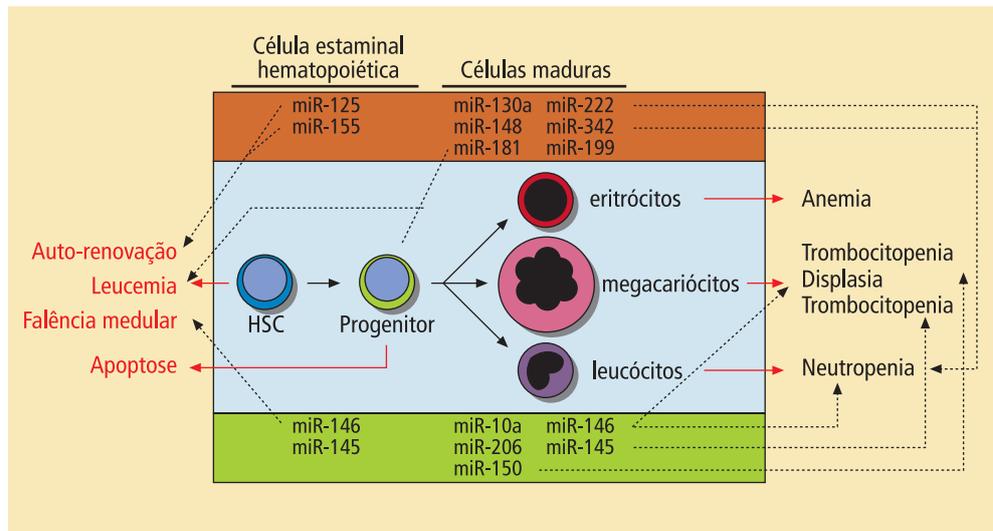
Os dados atuais sugerem que a expressão aberrante de miARNs apresenta um maior impacto se associada a alteração de genes de uma via de sinalização, e não somente a um alvo ARNm, embora ambos os cenários possam ser possíveis.

FIGURA 16

Contribuição dos miARN para a patogênese da SMD.

A figura representa somente os miRNAs sobreexpressos (na caixa vermelha) e os sobexpressos (na caixa verde), em SMD, que foram identificados em mais do que um estudo.

(Adaptada de Rhyasen G. W. *et al.*, 2012).



Os miARNs apresentam um potencial papel como utensílio de diagnóstico, prognóstico e avaliação de resposta em doentes com SMD, podendo melhorar a abordagem nesta patologia.

1.4.5. Alterações nas vias de sinalização celular

A regulação epigenética aberrante e as alterações genéticas são imprescindíveis na patogênese da SMD, uma vez que permitem a fuga aos mecanismos de controlo de crescimento, diferenciação e morte, originando o fenótipo maligno das células neoplásicas (Feinberg, 2004) (Herman & Baylin, 2003) (Baylin *et al.*, 2000) (P. A. Jones, 1999) (P. A. Jones & Laird, 1999). Por outro lado, os eventos epigenéticos podem afetar a expressão génica, e o efeito cumulativo das alterações genéticas e epigenéticas altera as vias de sinalização dos fatores de crescimento, a regulação do ciclo celular e a apoptose.

O ciclo celular é o processo fisiológico que resulta na divisão celular (Tyson, Csikasz-Nagy, & Novak, 2002), convergindo nele diversas vias de sinalização intracelular que o transformam no alvo final de uma variedade de sinais proliferativos iniciados habitualmente pela ligação de fatores de crescimento aos seus recetores de membrana. A complexa interação entre os sinais proliferativos e as proteínas inibitórias condiciona determinados mecanismos de ação moleculares que culminam no bloqueio ou na entrada no ciclo celular.

Ao longo da vida da célula, cada período de divisão celular (mitose) é separado por um período de duração muito variável, a interfase, na qual se reconhecem 3 períodos distintos: fase G1 onde ocorre crescimento celular, fase

S onde ocorre a síntese de ADN e fase G2 em que a célula se prepara para a mitose, sintetizando proteínas (Figura 17) (Cooper G. M. & Hausman R. E., 2006). Os pontos críticos na regulação do ciclo celular são as transições entre as diferentes fases, em particular as transições G1/S e G2/M. A perturbação da homeostase do ciclo celular é indiscutivelmente um dos acontecimentos mais importantes na transformação oncogénica (Ortega S, Current Genomics 2002). Os genes que codificam proteínas implicadas na estimulação do ciclo celular são proto-oncogenes, como por exemplo, as ciclinas e as cinases dependentes das ciclinas (CDK_{1 a 6}). De igual modo, os genes que codificam proteínas reguladoras que inibem o ciclo celular são genes supressores tumorais, de que são exemplos o gene *p53*, *CDKN2A* e *CDKN2B*, estes últimos codificam as proteínas *p16INK4A* e *p15INK4B*, respetivamente (Figura 17).

Os complexos proteicos Ciclina/CDK possuem atividade de serina/treonina-cinase e atuam através da ativação ou inativação de determinadas proteínas, determinando deste modo a passagem das células pelas várias fases do ciclo celular. A subunidade CDK destes complexos é constitutivamente expressa na célula e possui atividade catalítica, cuja ativação depende da ligação à subunidade reguladora, a Ciclina. Esta subunidade é sintetizada apenas em resposta a determinados estímulos.

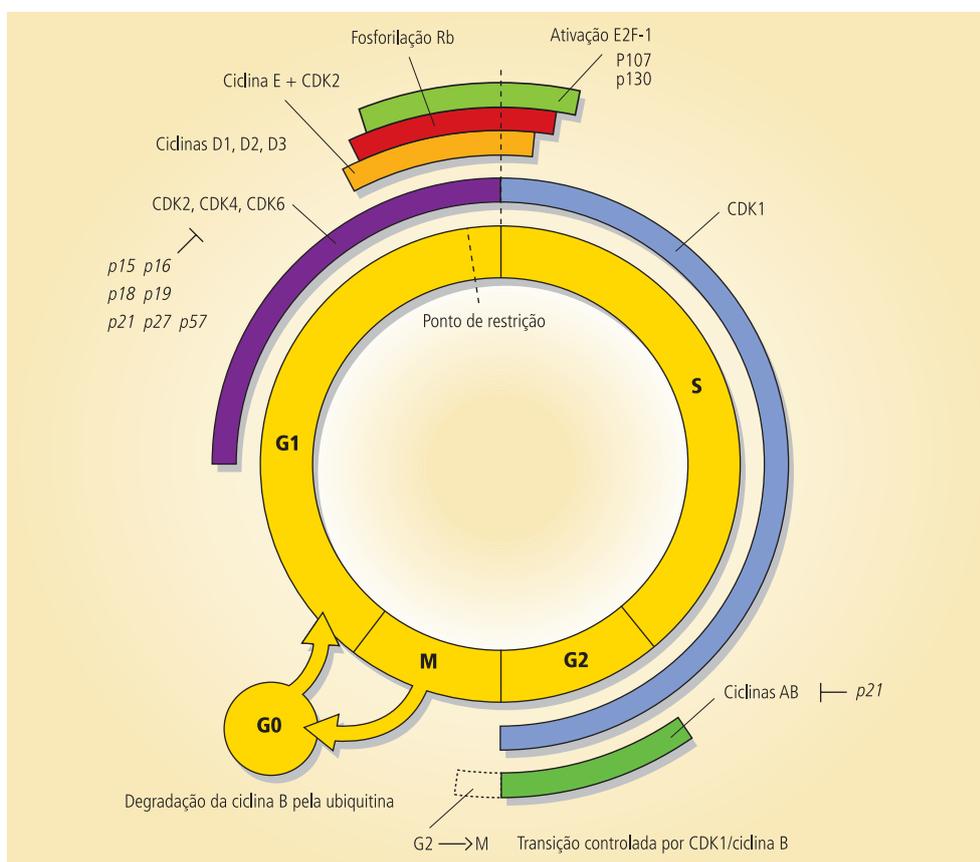


FIGURA 17

O Ciclo Celular.

A progressão do ciclo celular pelas diferentes fases, G1, S, G2 e M é regulada pelos complexos Ciclina/CDK e por genes supressores tumorais, específicos para cada fase do ciclo celular. O primeiro ponto de restrição do ciclo celular é regulado pelas proteínas supressoras tumorais *pRB* e *p53* permitindo a monitorização do volume celular e a reparação do genoma em caso de lesão. (Adaptado de Earnshaw, 2004). Estão ainda representados os reguladores negativos, *pRB*, *p15*, *p16*, *p21*, *p27*, e positivos, ciclinas e CDKs, e o factor de transcrição E2F.

1.4.5.1. Vias de proliferação celular

A hematopoiese ineficaz característica da SMD promoveu a investigação das vias de sinalização celular envolvidas na transdução de sinais mediados pela eritropoietina (EPO) e outros fatores de crescimento hematopoiéticos. A primeira envolve uma complexa cascata de eventos, com início na ligação da EPO ao seu recetor (EPO-R) (W. Ma *et al.*, 2010). Seguidamente, a cinase Janus, JAK2, é ativada, levando à fosforilação de resíduos de tirosina de várias proteínas (Figura 18), nomeadamente, fatores de transcrição (FT), os *signal transducer and activator of transcription* (STATs). A ativação do STAT5, um dos FT importantes na sinalização da EPO, está alterada na SMD (Hoefsloot *et al.*, 1997) (Spinelli *et al.*, 2012). Esta observação associada à presença do EPO-R nos doentes com SMD indica que a alteração desta via de sinalização pode ter um papel importante neste tipo de patologias (Backx, Broeders, Hoefsloot, Wognum, & Löwenberg, 1996).

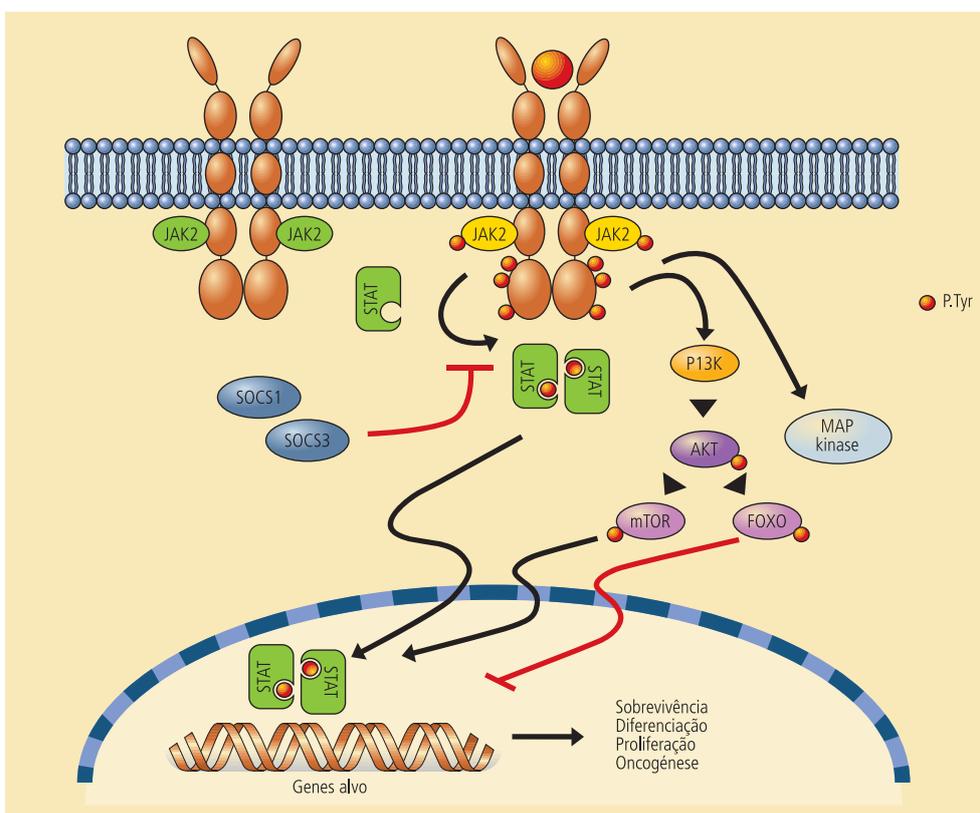
Como mencionado, as vias de sinalização conducentes à proliferação celular iniciam-se geralmente pela ligação de fatores de crescimento a um recetor membranar, a maioria dos quais com função de tirosina-cinase culminando na transcrição de genes reguladores, que codificam proteínas envolvidas na diferenciação, proliferação e progressão do ciclo celular.

FIGURA 18

Vias de sinalização celular ativadas pela eritropoietina.

Está representada a ativação das vias de sinalização pela JAK2. A JAK2 e os outros membros da família das cinases Janus são proteínas tirosina cinase que funcionam como intermediários entre os recetores membranares e as moléculas sinalizadoras intracelulares. As proteínas JAK estão constitutivamente associadas com os domínios citoplasmáticos dos recetores. Normalmente a ativação celular ocorre quando a ligação de um ligando, Epo ou trombopoietina (Tpo), induz a dimerização do seu recetor e a sua alteração conformacional com consequente ativação da JAK. Os dois recetores associados à JAK aproximam-se permitindo a transfosforilação um do outro. As JAKs fosforiladas e ativadas, por sua vez, fosforilam os domínios citoplasmáticos dos recetores, que por esse meio se tornam locais de ligação para uma cascata de moléculas sinalizadoras, particularmente os STAT. Os STATs estão ligados a resíduos de tirosina fosforilados nos domínios citoplasmáticos dos Epo-R e Tpo-R, tornando-se eles mesmos substratos para fosforilação e ativação pela JAK ativada. As moléculas STATs ativadas, migram para o núcleo, onde atuam como fatores de transcrição ligando seqüências específicas reguladoras que ativam ou reprimem a transcrição de genes alvo.

(Adaptado de Vannuchi A. *et al.*, 2009).



Além do EPO-R, têm particular importância na hematopoiese, os recetores de tirosina-quinase da família dos recetores das tirosinas cinases (RTK) tipo III, nomeadamente o recetor *FMS-like tyrosine kinase 3* (FLT3) (Figura 19), os recetores c-KIT, c-FMS (*colony-stimulating factor-1 recetor*) e PDGFR (Platelet-Derived Growth Factors). Como representado nas figuras 18 e 19, após ativação do recetor pelo respetivo ligando, várias vias efectoras intracelulares podem ser ativadas, como a via do Fosfatidil Inositol-3-Cinase (PI3K), a via de sinalização RAS/MAPK (MAPK, *Mitogen-Activated Protein Kinases*, associada às proteínas RAS-RAF), a via da Fosfolipase C γ (PLC γ) e a via JAK/STAT (Small, 2006) (Parcells, Ikeda, Simms-Waldrip, Moore, & Sakamoto, 2006).

A família de proteínas RAS é formada por 3 GTPases de pequeno peso molecular denominadas N-RAS, H-RAS e K-RAS (Rodriguez-Viciano, Sabatier, & McCormick, 2004). Os genes *NRAS*, *HRAS* e *KRAS* são oncogenes conhecidos desde há longa data. O gene *NRAS* foi inclusivamente o primeiro oncogene identificado em células neoplásicas humanas (E. H. Chang, Furth, Scolnick, & Lowy, 1982). Estas proteínas estão situadas no lado citosólico da membrana celular, acopladas a recetores do tipo tirosina-quinase (Reuveni, Klein, & Levitzki, 2003). O seu papel principal é a transdução de sinais iniciados pela ligação de fatores de crescimento ao seu recetor específico. Quando ativa, a proteína RAS pode desencadear vias efectoras, entre as quais a via das cinases MAPK e a via da PI3K/Akt (Rodriguez-Viciano *et al.*, 2004). O resultado final é a expressão de genes codificadores de proteínas responsáveis pela progressão do ciclo celular e pela sobrevivência celular (F. Chang *et al.*, 2003).

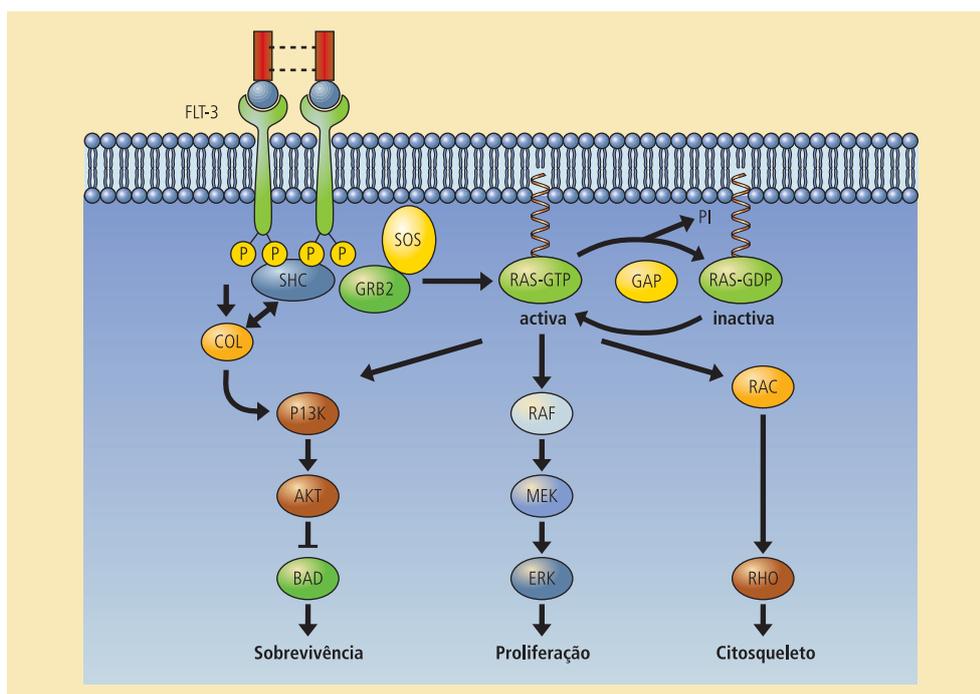


FIGURA 19

Vias de sinalização a jusante do recetor de tirosina quinase FLT3.

A ativação do recetor FLT3 induz ativação das vias PI3K/AKT e RAS/RAF/MAPK, onde a proteína RAS desempenha um papel essencial.

(Adaptado de Stirewalt D. L., 2003).

A via das RAS/MAPK, altamente conservada nos organismos eucarióticos, é ativada após ligação de um fator de crescimento ao seu recetor, com atividade de tirosina-cinase. Daqui resulta a estimulação de uma proteína tirosina-cinase e subsequente ativação da proteína RAS, a qual ativa a serina/treonina-cinase RAF, e posteriormente a proteína MAP Kinase/ERK Kinase (MEK). Esta proteína vai ativar, por fosforilação de resíduos treonina e tirosina, proteínas que são membros da família *Extracelular Signal-Regulated Kinase* (ERK) (Figura 19). A proteína ERK migra para o núcleo e ativa, por fosforilação, outras proteínas cinases e fatores de transcrição como o ELK-1, o c-JUN e o c-MYC, que regulam a transcrição de genes envolvidos na proliferação e no ciclo celular (Beaupre & Kurzrock, 1999a) (Beaupre & Kurzrock, 1999b). A via das MAPK é assim uma das vias de sinalização celular que permite que as células que se encontram na fase G0/G1 do ciclo celular entrem em ciclo e se dividam, originando duas células-filha. Por exemplo, a expressão da Ciclina D1, responsável pela progressão da fase G1 para S, é induzida pela ativação da via das MAPK por fatores de crescimento (Cooper G. M. & Hausman R. E., 2006).

Outra via celular também ativada pela proteína RAS é a via do PI3K/AKT (Figura 19), que é responsável pela transdução de sinais iniciados pela ligação de fatores de crescimento aos respetivos recetores de membrana (E. H. Chang *et al.*, 1982). Estas funções conferem a esta proteína um papel central não só na proliferação e crescimento como também na sobrevivência da célula (Lodish, Hilton, Klingmüller, Watowich, & Wu, 1995).

Deste modo, as proteínas RAS são um componente essencial na cascata de sinalização da proliferação celular em resposta a uma variedade de estímulos extracelulares, incluindo os fatores de crescimento. As mutações do gene *RAS* foram identificadas em 15% das SMD e estão associadas a mau prognóstico e a elevada taxa de transformação leucémica (Padua *et al.*, 1998) (Paquette *et al.*, 1993).

Ao longo do processo de diferenciação celular ocorre um equilíbrio dinâmico entre estímulo/repressão da proliferação celular. O facto de que a maior parte das células do nosso organismo se encontra numa fase G0/G1 permite que os tecidos/células efetuem a sua maturação e especialização coordenadas, dependendo do organismo em questão. Porém, nas neoplasias, as células adquirem alterações que levam à desregulação da sinalização normal, em particular dos padrões normais de diferenciação, maturação, proliferação e/ou resistência à morte celular por apoptose (Azevedo C., 1999). O sistema hematopoiético constitui um bom exemplo. De facto, a hematopoiese normal resulta de um equilíbrio entre a proliferação, a diferenciação e a morte celular.

1.4.5.2. Vias de morte celular programada

A apoptose, ou morte celular programada, foi inicialmente descrita por Wyllie e colaboradores em 1980 (Wyllie, Kerr, & Currie, 1980). Trata-se de um fenômeno fisiológico de seleção natural à escala celular, cujo principal papel é a eliminação de células desnecessárias ou potencialmente nocivas, como aquelas infectadas por vírus ou geneticamente alteradas pela ação de agentes mutagênicos. A apoptose intervém em processos biológicos tão variados como a embriogênese, a renovação de células epiteliais e hematopoiéticas, a involução cíclica dos órgãos reprodutivos da mulher, a atrofia induzida pela remoção de fatores de crescimento ou hormonas, a regulação da resposta imunitária e a citotoxicidade mediada por células (Bleackley & Heibein, 2001). Independentemente do estímulo, a apoptose também parece ser um importante mecanismo de eliminação de células em transformação neoplásica. A perturbação da apoptose é, portanto, um dos processos envolvidos na oncogénese, concorrendo para ela através de vários proto-oncogenes e genes supressores tumorais que codificam proteínas que intervêm neste mecanismo biológico.

As células em apoptose são caracterizadas morfológicamente por retração do volume celular com condensação do citoplasma e núcleo, fragmentação nuclear e formação de vesículas apoptóticas, e “*blebbing*” da membrana plasmática, com preservação da sua integridade. As células em apoptose são posteriormente fagocitadas pelos macrófagos, embora com resposta inflamatória pouco evidente (Greenberg, 1998) (Walker, Harmon, Gobé, & Kerr, 1988), num processo que dura em média cerca de 3 horas. A apoptose distingue-se da necrose (Bleackley & Heibein, 2001), na medida em que a célula não sofre edema intracelular, o conteúdo celular não é libertado para o interstício e ocorre na dependência de consumo energético sob a forma de ATP. Assim, a morte celular programada é um mecanismo de morte celular intrínseco geneticamente programado, dependente de energia, altamente conservado durante a evolução e envolvido na regulação e manutenção de vários processos fisiológicos básicos durante o desenvolvimento do organismo adulto.

Este tipo de morte pode ser desencadeado por condições intrínsecas (em resposta ao *stress* ou lesões no ADN) ou extrínsecas (em resposta a substâncias citotóxicas ou a ligandos de recetores de morte da família do fator de necrose tumoral, $TNF\alpha$, como o próprio $TNF\alpha$, o ligando do FAS, FAS-L, e o ligando indutor da apoptose relacionado com o TNF -TRAIL). Assim, os iniciadores da via apoptótica incluem uma variedade de estímulos endógenos e agressões exógenas, em particular, hormonas esteroides e diferentes citocinas, como $TNF-\alpha$, FAS-L e fator de crescimento tumoral β (TGF- β), citostáticos, radiações gama e UV, químicos e vírus (Greenberg, 1998).

Existem duas vias *major* de sinalização da apoptose, a via extrínseca ou membranar e a via intrínseca ou mitocondrial. Ambas as vias culminam na ativação de uma família de proteases de cisteína citosólicas aspartato específicas, as caspases. Estas enzimas são as moléculas efectoras de morte, responsáveis pela clivagem de proteínas citosólicas e nucleares que resultam na destruição celular. Assim, a morte apoptótica decorre da ativação de recetores pertencentes à família do $TNF\alpha$, como os recetores do FAS e do TRAIL (TRAIL-Rs) (via extrínseca ou de recetores de morte) e/ou do envolvimento da mitocôndria (via intrínseca ou mitocondrial), como está representado na figura 20 (Cooper G. M. & Hausman R. E., 2006 - livro).

A via extrínseca é iniciada pela atuação direta de certas moléculas sobre a membrana celular. É o caso da proteína transmembranar FAS (CD95) (Holler *et al.*, 2000), dos recetores do $TNF-\alpha$ (TNR-R1) e do TRAIL (TRAIL-R1 e TRAIL-R2) (Miyazaki & Reed, 2001), e das enzimas dos grânulos líticos dos linfócitos T citotóxicos (perforina, granzima A e granzima B) (Bleackley & Heibei, 2001). O evento inicial comum a esta via é a ativação da caspase 8 que, por sua vez, desencadeará a ativação das caspases efectoras (caspases 3, 6 e 9) (Figura 20) (Jane E Parker & Mufti, 2004) (Zang *et al.*, 2001).

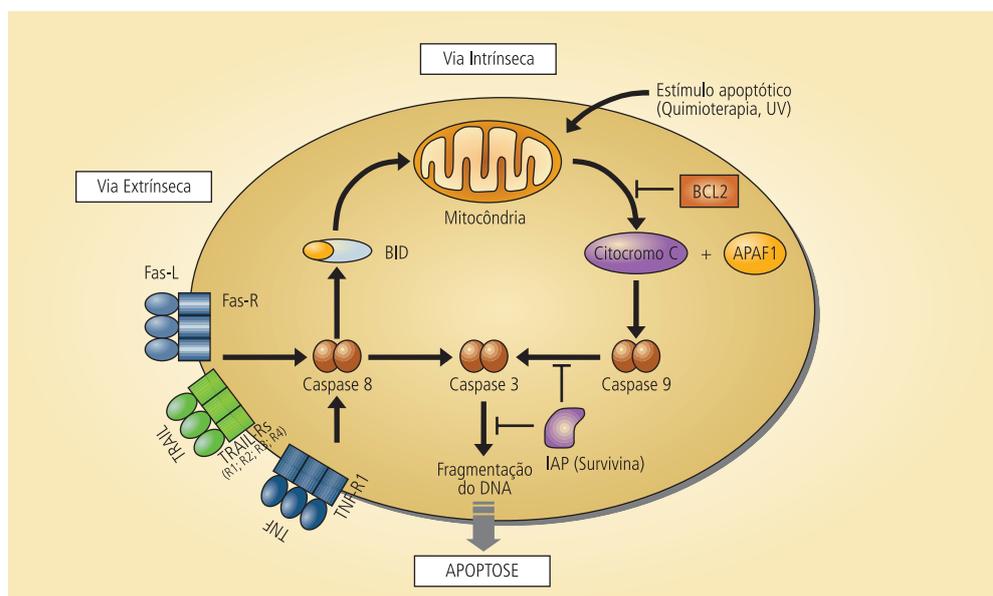
A estimulação dos recetores pelos respetivos ligandos ou anticorpos agonistas causa a agregação dos mesmos e alteração conformacional do domínio de morte citoplasmático. Seguidamente, ocorre o recrutamento de moléculas adaptadoras intracelulares como o FADD ou TRADD e a caspase 8, formando-se o complexo sinalizador de indução de morte, DISC (Chinnaiyan, O'Rourke, Tewari, & Dixit, 1995), com consequente ativação das caspases, responsáveis pela apoptose (Figura 20). As proteínas FADD e TRADD funcionam

FIGURA 20

Esquemática das vias extrínseca e intrínseca da apoptose.

A via extrínseca inicia-se pela interação de FAS-L com o recetor FAS com consequente ativação da cascata de caspases 8, 1 e 3. A via mitocondrial pode ser ativada por lesão do ADN ou através da proteína Bid (via caspase 8). Nesta situação, a alteração do potencial de membrana mitocondrial induz a libertação do citocromo C que, juntamente com a proteína APAF-1 e a Caspase 9 forma o apoptosoma, que ativa a Caspase 3. Esta proteína pode inibir diretamente fatores de transcrição e outras proteínas com funções na reparação do ADN, para além de induzir a fragmentação da estrutura nuclear e do ADN.

(Adaptado de Cooper G. M. & Hausman R. E., 2006; Andersen M. H. *et al.*, 2005; Azevedo C., 1999).



como moléculas adaptadoras universalmente utilizada por estes recetores, respetivamente FAS e TNF-R1/TRAIL-Rs) (Holler *et al.*, 2000) (Figura 20).

A caspase 8 pode ainda interagir com a proteína Bid que, após maturação, possui um papel importante na indução da permeabilização da membrana mitocondrial, interligando a via extrínseca com a via intrínseca de apoptose (Cooper G. M. & Hausman R. E., 2007; Azevedo C., 1999).

A via intrínseca é, ao invés, o resultado da perturbação da homeostase mitocondrial, ocorrendo, por exemplo, em consequência da privação de fatores de crescimento ou como resultado do *stress* oxidativo. A diminuição do potencial de membrana mitocondrial leva à abertura de “poros” na membrana da mitocôndria com a consequente libertação de citocromo C mitocondrial para o citosol (Danial & Korsmeyer, 2004). Este forma um complexo proteico com a *apoptotic protease-activating factor-1* (APAF-1), a procaspase-9 e desoxiadenosina trifosfato (dATP) (Rothman *et al.*, 1997) (X. Liu, Kim, Yang, Jemmerson, & Wang, 1996), o apoptosoma, ocorrendo posteriormente a ativação da Caspase 3 (Figura 20). Este mecanismo envolve um conjunto de proteínas pertencentes à família da proteína BCL-2, integrantes da estrutura de um canal proteico denominado por alguns autores, poro de permeabilidade transitório mitocondrial (PPTM). Estas moléculas interagem entre si formando dímeros cujas funções se opõem: por exemplo, enquanto os complexos BCL-2/BCL-2 desempenham um papel antiapoptótico, os complexos BCL-2/BAD, BCL-X_L/BAD e BAX/BAX possuem funções pró-apoptóticas, permitindo a abertura do poro.

A família das proteínas BCL-2 compreende uma multiplicidade de moléculas reguladoras, em que a proteína antiapoptótica BCL-2 foi a primeira a ser identificada. É codificada por um gene localizado em 18q21 e foi descoberta em células de linfoma B folicular portadoras da translocação t(14;18) (Gross, McDonnell, & Korsmeyer, 1999). A família BCL-2 inclui a maioria dos reguladores de apoptose mais importantes, como os membros antiapoptóticos, Bcl-2, Bcl-w, Bcl-X_L, Mcl-1 e A1 e os membros pró-apoptóticos, Bax, Bak, Bad, Bik, Bid, Bok, Bim, Bod, Bmf, Hrk, Nix, Noxa, PUMA e Bcl-X_s (Hinds *et al.*, 2003) (Droin, Guéry, Benikhlef, & Solary, 2013). Outras moléculas pró-apoptóticas, como as proteínas BAX e o BAK, estimulam a libertação do citocromo C da mitocôndria, através da formação de homo- e heterodímeros que criam poros ou canais na membrana para facilitar a libertação do citocromo C e outras proteínas pró-apoptóticas (Desagher *et al.*, 1999) (Hsu, Wolter, & Youle, 1997) (Schendel *et al.*, 1997) (Zha, Aimé-Sempé, Sato, & Reed, 1996) (Economopoulou *et al.*, 2008). Por outro lado, as proteínas BCL-2 e BCL-X_L inibem a apoptose bloqueando a libertação do citocromo C, através da ligação direta e sequestro do citocromo C e APAF-1, ou interagindo com as proteínas BAX ou BAK, inibindo a formação de poros (Eskes, Desagher, Antonsson, & Martinou, 2000) (Oltvai, Milliman, & Korsmeyer, 1993) (Kerbaui & Deeg, 2007).

Deste modo, as vias extrínseca e intrínseca convergem na cascata de sinalização mediada pela Caspase 3. Esta proteína estimula caspases efectoras como as Caspases 6 e 7, podendo também inibir diretamente fatores de transcrição e outras proteínas com funções na reparação do ADN.

Por outro lado, para manter o equilíbrio dos mecanismos de sinalização celular apoptóticos, existem vários reguladores negativos do processo, para além das proteínas anti-apoptóticas da família BCL-2 e das proteínas supressoras tumorais (ex. p53), sendo de salientar as proteínas da família IAP (XIAP, cIAP1, cIAP2, NAIP, ML-IAP e survivina). Estas proteínas regulam negativamente a apoptose, interferindo com a ativação da Caspase 9 e formação do apoptosoma, inibindo desta forma a atividade de caspases efectoras (Figura 20).

A proteína p53 é provavelmente a proteína pró-apoptótica mais amplamente estudada (McCubrey & Demidenko, 2012), sendo codificada por um gene onco-supressor (TP53) localizado no cromossoma 17p13.1 (Isobe, Emanuel, Givol, Oren, & Croce, n.d.). Trata-se de um fator de transcrição que, em resposta à deteção de danos no genoma, tem a capacidade de induzir determinados genes responsáveis pela apoptose, e pelo bloqueio do ciclo celular e reparação do ADN. Quando os danos são mínimos e recuperáveis, a p53 bloqueia o ciclo celular e estimula a expressão da maquinaria enzimática reparadora se os danos são extensos e irreparáveis, a proteína ativa a cascata apoptótica através da estimulação da expressão de proteínas BAX (T. Fu, Min, Xu, Chen, & Li, 2012). Assim, a sua atividade influencia diversos mecanismos biológicos à escala celular, como a transcrição genética, a síntese e reparação do ADN, o ciclo celular, a apoptose e a senescência (Bergamaschi *et al.*, 2004). As funções mais relevantes da p53 resumem-se, no entanto, ao bloqueio do ciclo celular em G1 (determinado pelo aumento da expressão de p21CIP1) e na indução da apoptose (determinada pelo aumento da expressão de BAX, BAK e PIG-3) (Bergamaschi *et al.*, 2004). Pode ser regulada negativamente por uma proteína inibidora, a iASPP (inhibitory member of the apoptosis-stimulating proteins of the p53 family) (Bergamaschi *et al.*, 2004), e pelas proteínas Mdm2 (murine double minute 2) e MdmX ou Mdm4 (double minute 4 protein), responsáveis pela seletividade da p53 pelas sequências de ADN dos genes alvo. Devido às propriedades fisiológicas relevantes do gene p53, este foi considerado o guardião do genoma, tendo uma importância fulcral na carcinogénese humana (T. Fu *et al.*, 2012).

Num organismo adulto, a apoptose é responsável pela manutenção de um número de células constante durante a renovação celular de tecidos, promovendo a homeostasia tecidular. No caso do sistema hematopoiético, cerca de 5×10^{11} precursores de células sanguíneas são diariamente eliminadas por apoptose, compensando deste modo a produção contínua das mesmas na medula óssea (Cooper G. M. & Hausman R. E., 2006).

Devido ao papel crucial na manutenção da homeostase tecidual, a evasão à apoptose é uma das características das neoplasias humanas. A regulação apropriada da apoptose pode ser relevante especialmente em compartimentos celulares com elevado turnover celular como o sistema hematopoiético, pelo que alterações na apoptose têm sido implicadas numa variedade de patologias, incluindo a mielodisplasia. Além disso, a diminuição da apoptose, associada à transformação maligna, pode resultar no desenvolvimento de leucemias ou linfomas. De facto, mutações oncogénicas que bloqueiem a apoptose podem promover a iniciação e progressão tumoral criando um ambiente permissivo à instabilidade genética e acumulação de mutações. Por outro lado, através da resistência à destruição pelo sistema imune, podem facilitar a sobrevivência independente de fatores de crescimento, assim como, o crescimento independente da ancoragem durante a metastização (Fulda, 2009), além de influenciar a resposta à terapêutica.

A evidência de alterações na apoptose intramedular nos estádios iniciais da SMD foi sugerida pelo exame morfológico do aspirado medular, imunocitoquímica, citometria de fluxo e deteção molecular de proteínas ativadas relacionadas com a apoptose (J E Parker & Mufti, 2000). O aumento da apoptose nos progenitores medulares enquadra-se na clínica dos estádios iniciais da SMD, que cursam com citopenias periféricas e medula hiperclonal. Do mesmo modo, a diminuição da apoptose pode explicar a progressão da doença com acumulação de células progenitoras imaturas e/ou resistentes à apoptose.

Apesar de Raza A. e colaboradores (1995) (Raza *et al.*, 1995) terem sido os primeiros a demonstrar o aumento de apoptose em doentes em estádios iniciais de SMD, outros grupos comprovaram este efeito em células de medula de doentes em relação a indivíduos saudáveis (E Hellström-Lindberg, Kanter-Lewensohn, & Ost, 1997) (Lepelley *et al.*, 1996), o que poderá estar relacionado com o aumento de FAS verificado em vários estudos (Gersuk *et al.*, 1998) (Kitagawa *et al.*, 1998) (Bouscary *et al.*, 1997). Além disso, Li H. e colaboradores (2004) (Li, Bryant, & Deeg, 2004) utilizando a técnica de *Fluorescence in situ hybridization* (FISH) com um marcador clonal adequado, mostraram que a apoptose ocorria predominantemente, mas não exclusivamente, nas células não clonais. Por outro lado, Rajapaksa R. e a sua equipa (1996) (Rajapaksa, Ginzton, Rott, & Greenberg, 1996) observaram que a proporção de células CD34+ que apresentava um pico sub-G1 (apoptótico) estava aumentada em comparação ao observado na medula de controlos ou de doentes com LMA. Verificaram ainda que a razão c-MYB/BCL-2 é superior nas amostras de SMD em estádios iniciais e inferior nas amostras de SMD avançadas ou de LMA. Também foi demonstrado que a razão BAX/BCL-2 está aumentada nos estádios iniciais da SMD (E Hellström-Lindberg *et al.*, 1997) (J E Parker & Mufti, 2000).

Esta observação suporta a hipótese de que o balanço relativo entre sinais de morte e sobrevivência celular possa estar associado ao aumento da apoptose observado nos progenitores de doentes com SMD. Os estudos de citometria de fluxo revelaram que a proporção de células CD34+ na fase G1 é maior nos estádios mais precoces da SMD. No entanto, é ainda controverso se a apoptose é restrita aos progenitores CD34+ ou se também abrange as células maduras.

Várias das alterações genéticas do clone SMD conduzem ao aumento intrínseco na suscetibilidade do clone à apoptose. De facto, além do referido, existem vários mecanismos que procuram explicar o aumento da apoptose nesta doença. No entanto, apesar do clone SMD poder ter capacidade apoptótica intrínseca, por alteração da expressão e função dos genes, existe pouca relação entre as anomalias citogenéticas observadas na SMD e a apoptose, sugerindo que este fenómeno não é restrito ao clone SMD. Por outro lado, este clone também é reconhecido pelo sistema imune, o que, em alguns casos, promove a proliferação clonal da célula T com libertação de várias citocinas inibitórias, incluindo o TNF- α e o FAS-L. Estas citocinas induzem a apoptose do clone SMD e das células hematopoiéticas normais.

Deste modo, a suscetibilidade à apoptose intrínseca e imune é a marca da patogénese inicial da SMD, o que explica as citopenias periféricas, apesar de uma medula hiperclular. O aumento da expressão do FAS-L nas células da medula, assim como as anomalias do ciclo celular e mitocondriais, podem ser mecanismos potenciais que contribuem para a apoptose. No entanto, apesar das anomalias da apoptose serem uma característica central da SMD, ainda não estão totalmente esclarecidos os mecanismos celulares e moleculares envolvidos neste tipo de morte celular nos doentes com SMD.

1.4.6. Desregulação do sistema imune e ambiente medular

Embora controverso, existe uma evidência crescente de que alterações no microambiente medular e do sistema imune podem afetar a hematopoiese normal na SMD.

De facto, em doentes com SMD tem-se observado aumento de incidência de doenças autoimunes. Esta estreita relação entre SMD e autoimunidade tem estimulado a investigação do papel do sistema imune na SMD (Saif, Hopkins, & Gore, 2002). Tem sido demonstrado que os linfócitos T citotóxicos exercem efeitos inibitórios na mielopoiese *in vitro*. Para além disso, algumas características da SMD sobrepõem-se às da anemia aplástica e da leucemia dos linfócitos grandes granulares, duas entidades provavelmente relacionadas com linfócitos T autoreactivos (Kanchan & Loughran, 2003) (Barrett, Sauntharajah, & Molldrem, 2000) (Barrett, 2000).

Os ensaios clínicos mostram que a globulina antitimócito (ATG) e a ciclosporina têm atividade no tratamento de grupos de doentes com SMD selecionados (Killick *et al.*, 2003) (Molldrem *et al.*, 2002) (Jonásova *et al.*, 1998). Estudos mais recentes avaliaram a eficácia do tratamento com imunossupressão e com anti-TNF, uma vez que os níveis de ácido ribonucleico mensageiro (ARNm) e da proteína TNF α estão elevados em amostras de sangue periférico e medula de doentes com SMD (Deeg *et al.*, 2004) (Rosenfeld & Bedell, 2002) (Molnár, Berki, Hussain, Németh, & Losonczy, 2000). As respostas ao tratamento com ATG estão associadas ao desaparecimento dos clones de linfócitos T com clonalidade V beta envolvidas na supressão da hematopoiese *ex vivo* (Kochenderfer, Kobayashi, Wieder, Su, & Molldrem, 2002). Por outro lado, os fatores preditivos de resposta à terapêutica imunossupressora incluem idade jovem, presença de clone de hemoglobinúria paroxística noturna, expressão de HLA-DR15, hipocelularidade e cariótipo normal (Sauntharajah *et al.*, 2002).

No entanto, o mecanismo subjacente à autoimunidade na SMD permanece por esclarecer. A hipótese de que os linfócitos T reagem especificamente contra os antígenos nos progenitores clonais da SMD permanece por confirmar. Igualmente, não está claro por que alguns doentes respondem à imunossupressão e outros não.

Além de células do sistema imune (incluindo os macrófagos), o microambiente medular é constituído por fibroblastos, adipócitos, células endoteliais e por uma matriz proteica que constitui o estroma de suporte medular. Embora controverso, existe uma evidência crescente que alterações no estroma de suporte podem afetar a hematopoiese normal, podendo estar implicadas na SMD.

A observação do aumento da apoptose medular em doentes com SMD em estádios iniciais, já referida, colocou a hipótese de que o meio ambiente medular poderia constituir um mediador na fisiopatologia da SMD. De facto, tem sido evidenciado em amostras de medula e soro de doentes, deficiência relativa ou aumento da produção de várias citocinas, incluindo IL-1 β , IL-6, IL-8, *stem cell factor*, eritropoietina, TGF- β , fator estimulador das colónias de granulócitos e monócitos (GM-CSF) e TNF- α , (Fontenay-Roupie *et al.*, 1999) (Calado, 2011). O aumento do TNF- α tem sido consistentemente associado a uma elevada expressão de FAS nas células CD34+. Este fator pode ser produzido pelos macrófagos e, também, pelos linfócitos medulares.

Por outro lado, a angiogénese tem um papel importante no crescimento tumoral e na metastização (Folkman, 1995). O aumento da densidade microvascular foi demonstrado na medula de doentes com doenças hematológicas, incluindo SMD (Michael G Alexandrakis *et al.*, 2004) (Padró *et al.*, 2000). A neovascularização é mediada por uma variedade de moléculas angiogénicas libertadas pelas células tumorais e células normais do hospedeiro. O aumento

anormal de algumas citocinas angiogénicas e fatores de crescimento, tais como fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF), *Basic fibroblast growth factor*, angiogenina, TNF- α e TGF- β , em amostras de LMA foi reportado por Albitar M. (2001) (Albitar, 2001), Alexandrakis M. G. (2005) (M G Alexandrakis *et al.*, n.d.) e Faderl S. (2004) (Faderl & Kantarjian, 2004). O recetor solúvel do VEGF foi indicado como fator prognóstico em doentes com LMA e SMD (Hu *et al.*, 2004).

1.5. Características clínicas

Existe uma variabilidade clínica significativa que reflete a diversidade e complexidade dos defeitos genéticos subjacentes e que depende, também, do tipo e gravidade das citopenias periféricas.

Cerca de 20% doentes com SMD primária são inicialmente assintomáticos, e o diagnóstico é efetuado após um hemograma de rotina. A maioria dos doentes apresenta clínica de insuficiência medular. Predominam os sinais e sintomas de anemia (80%), como a astenia e a intolerância ao exercício. Menos frequentemente, a clínica inicial pode ser de natureza infecciosa ou hemorrágica (20%), caracterizada por infeções bacterianas recorrentes (sobretudo pneumonias bacterianas e infeções cutâneas, em doentes com neutropenia inferior a 1,0 G/L) ou equimoses fáceis ou espontâneas. Raramente apresentam febre não relacionada com a infeção. Outros doentes apresentam sintomas sistémicos ou aspetos característicos de autoimunidade, como artralguas. Esta situação pode ser devida à associação existente entre SMD e algumas doenças raras de base imunológica, como a dermatose neutrofílica aguda (Síndrome de Sweet), o pioderma gangrenoso, a vasculite cutânea e a policondrite recidivante. Os doentes com citopenias graves, elevada percentagem de blastos, ou alterações citogenéticas apresentam um quadro clínico muito semelhante ao da LMA. Por outro lado, os doentes que não exibem nenhum destes aspetos laboratoriais podem ter uma sobrevivência longa.

O exame objetivo, tal como a clínica, não são específicos desta patologia. O exame físico pode revelar palidez, edemas periféricos e, se a anemia é grave, evidência de insuficiência cardíaca. Se a trombocitopenia for inferior a 20 G/L, os doentes podem apresentar petéquias nos membros inferiores ou na mucosa jugal, assim como equimoses, ou mesmo hemorragias potencialmente fatais. As adenopatias, hepatomegália (5%) e esplenomegália (10%) raramente fazem parte do quadro clínico clássico. A esplenomegália ocorre especialmente em doentes com leucemia mielomonocítica crónica.

1.6. Características laboratoriais

O hemograma revela uma ou mais citopenias (20% bicitopenia e 30-50% pancitopenia), mais frequentemente anemia macrocítica sem reticulocitose. A leucopenia com neutropenia e/ou a trombocitopenia podem ser evidenciadas inicialmente ou ocorrer mais tarde durante a evolução da doença. Pode ocorrer trombocitose na anemia refractária, na Síndrome 5q- e na anemia refractária com sideroblastos em anel. A monocitose absoluta superior a 1,0 G/L é característica da LMMC. O esfregaço de sangue periférico revela alterações morfológicas, como hipogranulação dos neutrófilos com núcleos hiposegmentados (pseudo Pelger-Huët), macrocitose e plaquetas gigantes, e/ou presença de células imaturas da série eritroide e mielóide (Figura 21).

O aspirado medular é típico, normalmente consiste numa medula hiper celular com displasia em >10% de uma linha celular; megacariócitos atípicos (micromegacariócitos mono ou bilobados), hiperplasia eritroide com assincronismo maturativo, alterações de maturação na linha mielóide e aumento dos blastos ou sideroblastos em anel (em alguns doentes). No entanto, em 15 a 20% dos doentes a medula é hipocelular, semelhante à anemia aplástica.

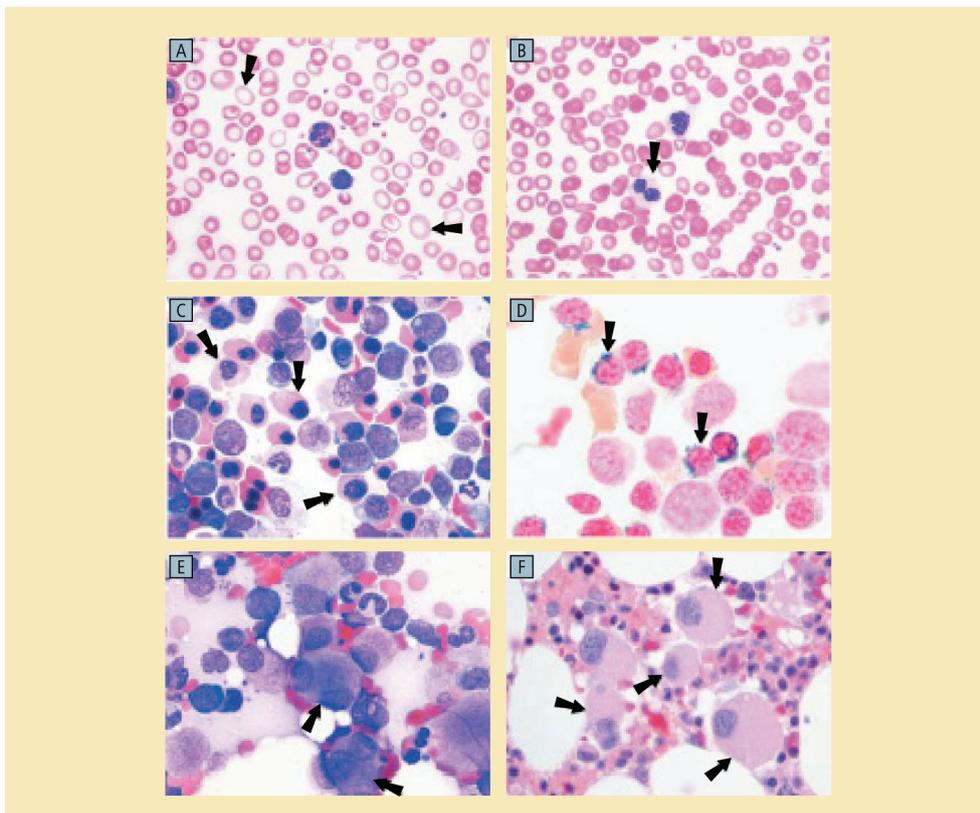


FIGURA 21

Características morfológicas do sangue periférico e medula óssea na SMD:

- A) dismorfia e anisocitose eritrocitária;
- B) células pseudo-Pelger-Huët;
- C) deseritropoiese medular;
- D) sideroblastos em anel;
- E) pequenos megacariócitos displásicos;
- F) megacariócitos de tamanho médio com núcleos hipobulbados.

(Adaptado de Tefferi A., 2009).

As alterações cromossômicas clonais são detetadas pelo cariótipo convencional em 40-70% dos casos de SMD *de novo* e em 95% dos casos de SMD secundária a terapêutica. Neste último grupo, 90% correspondem a deleção parcial ou completa dos cromossomas 5 e/ou 7 e a cariótipos complexos. Não existem alterações citogenéticas específicas da SMD ou de um subtipo morfológico, exceto a Síndrome 5q-.

A biópsia óssea nem sempre é necessária para estabelecer o diagnóstico de SMD, particularmente se o doente é muito idoso e debilitado, e se as opções terapêuticas são limitadas. No entanto, esta amostra pode fornecer informação valiosa para o diagnóstico e prognóstico, tais como a hiperplasia, a displasia, particularmente megacariocítica, as alterações na arquitetura medular (por exemplo a presença de precursores imaturos em localização anormal - ALIPs), a invasão por blastos e a fibrose. Os ALIPs são grupos de mieloblastos e promielócitos com localização intertrabecular anormal, devido à produção autócrina do fator de crescimento do endotélio vascular. Possibilita, por outro lado, a exclusão de outras doenças que podem mimetizar a SMD, em particular a leucemia de *hairy cells*, linfoma ou metástase.

A detecção de células CD34+ por citometria de fluxo no aspirado medular, ou por imunocitoquímica em amostras de tecido ósseo poderá ser importante uma vez que parte dos blastos são CD34+.

Os parâmetros bioquímicos não apresentam alterações, à exceção da lactato desidrogenase (LDH) e da β 2-microglobulina (β 2M). A LDH pode estar aumentada devido à elevada taxa de proliferação e/ou apoptose medular. A β 2-microglobulina foi identificada como fator de prognóstico independente para a SG e para a transformação em LMA, em doentes com SMD de alto risco (IPSS) (Gatto *et al.*, 2003) (Neumann, Gattermann, Barthelmes, Haas, & Germing, 2009).

1.7. Diagnóstico, classificação e prognóstico

Para o diagnóstico da SMD é essencial o exame da medula óssea (aspirado, biópsia, citogenética) e do sangue periférico, os quais revelam as características morfológicas da doença e excluem outras situações que cursam com citopenias.

Nos últimos 25 anos, foram propostos vários critérios de diagnóstico para SMD, sendo de salientar os sistemas de classificação FAB (1982) e da Organização Mundial de Saúde (OMS) (2001 e 2008). Além disso têm sido utilizados vários sistemas de *score* prognóstico, sendo o mais conhecido e utilizado o IPSS.

Recentemente, o *National Comprehensive Cancer Network* (NCCN) recomendou que a avaliação inicial mínima para doentes com suspeita clínica de SMD deve incluir a história clínica e o exame objetivo, hemograma completo com leucograma e contagem de reticulócitos, aspirado medular e biópsia óssea com coloração para o ferro, níveis de eritropoietina, estudo do metabolismo do ferro e avaliação das alterações citogenéticas.

O sangue periférico e a medula devem ser criteriosamente analisados, após realização de esfregaços, para constatação da displasia, da percentagem de blastos, monócitos e sideroblastos em anel. Os blastos podem incluir mieloblastos, monoblastos e megacarioblastos. No entanto é de salientar que a má qualidade da amostra é por vezes um obstáculo a um diagnóstico correto.

A deteção de células CD34+ por citometria de fluxo ou por imunocitoquímica pode fornecer informação diagnóstica e prognóstica. Os estudos por citometria de fluxo multiparamétrica podem também evidenciar maturação anómala da linhagem mielóide (Nimer, 2008a).

Para se considerar que uma linhagem celular é displásica é necessário que pelo menos 10% das células apresentem displasia. Além disso, a presença de uma alteração citogenética clonal em doentes com evidência clínica e morfológica de displasia reforça o diagnóstico de SMD. No entanto, as alterações citogenéticas estão presentes em cerca de 40 a 60% dos casos de SMD, e em menor percentagem nos subtipos de baixo risco (Tefferi & Vardiman, 2009).

Durante muitos anos, o sistema FAB foi a classificação utilizada para SMD. De acordo com este sistema de classificação a SMD está dividida em cinco subtipos: AR, ARSA, AREB, anemia refractária com excesso de blastos em transformação (AREB-t) e LMMC.

Em 2001, a OMS propôs uma nova classificação, em que os subtipos se correlacionam melhor com o prognóstico, resposta ao tratamento e progressão para leucemia do que os da classificação FAB. Os subtipos incluem a anemia refractária com displasia multilinear (ARDM), a separação da AREB em duas categorias com base na percentagem de blastos, uma inferior a 10% e outra superior ou igual a 10%, a Síndrome 5q-, e a SMD não classificada (com e sem sideroblastos em anel). Esta classificação foi revista em 2008 pela OMS, dando origem a novos subtipos como representado nas tabelas 6 e 7.

Como mencionado, o IPSS é um sistema de avaliação do prognóstico dos doentes com SMD classificados segundo os critérios da OMS. Baseia-se na percentagem de blastos na medula, no padrão citogenético e no número de citopenias sendo útil para avaliação da sobrevivência e do risco de evolução para leucemia aguda, facilitando, deste modo, a decisão clínica (Tabela 8).

TABELA 6

Classificação da OMS das neoplasias mielodisplásicas/mieloproliferativas	Patologia	Sangue Periférico	Medula Óssea
Leucemia mielomonocítica crônica		- Monocitose > 1x10 ⁹ G/L - Ausência de gene de fusão BCR-ABL 1 - < 20% blastos	- Displasia em 1 ou mais linhagem mielóide* - <20% blastos (mieloblastos, monoblastos e promonócitos) - Sem rearranjo PDGFRA ou PDGFRB
Leucemia mielóide crônica atípica BCR-ABL 1 negativa		- Leucocitose, Neutrofilia. - Displasia neutrofilica - Precusores dos neutrófilos ≥10% - Blastos < 20% - Ausência de gene de fusão BCR-ABL 1 - Sem rearranjo PDGFRA ou PDGFRB - Basofilia mínima - Monócitos < 10 %	- Displasia dos neutrófilos ± displasia das outras linhagens - <20% blastos
Leucemia mielomonocítica juvenil		- Monocitose > 1x10 ⁹ G/L - < 20% blastos - Leucócitos frequentemente > 10x10 ⁹ G/L	- <20% blastos (mieloblastos, monoblastos e promonócitos)
Neoplasia Mielodisplásica/Mieloproliferativa não classificável		- Características mistas SMD/SMP - Sem diagnóstico prévio de SMD/SMP - Sem história recente de fator de crescimento ou citotóxico - Ausência de gene de fusão BCR-ABL 1 - Sem rearranjo PDGFRA ou PDGFRB	- Características mistas SMD/SMP - <20% blastos
Anemia** refratária com sideroblastos em anel e trombocitose marcada (ARSA-T) (entidade provisória)		- Trombocitose persistente >450x10 ⁹ G/L - Anemia - BCR-ABL 1 negativa - Exclusão de casos com t(3;3)(q21;q26), inv(3)(q21q26) e del(5q) isolada	- Características morfológicas de ARSA - ≥15% dos precursores eritróides são sideroblastos em anel - Megacariócitos anormais semelhantes aos observados nos SMP BCR-ABL 1 negativo

* LMCM pode ser diagnosticada mesmo se a displasia é mínima ou ausente se os outros requisitos são preenchidos e existir uma alteração citogenética ou molecular clonal adquirida nas células hematopoiéticas, ou monocitose persistente durante 3 meses, com exclusão das outras causas de monocitose.

(Adaptado de Swerdlow S. H., 2008)

** Na classificação WHO de 2008 o *cut-off* das plaquetas é 450x10⁹ G/L em vez de 600x10⁹ G/L (classificação WHO 2002) para o diagnóstico de trombocitemia essencial. Cerca de 50% das ARSA-T apresentam a mutação JAK2, mas esta não é um critério de diagnóstico

TABELA 7

Classificação da OMS das SMD	Patologia	Sangue Periférico	Medula Óssea
Citopenias Refratárias com displasia unilinear: - anemia refratária - neutropenia refratária - trombocitopenia refratária		- Uni ou 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		- Anemia - Ausência de blastos	- Somente displasia eritróide - ≥15% dos precursores eritróides são sideroblastos em anel - <5% blastos
Citopenia refratária com displasia multilinear		- Citopenia(s) - Blastos raros ou ausentes (<1%) - Ausência de bastonetes de Auer - Monócitos <1x10 ⁹ G/L	- Displasia em ≥10% das células de 2 ou mais linhagens mielóides - <5% blastos - Ausência de bastonetes de Auer - ± 15% sideroblastos em anel
Anemia refratária com excesso de blasto -1		- Citopenia(s) - <5% blastos - Ausência de bastonetes de Auer - Monócitos <1x10 ⁹ G/L	- Displasia uni ou multilinear - 5-9% blastos - Ausência de bastonetes de Auer
Anemia refratária com excesso de blastos- 2		- Citopenia(s) - 5-19% blastos - Bastonetes de Auer ± - Monócitos <1x10 ⁹ G/L	- Displasia uni ou multilinear - 10-19% blastos - Bastonetes de Auer ±
SMD não classificável		- Citopenia(s) - <1% blastos	- Displasia inequívoca em <10% das células de uma ou mais linhagens mielóides - <5% blastos
SMD com del(5q) isolada		- Anemia - Plaquetas normais ou aumentadas - Bastonetes de Auer ± - Blastos raros ou ausentes (<1%)	- Megacariócitos normais ou aumentados com núcleos hipolobados - <5% blastos - del(5q) isolada - Ausência de bastonetes de Auer

(Adaptado de Swerdlow S. H., 2008)

TABELA 8

	0	0,5	1,0	1,5	2,0
% blastos medula	<5	5-10	-	11-20	21-30
Cariótipo	Bom	Intermédio	Mau	-	-
Citopenias	0/1	2/3	-	-	-
Grupo de risco	Pontuação	Sobrevivência mediana (anos)	Tempo até transformação em LMA (para 25%, em anos)		
Baixo risco	0	5,7	9,4		
INT-1	0,5 - 1,0	3,5	3,3		
INT-2	1,5 - 2,0	1,2	1,1		
Alto Risco	> 2,5	0,4	0,2		

Sistema de Score prognóstico Internacional (IPSS) para SMD

- não aplicável; Bom – normal, -y, del(5q), del(20q); mau – complexo (≥ 3 anomalias) ou anomalias do cromossoma 7; intermédio – qualquer outra anomalia. (Adaptado de Greenberg, P. et al., 1997)

No entanto, este índice apresenta várias limitações: valoriza mais a percentagem de blastos do que a citogenética; baseia-se em doentes não tratados, com diagnóstico de novo de SMD e exclui os subtipos SMD-t e LMMC com leucócitos > 12G/L. Este aspeto também se aplica ao WPSS (Tabela 9), outro score proposto por Malcovati e colaboradores (2007) que inclui a classificação da OMS, embora este seja um índice dinâmico, uma vez que inclui a dependência transfusional como uma variável independente de mau prognóstico.

Na prática clínica, dividimos os doentes em SMD de baixo e alto risco, segundo o IPSS, em que baixo risco inclui o baixo e int-1, e alto risco inclui as categorias de int-2 e alto. Esta separação é prática porque reflete as diferentes estratégias terapêuticas nestes 2 grupos.

Greenberg e seus colaboradores propuseram em 2012 o IPSS-R baseado num estudo multicêntrico internacional. Baseia-se em 5 subgrupos citogenéticos em vez de 3, resultando em 5 grupos de risco de diferente prognóstico (Tabela 10).

Também a fibrose medular grau 2 e 3 está associada a mau prognóstico (Matteo Giovanni Della Porta & Malcovati, 2011) (B. Fu et al., 2014).

TABELA 9

Score	0	1	2	3
Variável				
Subtipo OMS	AR, ARSA, del(5q)	CRDM	AREB-1	AREB-2
Cariótipo	Bom	Intermédio	Mau	-
Necessidade Transfusional	Não	Regular	-	-
Grupo de risco WPSS	0 (muito baixo)			
	1 (baixo)			
	2 (intermédio)			
	3-4 (alto)			
	5-6 (muito alto)			

WPSS (WHO classification-based prognostic scoring system) para SMD

AR - anemia refratária; ARSA - anemia refratária com sideroblastos em anel; CRDM - citopenia refratária com displasia multinha; AREB - anemia refratária com excesso de blastos; OMS - Organização Mundial de Saúde.

(Adaptado de Malcovati L., 2007)

TABELA 10

IPSS-R Grupos e pontuação de prognóstico		Subgrupos de Prognóstico (%)		Alterações Citogenéticas				
Muito bom	4%	-Y; del(11q)						
Bom	72%	normal; del(5q); del(12P); del(20q); dupla incluindo del(5q)						
Intermédio	13%	del(7q); +8; +19; i(17q); qualquer destas alterações simples ou dupla em clones independentes						
Mau	4%	-7; inv(3)/t(3q)/del(3q); dupla incluindo -7/del(7q); complexas: 3 alterações						
Muito mau	7%	Complexas: >3 alterações						
Variáveis Prognósticas		Pontuação						
		0	0,5	1	1,5	2	4	5
Citogenética	Muito boa	–	–	Boa	–	Intermédia	Má	Muito má
Blastos na MO, %	≤2%	–	–	>2%-<5%	–	5%-10%	>10%	–
Hemoglobina	≥10	–	–	8-<10	<8	–	–	–
Plaquetas	≥100	50-<100	<50	–	–	–	–	–
Neutrófilos, contagem absoluta	≥0,8	<0,8	–	–	–	–	–	–
Grupo de Risco	Pontuação	Doentes (%)		Sobrevivência (mediana, anos)		Transformação em LMA (25% dos doentes; IC95%)		
Muito Baixo	≤1,5	19		8,8		NR (14,4 - NR)		
Baixo	>1,5-3	38		5,3		10,8 (9,2 - NR)		
Intermédio	>3-4,5	20		3		3,2 (2,8 - 4,4)		
Alto	>4,5-6	13		1,6		1,4 (1,1 - 1,7)		
Muito Alto	>6	10		0,8		0,73 (0,7 - 0,9)		

(Adaptado de Greenberg, P.L. et al., 2012)

A importância prognóstica da comorbidade foi avaliada por Della Porta e colaboradores (2011) (Matteo G Della Porta *et al.*, 2014), levando ao desenvolvimento de um índice de comorbidade para SMD dependente do tempo (MDS-CI). A patologia cardíaca, hepática, renal, pulmonar e os tumores sólidos influenciam de forma independente o risco de morte não relacionada com evolução leucémica.

As mutações pontuais nos genes TP53, EZH2, ETV6, RUNX1, NRAS e ASXL1 (Rausch *et al.*, 2012) (Rafael Bejar *et al.*, 2011) (Patel *et al.*, 2012) têm sido associados a mau prognóstico em várias publicações. As mutações no spliceossoma em SRSF2 (Thol *et al.*, 2012) e U2AF1 foram também associadas a mau prognóstico, enquanto as mutações SF3B1 parecem estar associadas a uma maior sobrevivência (Visconte *et al.*, 2012). A relevância clínica do padrão mutacional do MDS ainda está por esclarecer e, atualmente, a triagem mutacional não é recomendada como prática clínica diária.

1.8. Tratamento

Na tabela 11 estão inumeradas as várias opções terapêuticas atualmente disponíveis para a SMD, de acordo com a idade, *performance status* e comorbilidades do doente, para além do subtipo de SMD e IPSS associado.

TABELA 11

Tratamento de doentes com SMD

"Best supportive care": transfusões, antibióticos
Fatores de crescimento hematopoiético: eritropoietina, darbopoietina, G-CSF
Terapêutica transcricional modificadora: <ul style="list-style-type: none"> - Agentes hipometilantes: 5-azacitidina*, decitabina* - Inibidores das deacetilases das histonas**
Agentes imunomoduladores: lenalidomida*, ATG, CsA, talidomida
Quimioterapia de baixa dose (citarabina em baixa dose)
Quimioterapia intensiva (LMA-like) (7 dias de citarabina + 3 dias de antraciclina)
Transplante alogênico de medula ou de PBPC

* aprovado pela FDA-Food and Drug Administration para o tratamento de SMD.

(Adaptado de Nimer S. D., 2008)

** disponível somente em ensaios clínicos.

G-CSF – fator estimulador de colônias de granulócitos; CsA – Ciclosporina A; PBPC – células hematopoiéticas pluripotenciais periféricas.

Sendo a maioria dos doentes idosos, o tratamento de suporte é o tratamento de escolha para muitos doentes. O objetivo é manter a qualidade de vida do doente. Frequentemente, são necessárias transfusões de concentrados eritrocitários para a anemia sintomática, promovendo sobrecarga de ferro, e administração de antibióticos para infecções bacterianas. Os doentes com necessidade de transfusões frequentes devem iniciar quelantes do ferro após 20 unidades de concentrados eritrocitários ou quando os níveis de ferritina são superiores a 1000 ng/ml. Tradicionalmente tem sido utilizada a desferroxamina por via subcutânea ou endovenosa. Recentemente, foi aprovado o deferasirox para sobrecarga de ferro associada a transfusões, na dose de 20 mg/Kg/d por via oral, sendo necessária a monitorização da função hepática e renal.

As transfusões de plaquetas estão reservadas para doentes com hemorragias ativas ou graves e/ou com trombocitopenia grave.

Os fatores de crescimento são benéficos em determinados doentes com SMD. A administração de eritropoietina corrige a anemia em cerca de 20 a 40% dos doentes, sobretudo aqueles que são transfusão-independentes e com eritropoietina inferior a 200 U/L. O uso de fator estimulador de colônias de granulócitos (G-CSF) por via subcutânea associado à eritropoietina pode aumentar as hipóteses de resposta eritroide (Sekeres, 2009).

Para o tratamento da SMD de alto risco está indicado o uso de azacitidina. É um fármaco hipometilante que pode reativar genes supressores tumorais ou reguladores do ciclo celular que se encontram inativos no clone SMD por metilação de regiões reguladoras dos genes. Além disso, a azacitidina também apresenta atividade citotóxica. Num estudo controlado randomizado este fármaco foi utilizado na dose de 75 mg/m²/d, SC, durante 7 dias cada 28 dias, e comparado com o tratamento de suporte em doentes com anemia dependente de transfusões e citopenias periféricas graves. Em 60% dos doentes tratados com azacitidina verificou-se melhoria clínica (redução de 50% das necessidades transfusionais), enquanto esta apenas se observou em 5% dos doentes que receberam terapêutica de suporte após 4 meses.

Além disso, 7% dos doentes tratados com azacitidina atingiram resposta completa e o risco de transformação leucémica ou morte reduziu significativamente.

A decitabina, outro agente hipometilante, é administrada na dose de 15 mg/m²/d, ev, durante 3 dias, a cada 6 semanas. Induz 20% de respostas em doentes com SMD, mas pode causar mielossupressão grave e tardia. Por esse motivo, o seu uso está a ser avaliado em estádios avançados de SMD (Sekeres, 2009).

Outro fármaco estudado no tratamento da SMD é a talidomida, um imunomodulador e antiangiogénico. Este fármaco suprime a produção de citocinas pró-apoptóticas e melhora a anemia em cerca de 20% dos doentes. No entanto, é pouco tolerada pelos idosos porque causa fadiga, sedação, obstipação, retenção hídrica, tonturas e neuropatia periférica (Oh & Gotlib, 2008).

A lenalidomida é um composto semelhante à talidomida, mas sem neurotoxicidade. Foi aprovada pela FDA para o tratamento de doentes com SMD com a alteração citogenética 5q-. Um estudo de fase II utilizando lenalidomida na dose 10 mg/d, durante 21 ou 28 dias, em doentes dependentes de transfusão, baixo risco ou intermédio com 5q-, mostrou que 67% dos doentes ficaram independentes de transfusões e que 74% dos doentes evidenciaram respostas citogenéticas (44% de resposta completas). Estes resultados mantiveram-se estáveis com a administração crónica do fármaco (Ortega & List, 2007).

Outra abordagem terapêutica, utilizada também na anemia aplástica, é a globulina antitímocito, que induz resposta em cerca de um terço dos doentes com o subtipo AR, traduzida sobretudo por independência transfusional.

Por último, os esquemas de quimioterapia utilizados na LMA, permitem atingir remissões completas em 40 a 60% de doentes SMD selecionados; nos idosos o risco de mortalidade relacionada com o tratamento é superior e as remissões são curtas. Por outro lado, os doentes com risco elevado de transformação leucémica devem ser considerados para transplante alogénico, uma vez que a quimioterapia não é curativa na SMD. Embora o transplante alogénico seja a única terapêutica curativa, a maior parte dos doentes não são elegíveis para este procedimento devido à idade avançada. A taxa de recidiva após transplante é mais elevada na AREB e AREB-t (50-70%) do que na AR e ARSA (<5%). Assim, o transplante com condicionamento não mieloablativo pode ser uma potencial abordagem terapêutica destes doentes (Sekeres, 2009).

Em Portugal, no âmbito do Grupo Português de Mielodisplasia as recomendações para tratamento são as apresentadas na figura 22.

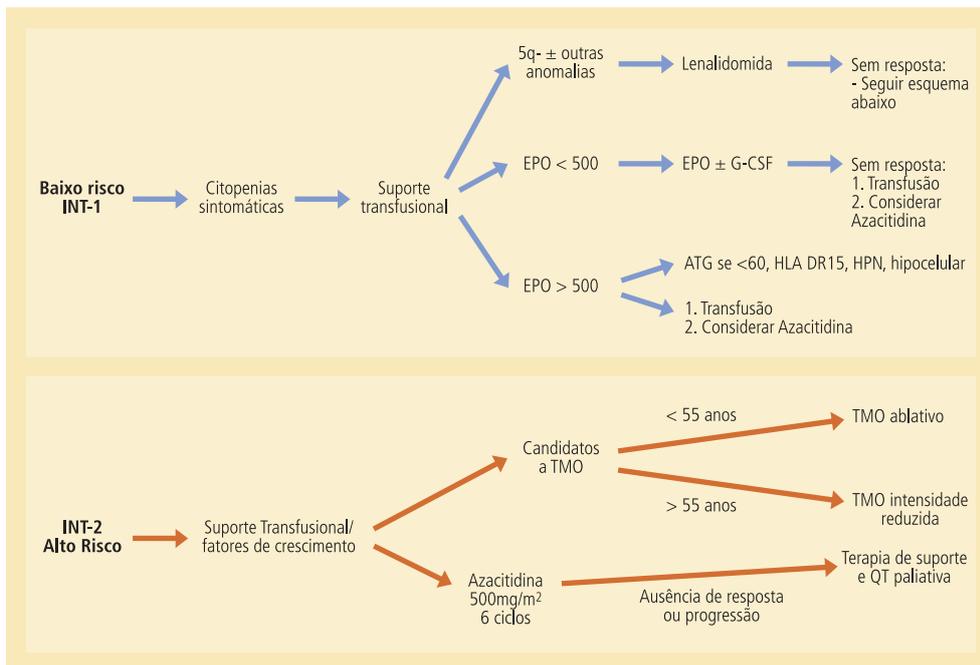


FIGURA 22

Algoritmo de tratamento na SMD, pelo GPM.

1.9. Prognóstico e Evolução

Em muitos doentes, a doença mantém-se por vários anos sem progressão da anemia ou dos sintomas. Uma pequena proporção de doentes desenvolve insuficiência medular progressiva, citopenias graves, e morbidade devido a infeções e hemorragias. A sobrecarga de ferro é comum, e alguns doentes podem desenvolver hemossiderose. A frequência do HLA-A3 é significativamente mais elevada nos doentes que desenvolvem sobrecarga de ferro, do que na população em geral. No entanto, a frequência é comparável à encontrada na hemocromatose hereditária, sugerindo que a combinação de uma predisposição genética com anemia sideroblástica facilita a expressão da sobrecarga de ferro nestes doentes. Pode ocorrer melhoria da anemia e dos efeitos adversos de sobrecarga de ferro nos tecidos, após terapêutica quelante (Badawi, Vickars, Chase, & Leitch, 2010).

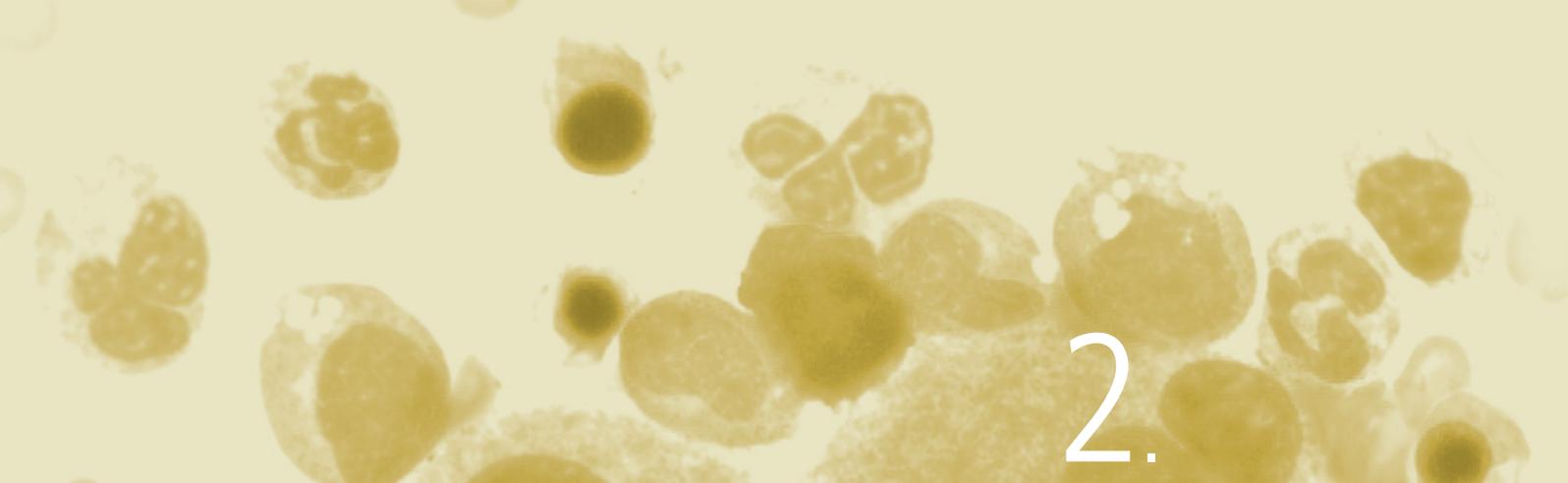
As variáveis mais importantes associadas com a sobrevivência e o risco de evolução para LMA são a percentagem de blastos e as alterações citogenéticas. O número de citopenias periféricas é de importância prognóstica secundária. O IPSS permite uma estimativa do curso clínico utilizando estes parâmetros, como mencionado (Tabela 8).

Apesar da utilidade destes sistemas de pontuação na prática clínica, o resultado varia consideravelmente entre doentes com SMD com pontuações

idênticas (Valent *et al.*, 2007). Embora as alterações citogenéticas na SMD sejam consideradas os fatores de prognóstico independentes mais importantes, o valor prognóstico é limitado pela diversidade citogenética inerente a estas doenças (Haase *et al.*, 2007). A utilização de parâmetros adicionais seria útil para melhorar o poder prognóstico da IPSS.

Em 2005 Germing *et al.* (U Germing *et al.*, 2005) mostraram que a inclusão da lactato desidrogenase (LDH) como parâmetro de prognóstico melhora o IPSS. De igual forma, os níveis séricos de β 2-microglobulina (B2M) ao diagnóstico, em doentes com SMD, correlacionam-se com a sobrevivência global e com o risco de evolução para LMA, especialmente na SMD de alto risco (Neumann *et al.*, 2009) (Gatto *et al.*, 2003) (Tsimberidou *et al.*, 2008).

A relação entre prognóstico e metilação do ADN tem sido investigada na SMD em um único gene (D H Christiansen *et al.*, 2003; J. Lin *et al.*, 2008) (Quesnel *et al.*, 1998; Tien *et al.*, 2001; Wu *et al.*, 2006) ou em combinações de genes (Aggerholm *et al.*, 2006; Grövdal *et al.*, 2007). Embora existam fortes evidências de que essas alterações epigenéticas possam contribuir para a leucemogénese e para o comportamento biológico da doença (Bennett *et al.*, 2009; Guo *et al.*, 2005), o impacto de certos genes da metilação no prognóstico e na evolução não está totalmente esclarecido.

A microscopic image showing various cells, likely hematopoietic, with different stages of development and morphology, set against a light yellow background.

2.

Objetivos

A análise da literatura mostra que os mecanismos envolvidos na patogénese da SMD são múltiplos e complexos e envolvem várias alterações genéticas e epigenéticas que atingem a célula pluripotencial em várias etapas, originando alterações na proliferação, diferenciação e apoptose das células do sistema hematopoiético. Estes mecanismos podem contribuir para o risco de evolução para LMA e resistência às terapêuticas convencionais. No entanto, os mecanismos moleculares envolvidos na patogénese dos estádios iniciais e na transição para LMA, assim como a relevância clínica desses mecanismos para o diagnóstico, para a avaliação do prognóstico, identificação de novos grupos de risco e como novos alvos terapêuticos ainda não estão totalmente clarificados.

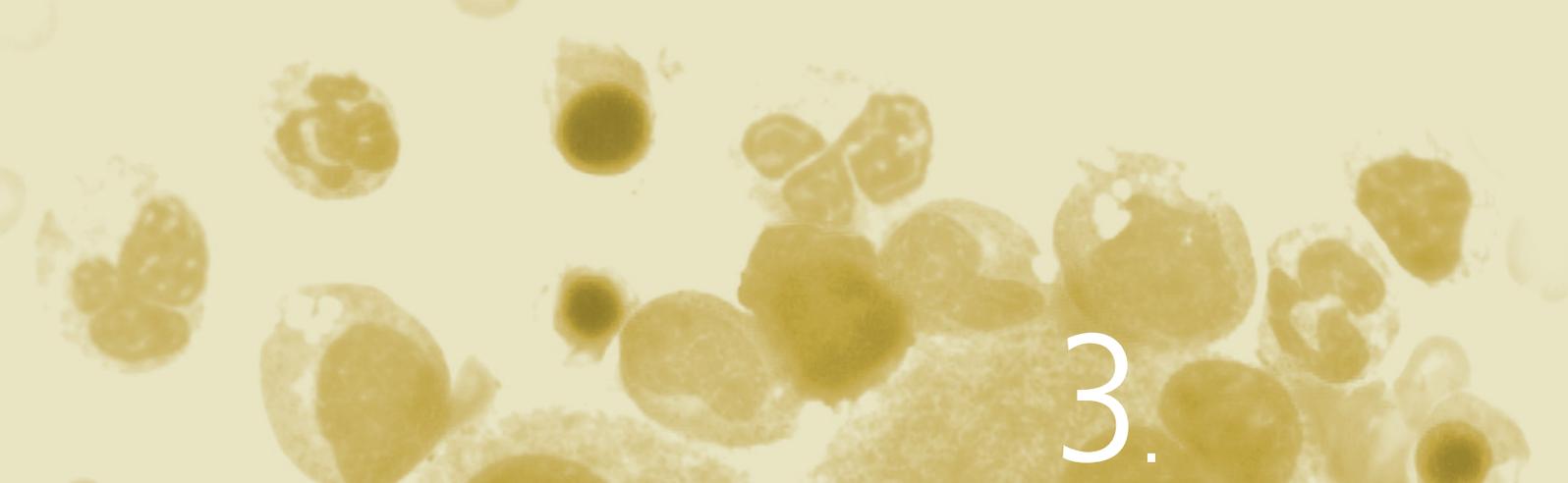
Dentro deste contexto, com este projeto pretendemos estudar as alterações moleculares envolvidas na SMD, nomeadamente a relevância clínica da célula estaminal leucémica, das alterações epigenéticas e da apoptose na patogénese dos vários subtipos de SMD e na evolução para LMA. Além disso, esperamos com este estudo contribuir para a caracterização de novos marcadores de prognóstico e alvos terapêuticos que permita identificar novos grupos de risco, melhorando a classificação da SMD e a seleção de estratégias terapêuticas dirigidas e personalizadas.

Especificamente pretendemos:

- Identificar e caracterizar as células estaminais hematopoiéticas e estaminais leucémicas de modo a clarificar o seu papel no diagnóstico e prognóstico da SMD.
- Clarificar os mecanismos moleculares envolvidos na proliferação e apoptose na SMD, nomeadamente o envolvimento das vias de sinalização mediadas pelo recetor FLT3 e c-KIT, e das proteínas reguladoras da apoptose (via membrana e mitocondrial), em particular as proteínas da

família BCL-2, BCL-2 e BAX, o TRAIL e seus recetores, o FAS-L, a IAP survivina, a caspase 3, o citocromo C e a p53, e a sua correlação com as características clínicas e laboratoriais dos doentes, incluindo a evolução para LMA, sobrevivência e grupos de risco prognóstico.

- Avaliar a influência do perfil de metilação de genes no diagnóstico e prognóstico de doentes com SMD, nomeadamente de 9 genes reguladores da proliferação e/ou do ciclo celular e/ou da apoptose, os genes *p15*, *p16*, *p53*, *MGMT*, *DAPK* e os recetores do *TRAIL* (*TRAIL-R1*, *-R4*, *-R3* e *-R4*), e correlacionar este perfil com parâmetros hematológicos e bioquímicos e com os marcadores de apoptose referidos, assim como com os subtipos da OMS, a evolução para LMA, sobrevivência e grupos de risco prognóstico.
- Avaliar o papel dos polimorfismos da MTHFR, A1298C e C677T, na etiopatogenia e no prognóstico de doentes com SMD, de modo a identificar novos marcadores moleculares para a classificação da SMD.
- Analisar a eficácia de terapêuticas dirigidas a alvos moleculares na SMD, particularmente, inibidores da farnesiltransferase, da tirosina-cinase, do proteasoma, das deacetilases das histonas e hipometilantes, identificando a melhor estratégia terapêutica com a menor dose de fármaco/s, ou seja, que possua maior eficácia com menor toxicidade quando translacionada para a prática clínica. Só assim será possível prolongar a sobrevivência e melhorar a qualidade de vida dos doentes com SMD.

A microscopic image showing various types of cells, likely from a blood smear or cell culture, with different shapes and sizes, some with prominent nuclei. The background is a light yellowish-green.

3.

Materiais e Métodos

Considerando os objetivos definidos para o presente trabalho, os estudos foram realizados em:

- doentes com Síndrome Mielodisplásica *de novo*;
- linha celular de mielodisplasia, F-36P (*European Collections of Cell Cultures*).

O estudo foi aprovado pela Comissão de Ética dos Hospitais da Universidade de Coimbra (atual CHUC) e autorizado por declaração do Conselho de Administração da mesma instituição.

3.1. Estudos realizados em doentes com Síndrome Mielodisplásica e controlos

3.1.1. Seleção dos doentes

Neste estudo participaram 102 doentes com SMD *de novo*. Para os estudos dos MTHFR foram ainda utilizadas 263/248 amostras de indivíduos saudáveis.

A seleção e caracterização dos doentes com SMD 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, entre outubro de 2009 e março de 2014.

As amostras de doentes com SMD utilizadas neste estudo foram obtidas de sangue periférico e aspirado medular durante os procedimentos efetuados ao diagnóstico em doentes com idade superior a 18 anos, que preenchiam os critérios clínicos e laboratoriais para o diagnóstico desta patologia, após

caracterização morfológica por microscopia ótica e avaliação citogenética por cariótipo convencional e *fluorescence in situ hybridization* (FISH).

Para a avaliação das características morfológicas dos doentes com SMD os esfregaços de sangue periférico e medula foram corados com os meios May-Grünwald-Giemsa e, posteriormente, analisados por microscopia ótica. Os aspetos considerados na análise morfológica foram: a presença de displasia em mais de 10% das células de uma linha celular, a percentagem de blastos, de monócitos (avaliada pela coloração com α -naftil-butirato-esterase) e de sideroblastos em anel (avaliada pela coloração de Perls).

O estudo citogenético realizado por cariótipo convencional permitiu pesquisar as alterações cromossómicas mais frequentes (deleções, trissomias e monossomias). Para a análise citogenética, as amostras obtidas de medula foram processadas por G-banding com coloração tripsina-Giemsa. As metafases foram examinadas num microscópio ótico ZEISS (AXIOPLAN 2 e AXIOSKOP 2 plus) e a análise cromossómica foi realizada segundo as recomendações da classificação do *International Standing Committee on Human Cytogenetic Nomenclature*, 1995. A técnica de FISH utiliza sondas fluorescentes e permite a deteção de deleções de um locus autossómico específico e de alterações numéricas dos cromossomas recorrendo a sondas centrométricas, em células interfásicas. As sondas utilizadas foram: CEP8 Trissomia, LSI 20q 12(del), LSI 5q 33-34 (del) e LSI 7q 31 (del). Assim, esta técnica permite a obtenção de informação adicional em doentes com cariótipos inconclusivos e, ocasionalmente, revela alterações cromossómicas não identificadas pela citogenética convencional.

Os doentes foram classificados segundo a classificação da OMS de 2008 e a avaliação do prognóstico foi efetuada utilizando o IPSS, o IPSS-R e o *World Health Organization* (WHO) WPSS. Para a determinação do IPSS foram utilizados os fatores de prognóstico descritos na literatura (Greenberg, 1997), isto é, a percentagem de blastos na medula, as alterações citogenéticas e o número de citopenias (Tabela 8). Também foi utilizado o IPSS-R, para o qual foram utilizados os seguintes parâmetros: citogenética, % de blastos medulares, valores de hemoglobina, plaquetas e neutrófilos (Tabela 10). O WPSS para além de contemplar o resultado citogenético, utiliza o subtipo segundo a classificação da OMS e a necessidade transfusional (Tabela 9).

Os controlos saudáveis sem patologia conhecida, para o estudo dos polimorfismos da enzima MTHFR, foram selecionados no Centro Regional de Sangue de Coimbra, após exame físico e testes laboratoriais (hematológicos e bioquímicos) de rotina.

3.1.2. Determinação dos parâmetros hematológicos e bioquímicos dos doentes

Em todos os doentes foram recolhidos os parâmetros hematológicos disponibilizados no hemograma, por citometria e citologia (leucócitos, neutrófilos, monócitos, hemoglobina, plaquetas).

A maioria dos doentes apresenta também doseamentos séricos de ácido fólico, vitamina B12, ferritina, desidrogenase do lactato (LDH) e eritropoietina.

Todos estes dados hematológicos e bioquímicos foram recolhidos e utilizados na análise estatística (Tabela 12).

TABELA 12

Parâmetro	Até abril 2011	Após abril 2011
Ácido fólico (ng/mL)	3 - 20	> 5,4
β 2-microglobulina (mg/L)	1,09 - 2,53	< 2,1
Desidrogenase do lactato (U/L)	< 248	
Eritropoietina (mIU/mL)	3,5 - 15,0	4,3 - 29,0
Ferritina (ng/mL)	♀ 10 - 300	♀ 10 - 120
	♂ 25 - 340	♂ 20 - 250
Vitamina B12 (pg/mL)	175 - 1500	211 - 911

Valores normais dos parâmetros bioquímicos

3.1.3. Análise das amostras dos doentes por citometria de fluxo

A citometria de fluxo é uma técnica que permite analisar e quantificar células ou outras partículas biológicas baseada na dispersão de luz, frontal (*forward scatter* – FSC) e lateral (*side scatter* – SSC), emitida por uma fonte de luz (laser de argon), e pela fluorescência emitida por fluorocromos (APC – alofococianina; PerCP – peridina de clorofila; PE – R-Phycoerythrin; FITC – isotiocianato de fluoresceína, entre outros) ligados a anticorpos monoclonais ou outros compostos (Bernas, 2006).

Para caracterizar e identificar as células estaminais e o envolvimento da apoptose na SMD, recorreu-se à citometria de fluxo utilizando anticorpos monoclonais com sondas fluorescentes.

3.1.3.1. Isolamento e caracterização de células estaminais pluripotenciais

Para o isolamento das células CD34+ em doentes (*cell sorting*) foi utilizado o *sorting* celular magnético recorrendo a esferas (kit de isolamento de célula

progenitora CD34, MACS; Miltenyi Biotech GmgH, Bergisch Gladbach, Germany), de acordo com as normas dos fabricantes. A pureza e quantificação das células CD34+ foram determinadas por citometria de fluxo (Liesveld, 2004), recorrendo à marcação com anticorpo anti-CD34 marcado com APC.

A distinção entre célula estaminal progenitora hematopoiética normal e leucêmica foi efetuada utilizando um painel de anticorpos monoclonais conjugados com a seguinte combinação: CD34/CD117/CD123/GlicoP.

O marcador CD45 foi testado em cada combinação para permitir um *gating* primário das células brancas da medula, baseado na expressão do antigénio CD45 e SSC. A análise de células CD34+ foi realizada utilizando as *guidelines cell-gating* e as células foram caracterizadas utilizando a combinação CD34/CD33/CD45.

As células dos doentes com SMD foram inicialmente marcadas com os anticorpos anti-CD34-APC (BD Biosystems) e anti-CD45-PerCP (BD Biosystems) de modo a identificar diferentes populações celulares com base na expressão dos antigénios de superfície CD34 e CD45. Assim, incubou-se, aproximadamente, um milhão de células de medula óssea dos doentes com SMD com 1 µg de anticorpo monoclonal anti-CD34-APC e com 1 µg de anticorpo monoclonal anti-CD45-PerCP durante 10 minutos à temperatura ambiente e na ausência de luz. Seguidamente, incubou-se as células com 2 mL de tampão de lise (BD BioSystems) durante 10 minutos à temperatura ambiente e na ausência de luz.

Posteriormente, as células foram lavadas com tampão fosfato (PBS) por centrifugação a 300 xg durante 5 minutos, ressuspensas em 400 µL de PBS e analisadas num citómetro de fluxo FACSCalibur (Becton Dickinson) equipado com um laser de árgon utilizando o comprimento de onda de excitação de 525 nm. Foram adquiridas 50.000 células através do programa CellQuest™ e os dados obtidos foram analisados e quantificados usando o programa Paint-a-Gate 3.02. Os resultados são expressos em % de células e em média de intensidade de fluorescência (MIF).

3.1.3.2. Avaliação de marcadores moleculares envolvidos nas vias de sinalização da apoptose

O estudo efetuado por citometria de fluxo permitiu analisar simultaneamente diversos parâmetros celulares: a maturação e diferenciação celular, e a presença de moléculas (membranares e citoplasmáticas), por marcação com anticorpos monoclonais ligados a fluorocromos. Os anticorpos monoclonais utilizados foram: anti-CD34, anti-CD45, anti-CD33, anti-CD117, anti-CD123, antiglicoproteína membranar e citoplasmática, anti-IL-6 e anti-TNF- α , segundo as combinações descritas na tabela 13.

TABELA 13

Tubo	APC	PerCP-Cy5.5	PE	FITC
1	CD34 (BD biosystems)	CD123 (BD biosystems)	CD117 (BD biosystems)	Glicoproteína P (BD Pharmingen)
2	CD34 (BD biosystems)	CD123 (BD biosystems)	CD117 (BD biosystems)	IL-6* (BD Pharmingen)
3	CD34 (BD biosystems)	CD123 (BD biosystems)	CD117 (BD biosystems)	TNF-alfa* (BD Pharmingen)
4	CD34 (BD biosystems)	CD33 (BD biosystems)	CD45 (BD biosystems)	
5	CD34 (BD biosystems)	CD45 (BD biosystems)	FAS (BD Pharmingen)	FAS Ligando (SC antibodies)
6	CD34 (BD biosystems)	CD45 (BD biosystems)	TRAIL Ligando (BD Pharmingen)	Caspase 3 ativa* (BD Pharmingen)
7	CD34 (BD biosystems)	CD45 (BD biosystems)	TRAIL R1 (R&D Systems)	Survivina* (R&D Systems)
8	CD34 (BD biosystems)	CD45 (BD biosystems)	TRAIL R2 (R&D Systems)	P53* (Immunostep)
9	CD34 (BD biosystems)	CD45 (BD biosystems)	TRAIL R3 (R&D Systems)	Citocromo C* (SC antibodies)
10	CD34 (BD biosystems)	CD45 (BD biosystems)	TRAIL R4 (R&D Systems)	Glicoproteína P* (BD Pharmingen)
11	CD34 (BD biosystems)	CD45 (BD biosystems)	BAX* (SC antibodies)	BCL2* (BD biosystems)

* citoplasmática

Combinções de anticorpos monoclonais e fluorocromos

A determinação da expressão de proteínas envolvidas nas vias de apoptose (membranar e citoplasmática) foi efetuada em células isoladas de amostras de medula óssea e analisadas por citometria de fluxo, utilizando anticorpos monoclonais contra BAX, BCL-2, p53, FAS, FAS Ligando, TRAIL Ligando, recetores do TRAIL (R1, R2, R3 e R4), Caspase 3, Citocromo C, Glicoproteína P e Survivina. Os blastos foram isolados com base no *blast orthogonal light scatter* e expressão de CD45, e as células estaminais cancerígenas foram identificadas conforme descrito na secção 3.1.3.1.

Para a marcação das proteínas membranares, foram adicionados simultaneamente os anticorpos anti-CD34 e anti-CD45, como descrito em 3.1.3.1., e também 1 µg de anticorpo membranar (Glicoproteína P, FAS, FAS Ligando, TRAIL Ligando, R1, R2, R3, R4), segundo a combinação da tabela 13, durante 10 minutos à temperatura ambiente e na ausência de luz. Seguidamente, incubou-se as células com 2 mL de tampão de lise (BD BioSystems) durante 10 minutos à temperatura ambiente e na ausência de luz.

Posteriormente, as células foram lavadas com tampão fosfato (PBS) por centrifugação a 300 xg durante 5 minutos.

Seguidamente procedeu-se à marcação das proteínas citoplasmáticas. Adicionou-se 100 µL de solução A (solução fixante do kit da Immunostep) e incubou-se 15 minutos. Após nova lavagem, adicionou-se 100 µL de solução B (solução permeabilizante da Immunostep) e, posteriormente, o anticorpo citoplasmático (Glicoproteína P, IL-6, TNF-α, Caspase 3, Survivina, p53,

Citocromo C, BAX, BCL2). Após nova incubação de 15 minutos e lavagem, ressuspendeu-se com 400 µL.

3.1.4. Análise do perfil de metilação dos doentes

3.1.4.1. Extração e quantificação do ADN genómico

A extração de ADN genómico da medula óssea dos doentes com SMD foi realizada ao diagnóstico, através do protocolo de extração de ADN para amostras de sangue desenvolvido por Bartlett & White (Bartlett, 2003), após otimização do mesmo. Assim, num tubo cónico de 10 mL, colocou-se 500 µL de 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 num banho aquecido a 65°C durante 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 de 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 (Tris-HCL a 10 mM e EDTA a 1 mM, pH=8,0). As amostras de ADN genómico foram posteriormente quantificadas e o grau de pureza das amostras foi analisado por espectrofotometria de absorção, recorrendo ao NanoDrop® 1000 Spectrophotometer. O grau de pureza do ADN é calculado através da determinação da razão das densidades óticas determinadas a 260nm e a 280nm (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.

3.1.4.2. 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* (Van Noesel, 2002), *MGMT*, *TRAIL DcR1*, *TRAIL DcR2*, *TRAIL DR4* e *TRAIL DR5* (Yeh, 2003) foi realizado um PCR específico de metilação, o MS-PCR (*Methylation-Specific Polymerase Chain Reaction*) (Herman, 1996).

Para a detecção da metilação, o ADN genómico tem de ser previamente modificado com bissulfito de sódio, 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 (Figura 23).

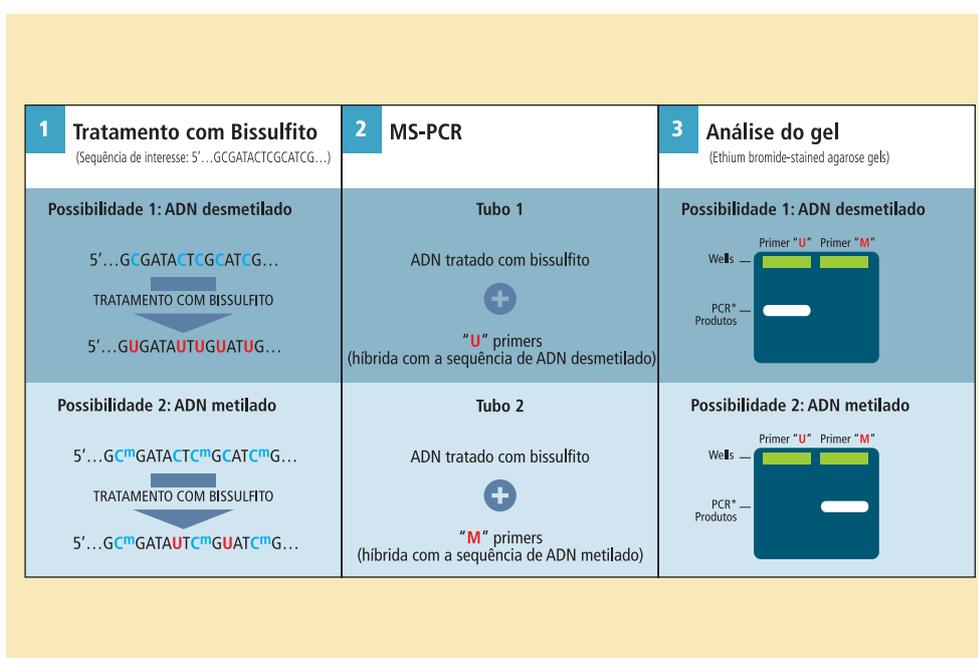


FIGURA 23

Methylation specific - PCR.

Modificação do ADN com Bissulfito de sódio

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, segundo 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 (a 98°C durante 10 minutos), e um ciclo de conversão pelo bissulfito e à temperatura de 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.

Methylation-Specific Polymerase Chain Reaction (MS-PCR)

O ADN modificado dos doentes foi posteriormente amplificado através da técnica de MS-PCR, segundo o protocolo definido por Herman JG *et al.* (1996), com algumas alterações. Desta forma, a 100 ng de ADN modificado foi adicionado um *primer* directo (forward – F) e um *primer* inverso, de acordo com o indicado na tabela 14, numa concentração de 0,25 µM, uma mistura de

TABELA 14

Sequência de Primers
específicos utilizados na
MS-PCR

	Primer	TE	Sequência do Primer	Tamanho (pb)	Referência
Alelo Metilado	p15F	60°C	5'-TAGTGAGGATTCGCGACGC-3'	148	Herman <i>et al.</i> 1996
	p15R		5'-ACGACCGATCGTAACTCCG-3'		
	p16F	65°C	5'-TTATTAGAGGGTGGGCGGATCGC-3'	234	
	p16R		5'-GACCCCGAACCGCGACCGTAA-3'		
	DAPKF	60°C	5'-GGATAGTCGGATCGAGTTAACGTC-3'	100	Russo <i>et al.</i> , 2005
	DAPKR		5'-CCCTCCAAACGCCG-3'		
	p53F	60°C	5'-TTCGGTAGGCGGATTATTG-3'	193	Gonzalez-Gomez <i>et al.</i> , 2003
	p53R		5'-AAATATCCCCGAAACCAAC-3'		
	MGMTF	66°C	5'-TTTCGACGTTTCGAGTTTTCGC-3'	81	Esteller <i>et al.</i> , 2000
	MGMTR		5'-GCACTCTCCGAAAACGAAACG-3'		
	DR4F	60°C	5'-TTCGAATTCGGGAGCGTAGC-3'	91	Lee <i>et al.</i> , 2009
	DR4R		5'-GTAATCAATCCTCCCGCGA-3'		
	DR5F	58°C	5'-GAGTAGTGAAAGATTAGTTCGCGTC-3'	199	
	DR5R		5'-CCGAAACGTTCTATCCCG-3'		
DcR1F	60°C	5'-TTACGCGTACGAATTTAGTTAAC-3'	125		
DcR1R		5'-ATCAACGACCGACCGAAACG-3'			
DcR2F	60°C	5'-GGGATAAAGCGTTTCGATC-3'	138		
DcR2R		5'-CGACAACAAAACCGCG-3'			
Alelo Desmetilado	p15F	60°C	5'-GTTAGAGTGAGGTGGGGTAGTGAGGATTTGTGATGT-3'	154	Herman <i>et al.</i> 1996
	p15R		5'-TACAATAACCAACAACCAATCATTAACCTCA-3'		
	p16F	60°C	5'-TTATTAGAGGGTGGGGTGGATTGT-3'	234	
	p16R		5'-CAACCCCAAACCAACCATAA-3'		
	DAPKF	60°C	5'-GGAGGATAGTTGGATTGAGTTAATGTT-3'	106	Russo <i>et al.</i> , 2005
	DAPKR		5'-CAATCCCTCCAAACACCAA-3'		
	p53F	60°C	5'-TTGGTAGGTGGATTATTGTTT-3'	247	Gonzalez-Gomez <i>et al.</i> , 2003
	p53R		5'-CCAATCCAAAAACATATCAC-3'		
	MGMTF	66°C	5'-TTTGTGTTTGTGTTTGTAGGTTTGT-3'	93	Esteller <i>et al.</i> , 2000
	MGMTR		5'-AACTCCACTCTTCCAAAAACAAAACA-3'		
	DR4F	60°C	5'-GTAGTGATTTGAATTTGGGAGTGAGT-3'	102	Lee <i>et al.</i> , 2009
	DR4R		5'-CTCATAATCAATCCCAACA-3'		
	DR5F	60°C	5'-TGTTGAGTAGTGAAGATTAGTTGTGTT-3'	208	
	DR5R		5'-ACAACCAAAACATTCTATCCCA-3'		
DcR1F	60°C	5'-GAATTTTTTATGTGTATGAATTTAGTTAAT-3'	135		
DcR1R		5'-CCATCAACAACCAAAAACA-3'			
DcR2F	60°C	5'-TTGGGATAAAGTGTGTTGATT-3'	145		
DcR2R		5'-AAACCAACAACAAACCAACA-3'			

dNTP's (desoxinucleótidos trifosfatados de adenina, guanina, citosina e timina) 0,2 mM, cloreto de magnésio (NZYtech), tampão [reaction buffer for Supreme NZYtaq DNA polymerase; constituição: 670 mM Tris-HCl, pH 8.8, 160 mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 400 mM KCl, 0.1% Tween 20; volume: 10% do total utilizado na reação] e 1 U de polimerase (Supreme NZYtaq DNA polymerase, NZYtech). A reação 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 14, durante 30 segundos e extensão a 72°C durante 30 segundos. A reação 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 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). Após a amplificação, os produtos da PCR foram analisados em gel de agarose (NZYtech) a 4% em TBE (Tris:89 mM; EDTA-Na2: 2 mM; ácido bórico: 89 mM), corado com GreenSafe (NZYtech), utilizando o marcador de pesos moleculares de 100 pb (NZYDNA Ladder V, NZYtech), e posteriormente analisados sob luz ultravioleta.

3.1.5. Deteção de mutações no gene *FLT3*

O estudo das mutações *FLT3* foi efetuado nos doentes de acordo com o descrito no ponto 3.2.3. da linha celular.

3.1.6. Análise genotípica das variantes polimórficas da enzima metilenotetrahidrofolato redutase dos doentes e controlos

Para correlacionar o *status* do folato com as alterações epigenéticas nos genes estudados, foram avaliados os polimorfismos da MTHFR C677T e A1298C de acordo com um protocolo adaptado de Frosst *et al.* and Weisberg *et al.* (Skibola, 1999).

Neste procedimento foram colhidos 3 mL de sangue por punção venosa, em tubos contendo EDTA, a doentes com SMD e a controlos não-neoplásicos e saudáveis. Nestas amostras foram detetados os polimorfismos MTHFR, C677T e A1298C, segundo a metodologia desenvolvida por Frosst P. (1995) e Weisberg

I. (1998). Esta técnica baseia-se na alteração das bases azotadas nos locais de reconhecimento das endonucleases de restrição *Hinfl* e *MbolI*, respetivamente. Deste modo, a substituição pontual de nucleótidos nestes locais conduz ao aparecimento ou perda de locais de restrição. Posteriormente, os produtos de digestão podem ser visualizados por eletroforese.

Assim, foi amplificado 100 ng de ADN genómico, obtido de acordo com o referido em 3.1.4.1., utilizando um *primer* direto e um *primer* inverso (5'-GAAGCAGGGAGCTTTGAGG-3' e 5'-ACGATGGGGCAAGTGATG-3' para o polimorfismo C677T e 5'-AGAGCAAGTCCCCCAAGGA-3' e 5'-CTTTGTACCATTCCGGTTTG-3' para o polimorfismo A1298C) na concentração de 20 µM e dNT's (desoxinucleótidos trifosfatados de adenina, guanina, citosina e timina) numa concentração de 100 µM, cloreto de magnésio a 1.5 mM e 2 U de *HotStart Taq polymerase* (Quiagen). A PCR iniciou-se por uma fase de desnaturação inicial à temperatura de 94°C durante 10 minutos, seguida de 30 ciclos de desnaturação (95°C durante 30 segundos), emparelhamento (56°C e 55°C durante 30 segundos, respetivamente para o polimorfismo C667T e A1298C) e extensão (72°C durante 30 segundos), e um período de extensão final a 72°C durante 5 minutos, utilizando o termociclador My Cycler (BioRad).

Após amplificação dos fragmentos de ADN genómico, contendo os locais polimórficos C667T e A1298C do gene da MTHFR, procedeu-se à digestão enzimática durante a noite dos fragmentos obtidos, respetivamente, com a endonuclease de restrição *Hinfl* e *MbolI* (New England BioLabs). Os produtos digeridos foram posteriormente analisados em gel de agarose (NZYtech) a 2% em TBE (Tris: 89 mM; EDTA-Na₂: 2 mM; ácido bórico: 89 mM), corado com GreenSafe /NZYtech) e utilizando o marcador de pesos moleculares de 100 pb (NZYDNA Ladder V, NZYtech), e seguidamente visualizados sob luz ultravioleta.

As amostras de ADN genómico dos doentes com SMD e dos controlos saudáveis foram amplificadas simultaneamente com uma amostra controlo sem ADN de modo a despistar possíveis contaminações na mistura de amplificação.

A identificação dos genótipos foi efetuada atendendo ao padrão de bandas de restrição observado. Assim, e uma vez que a substituição de citosina por timina (C→T) no nucleótido 677 do gene da MTHFR introduz um local de restrição para a enzima *Hinfl*, é possível observar-se várias bandas. Para o genótipo CC – uma banda com 152 pares de bases (pb); para o genótipo CT – duas bandas, uma com 152 pb e outra com 98 pb; e para o genótipo TT – uma banda com 98 pb. Por outro lado, a substituição de adenina por citosina (A→C) no nucleótido 1298 do gene da MTHFR elimina o local de restrição para a enzima *MbolI* observando-se as seguintes bandas: para o genótipo CC – uma banda com 95 pares de bases (pb); para o genótipo AC – duas bandas, uma com 95 pb e outra com 67 pb; e para o genótipo AA – uma banda com 67 pb.

3.2. Estudos realizados na linha celular de Mielodisplasia humana

3.2.1. Caracterização e manutenção da linha Celular F-36P

No presente trabalho foi utilizada uma linha celular de SMD, as células F-36P, obtidas no *European Collection of Cell Cultures* (ECACC), [banco de cultura *Health Protection Agency Culture Collections* (<http://www.hpacultures.org.uk/aboutus/ecacc.jsp>)]. Esta linha celular cresce em suspensão e foi estabelecida por Chiba *et al.* (Chiba, 1991), a partir de células isoladas do líquido pleural de um doente do sexo masculino com 65 anos de idade com diagnóstico de SMD, subtipo AREB-t (Classificação OMS 2001), em progressão para LMA. Atualmente, esta linha celular é considerada Leucemia Mieloblástica Aguda, de acordo com a classificação da OMS de 2008.

As células F-36P crescem em suspensão, em meio de cultura apropriado, sob condições de assepsia, à temperatura de 37°C e numa atmosfera humidificada contendo 5% CO₂.

O meio de cultura utilizado foi o RPMI 1640, adquirido da *Sigma-Aldrich* Química S.A., Sintra, Portugal, sob forma líquida e estéril. Este meio contém na sua composição 2000 mg/L glucose, L-glutamina e bicarbonato de sódio, ao qual foi adicionado 50 ng/mL de rh IL-3 e 10% de Soro Fetal Bovino (FBS), previamente inativado por aquecimento a 56 °C durante 30 minutos, e 5 mL (10%v/v) de uma solução de antibióticos contendo penicilina (10.000 unidades) e estreptomicina (10 mg/mL).

As células foram colocadas em cultura numa densidade de 6-7x10⁵ células/mL. Atendendo à velocidade de crescimento e à taxa metabólica das células, a mudança de meio foi efetuada a cada 3 dias, de acordo com a curva de crescimento previamente efetuada. A densidade celular foi avaliada diariamente, por contagem do número de células viáveis num hemocitómetro (ou Câmara de Neubauer), utilizando o método de exclusão pelo Azul de Tripano (TB). Para o efeito, a 5 µL de suspensão celular adicionou-se a mesma quantidade de TB (diluição de 1:1). Após homogeneização, esta suspensão celular foi colocada num hemocitómetro, procedendo-se à contagem das células no microscópio ótico de luz invertida.

Para a manutenção de cultura celular, e sempre que necessário, procedeu-se à centrifugação das células a 125 xg durante 5 minutos, de modo a remover o meio. De seguida, as células foram novamente ressuspensas num volume de meio, de modo a manter a concentração de células referidas anteriormente. A cada passagem das células observou-se a morfologia, a cor do meio, o padrão

de crescimento e a densidade e tomou-se nota do número de passagens, de modo a otimizar as condições de crescimento e a manutenção da cultura.

3.2.2. Avaliação do Efeito Citotóxico e Citostático de Fármacos Anticancerígenos

Os efeitos citotóxico e citostático induzidos pelo tratamento das células F-36P com fármacos dirigidos a alvos moleculares, em monoterapia e em associação com fármacos, foram avaliados recorrendo à elaboração de curvas dose-resposta e pela análise dos mecanismos moleculares envolvidos nesse efeito.

3.2.2.1. Estabelecimento de Curvas Dose-Resposta

As células de mielodisplasia F-36P foram mantidas em cultura nas condições referidas em 3.2.1. Para o estabelecimento de curvas dose-resposta procedeu-se à avaliação da viabilidade e densidade das células tratadas com os fármacos em estudo, através do método do Azul de Tripano e do Teste da Resazurina durante 72 horas.

Para este efeito foram transferidas $0,6 \times 10^6$ células/mL da suspensão celular de F-36P para caixas *multiwells*, onde foram incubadas com concentrações crescentes dos fármacos. Simultaneamente, foram incubadas células apenas com meio, na ausência de fármacos, que serviram de controlo. O procedimento foi executado numa câmara de fluxo laminar, transferindo-se seguidamente a placa para uma estufa a 37 °C com uma atmosfera humidificada contendo 5% de CO₂.

Foram preparadas três placas correspondentes aos períodos de 24, 48 e 72 horas de incubação, o que permitiu a análise da viabilidade e densidade celular a cada 24 horas. As células foram submetidas a uma centrifugação prévia de 125 xg durante 5 minutos para remoção de eventuais células mortas, de modo a obter uma viabilidade próxima dos 100% no início da incubação (tempo zero).

Os fármacos utilizados para o tratamento das células foram:

- **Ara-C**, também denominado de Citosina Arabinosídeo ou Citarabina, na gama de concentrações entre 50 nM e 100 µM.
- **α-HFPA**, ácido α-hidroxifarnesilfosfónico, um inibidor da farnesiltransferase, utilizado na gama de concentrações entre 500 nM e 250 µM;

- **Imatinib**, um inibidor de proteínas com atividade de tirosina-cinase, utilizado na gama de concentrações entre 25 nM e 200 nM;
- **MG262**, um inibidor da subunidade 20S do proteasoma, utilizado na gama de concentrações de 1 nM a 150 nM;
- **Decitabina** (DEC), um hipometilante, utilizado na dose de 1 a 100 μ M;
- **Tricostatina A** (TSA A), inibidor das desacetilases das histonas, utilizado na dose de 10 a 5000 nM.

As células foram tratadas com os fármacos referidos, em monoterapia e em associação entre si (nomeadamente as combinações entre α -HFPA e Ara-C, α -HFPA e Imatinib, α -HFPA e MG262 e ainda, DEC e TSA A).

A cada 24 horas de incubação efetuou-se a contagem tanto das células vivas como das células mortas, recorrendo ao método do Azul de Tripano e observação ao microscópio ótico de luz invertida. Os parâmetros de viabilidade celular e densidade celular foram calculados do seguinte modo:

- **Densidade celular** ($n.^{\circ}$ células vivas/ml) = média do número de células vivas x fator de diluição / unidade de volume
- **Viabilidade celular** (% de células vivas) = $n.^{\circ}$ de células vivas + $n.^{\circ}$ de células mortas / ($n.^{\circ}$ total de células) x 100.

As associações foram incubadas em simultâneo e com desfasamento de 4 horas entre os fármacos. Para cada ensaio foram efetuados os cálculos da viabilidade e densidade, das médias dos valores da viabilidade e densidade obtidos, e os desvios-padrão respetivos. Partindo destes dados foi possível a construção dos gráficos de Curvas Dose-Resposta.

3.2.2.2. Avaliação do tipo de Morte Celular Induzida por Fármacos Anticancerígenos

Para avaliar o tipo de morte induzido pelos fármacos em estudo recorreu-se à análise morfológica por microscopia ótica e à técnica de citometria de fluxo, utilizando a marcação com Anexina V (AV) e Iodeto de Propídeo (IP).

Análise da Morfologia Celular por Microscopia Ótica

As células F-36P incubadas nas concentrações referidas anteriormente durante 48 horas, a uma densidade inicial de $0,75 \times 10^6$ células/mL, foram recolhidas e centrifugadas durante 10 minutos a 1000 xg (de modo a concentrar a amostra). Removeu-se o sobrenadante e ressuspendeu-se o sedimento com 20 μ L de soro fetal bovino, procedendo-se seguidamente à elaboração de

esfregaços. Posteriormente, para identificar as características morfológicas das células recorreu-se à técnica de coloração de May-Grünwald-Giemsa (soluto de eosinato de azul de metileno em metanol). Ao esfregaço, adicionou-se uma quantidade de soluto de May-Grünwald durante 3 minutos, de modo a cobrir toda a lâmina, para que ocorra a fixação das células pelo metanol. Em seguida adicionou-se igual quantidade de água bidestilada (ou água tamponizada a pH 7.2) durante um minuto, de modo a permitir a dissociação do corante e a identificação das várias estruturas celulares. Retirou-se o excesso de corante e cobriu-se a lâmina com solução de Giemsa, durante 15 minutos (preparada de fresco e diluída com água destilada, na proporção de 1:1). Esta solução contém o corante eosinato de azul de metileno, que cora as estruturas azurófilas. Finalmente, lavou-se o esfregaço em água corrente e, após secagem, procedeu-se à observação ao microscópio ótico de luz invertida.

Análise da Morte Celular por Citometria de Fluxo

A morte celular foi avaliada por citometria de fluxo através da dupla marcação com anexina V (ligada ao fluorocromo isotiocianato de fluoresceína – anexina V-APC) em combinação com o IP. Esta técnica permite distinguir as células viáveis das células mortas, e dentro destas qual o mecanismo que desencadeou a morte celular, ou seja, se esta ocorreu por apoptose ou por necrose.

Uma das características das células em apoptose é a alteração da distribuição dos fosfolípidos dos folhetos da bicamada lipídica que constitui a membrana celular. Assim, quando se inicia a morte celular por apoptose ocorre translocação da fosfatidilserina, um fosfolípido de carga negativa, do folheto interno para o folheto externo da membrana celular. A anexina V é uma molécula com elevada afinidade por fosfolípidos de carga negativa, como a fosfatidilserina, ligando-se a este fosfolípido na presença de cálcio (Ca^{2+}). Quando conjugada com um fluorocromo, a anexina V permite determinar a localização da fosfatidilserina na membrana celular e identificar as células em apoptose inicial (Sgonc, 1998). Por outro lado, as células em necrose perdem integridade da membrana celular, permitindo a entrada do IP para o interior da célula. O IP é um composto que se intercala na dupla cadeia de ADN emitindo fluorescência. A perda de integridade membranar, ou seja, a rutura da membrana celular, ocorre também nas fases mais avançadas da apoptose permitindo a entrada do IP.

Quando as células são expostas simultaneamente à anexina V e ao IP é possível distinguir as células vivas (que não marcam com anexina V e IP), as células em apoptose inicial (que marcam com anexina V), as células em apoptose tardia/necrose (que marcam simultaneamente com anexina V e IP) e as células em necrose (que marcam com IP) (Aubry, 1999; Gorman, 1997).

Assim, nas células F-36P incubadas, durante 48 horas, na ausência e na presença dos fármacos, nas condições descritas anteriormente, foi avaliada a viabilidade e o tipo de morte celular induzida por estes compostos. Recolheu-se um mL de suspensão celular contendo 1 milhão de células e lavou-se com tampão fosfato (PBS) por centrifugação durante 5 minutos a 1.000 xg. O sedimento obtido foi processado de acordo com as instruções do kit de detecção de morte celular da Immunotech. O sedimento foi colocado em gelo e ressuspenso em 100 µL de tampão de ligação frio e incubado com 1 µL de anexina V-FITC e 5 µL de IP, durante 15 minutos ao abrigo da luz. Adicionou-se mais 400 µL de tampão de ligação e procedeu-se à análise num citómetro de fluxo FACSCalibur (Becton Dickinson), equipado com um laser de árgon, utilizando os comprimentos de onda de excitação de 525 nm e de 640 nm, respetivamente para a anexina V-FITC e para o IP. Foram adquiridos 10.000 eventos através do programa CellQuest™ e os dados obtidos foram analisados usando o programa Paint-a-Gate 3.02. Os resultados são expressos em percentagem de células de cada uma das subpopulações identificadas com base na positividade e/ou negatividade de marcação para a anexina V e para o IP (Sarmiento-Ribeiro A. B., 2000).

3.2.3. Detecção de Mutações dos genes *RAS* e *FLT3*

3.2.3.1. Gene *RAS* – Extração, quantificação e deteção de ADN

A deteção de mutações nas três isoformas do gene *RAS*, *N-RAS*, *K-RAS* e *H-RAS* na linha celular F-36P foi executada por sequenciação automática. Assim, procedemos à identificação das mutações no gene *N-RAS*, no codão 12 (na posição com 279-289 pares de bases) da sequência GGT, responsável pela codificação do aminoácido glicina (Gli), no codão 61 (no segmento entre 434-436 pb) na sequência CAA, codificante do aminoácido prolina (Pro). No gene *H-RAS* procedeu-se à identificação de mutações nos codões 12 (222-224 pb) na sequência GGC e 61 (370-372 pb) na sequência AGG, codificantes de glicina (Gli) e arginina (Arg), respetivamente. Por fim, analisou-se a existência de mutações no gene *K-RAS* nos codões 12 (215-217 pb), na sequência GGT e 13 (218-220 pb), na sequência GGC e no codão 61 (362-364 pb), na sequência CAA.

Para o efeito o ADN das células F-36P foi previamente isolado, purificado, amplificado por PCR (*Polymerase Chain Reaction*) e posteriormente sequenciado.

Extração de ADN recorrendo ao Kit *Illustra™ blood genomicPrep Mini Spin Kit (GE Healthcare)*

O ADN das células F-36P foi extraído de acordo com os procedimentos mencionados no kit utilizado. Assim, as células foram sujeitas a uma centrifugação de 125 xg, sendo ressuspensas em 400 µL de tampão de lise. A mistura obtida foi posteriormente agitada no vórtex durante 15 segundos e incubada durante 10 minutos. Montou-se uma coluna contendo uma malha de sílica-gel num tubo de recolha. Ressuspendeu-se cuidadosamente as células lisadas com uma micropipeta e transferiu-se a mistura para a superfície da malha da coluna. Centrifugou-se a 11.000 xg durante um minuto para que o ADN fosse adsorvido na malha, removeu-se o sobrenadante do tubo coletor e adicionou-se novamente 500 µL de tampão de lise. Repetiu-se o passo anterior, de modo a proceder a uma lise completa e à desnaturação de eventuais proteínas residuais. Em seguida, adicionaram-se 500 µL de tampão de lavagem (diluído previamente com etanol) e centrifugou-se a 11.000 xg durante 3 minutos. Retirou-se o sobrenadante e efetuou-se nova centrifugação a 11.000 xg durante 1 minuto, de modo a remover todo o etanol eventualmente retido (o que poderia afetar significativamente o produto final). A coluna foi posteriormente transferida para um *ependorf* estéril. Adicionou-se diretamente na malha 200 µL de tampão de eluição, previamente incubado a 70 °C durante 1 minuto. Posteriormente, procedeu-se a uma centrifugação a 11.000 xg, recolhendo-se o eluído que contém o ADN.

A quantidade de ADN nas amostras foi determinada por espetofotometria. Para tal, utilizou-se um tubo branco contendo 500 µL água e outro tubo contendo 10 µL de amostra e 490 µL de água (diluição 1:50). A quantidade de ADN na amostra foi determinada por meio da expressão:

$$\text{– Concentração do ADN na Amostra} = 50 \mu\text{g/mL} \times A_{260} \times \text{Fator de Diluição},$$

considerando-se que a cada unidade de absorvância a 260 nm correspondem 50 µg/mL, e o fator de diluição foi de 50x.

O grau de pureza da amostra foi determinado pela razão entre as densidades óticas (DO) avaliadas no comprimento de onda (λ) de 260 nm e de 280 nm, de acordo com a expressão: $\text{DO } 260_{\text{amostra}} / \text{DO } 280_{\text{amostra}}$.

As amostras foram consideradas puras para a razão igual a 1,8 (foram utilizadas as amostras com um grau de pureza entre 1,7 e 1,9).

Amplificação dos genes de *N-RAS*, *K-RAS* e *H-RAS* por PCR

A partir do ADN obtido, procedeu-se à amplificação dos genes *N-RAS*, *H-RAS* e *K-RAS*, utilizando um tubo branco e um controlo positivo de ADN proveniente

de outra amostra. Devido à presença de intrões entre os locais a amplificar, foi necessário proceder à amplificação dos codões 12 e 13 separadamente do codão 61 para cada isoforma do gene *RAS* (*N-RAS*, *K-RAS* e *H-RAS*), para cada amostra. Foi executado o PCR padrão, tendo-se utilizado *primers forward* (PF) e *reverse* (PR), desenhados no programa Beacon Designer®, com as sequências apresentadas na Tabela 15.

TABELA 15

	Primer	Sequência do Primer	Sequência de <i>Primers</i> específicos utilizados na amplificação dos genes <i>RAS</i>
Alelo Metilado	<i>N-RAS</i> – codões 12 e 13 PF PR	5'-GACTGAGTACAAACTGGTGG-3' 5'-AATATGATCCCACCATAGAG-3'	
	<i>N-RAS</i> – codão 61 PF PR	5'-ATTCTTACAGAAAACAAGT-3' 5'-AACCTCTACAGGTAAGTAGGA-3'	
	<i>H-RAS</i> – codões 12 e 13 PF PR	5'-CAGGAGACCCTGTAGGA-3' 5'-ATCCAGAACCATTTTGTGG-3'	
	<i>H-RAS</i> – codão 61 PF PR	5'-GGAGAGGCTGGCTGTGTGAA-3' 5'-TCAACCAACACCAAGTCTTTT-3'	
	<i>K-RAS</i> – codões 12 e 13 PF PR	5'-ACATGTTCTAATATAGTCAC-3' 5'-CGAATATGATCCAACAATAG-3'	
	<i>K-RAS</i> – codão 61 PF PR	5'-TTCCTACAGGAAGCAAGTAGT-3' 5'-GAGTCTTTGCTAATGCCATG-3'	

Posteriormente, foram efetuados 40 ciclos de PCR com a seguinte sequência: 5' – 95 °C; 1' – 95 °C; 1' – 56 °C; 45" – 72 °C; 5' – 72 °C.

Deteção do produto de ADN por eletroforese, gel e agarose

A técnica de eletroforese consiste na separação de moléculas com carga por migração diferencial numa matriz porosa (gel), durante a aplicação de um campo elétrico. O fracionamento das moléculas é efetuado principalmente consoante o seu tamanho e características do gel. A distância de migração das diferentes moléculas varia na razão inversa ao tamanho do fragmento do ADN, isto é, com o número de pares de bases.

De modo a confirmar a amplificação dos segmentos do ADN procedeu-se à deteção do produto por eletroforese em gel de agarose a 2%. Pesou-se 1,4 g de agarose em pó e adicionaram-se 70 µL de TAE 1x. A mistura foi aquecida num micro-ondas até dissolver toda a agarose, seguindo-se um arrefecimento até 50-60 °C. Numa *hotte* adicionaram-se à mistura anterior 2,5 µL de brometo de etídeo a 10 mM, sob agitação para melhor dissolução e homogeneização. O conteúdo foi colocado num compartimento delimitado lateralmente, tendo-se aplicado um "pente" para demarcação dos poços, onde a amostra vai ser

aplicada. Após o gel ficar com consistência sólida removeu-se cuidadosamente o pente e colocou-se o “berço” na tina de eletroforese, submergido o gel em tampão TAE 1x. Procedeu-se à preparação das amostras, adicionando 1,5 µL de tampão de corrida (Azul de Bromofenol) a 5 µL de cada amostra; preparou-se a diluição do marcador de pesos moleculares de 100 pb (NZYDNA Ladder V, NZYtech), tendo-se adicionado 1 µL de marcador de peso molecular (MPM), 1,5 µL de tampão de corrida perfazendo-se depois o volume com 2,5 µL de água. Colocaram-se as amostras e o marcador de pesos moleculares (MPM) diluído nos respectivos poços, regulou-se o gerador para 90 volts e a eletroforese decorreu durante 20 minutos. O gel foi posteriormente observado no transiluminador, fotografado e identificado.

Purificação do produto de PCR por Jet Quick PCR Product Purification Spin Kit (Genomed)

Para garantir que não ocorram interferências na sequenciação é necessário proceder a vários passos de purificação do ADN, de modo a remover os dNTPs e *primers* excedentes das reações anteriores.

Para o efeito iniciou-se a purificação pela diluição de 20 µL da amostra de ADN com 80 µL de tampão H1 (tampão de ligação, constituído por hidróclorido de guanidina e isopropanol). Cada mistura foi aplicada diretamente numa membrana contida numa coluna e colocada num tubo coletor. Foi usada uma membrana com capacidade de adsorção para fragmentos de ADN entre 100 e 1000 pb, uma vez que os fragmentos amplificados relativos aos genes *RAS* possuem entre 280 a 330 pb. Centrifugou-se durante 1' a 12.000 rpm, e eliminou-se o sobrenadante do tubo coletor. De seguida, foram adicionados 500 µL de tampão H2 (tampão de lavagem, contendo NaCl, EDTA, Tris-HCl, diluído em etanol) na coluna, seguindo-se nova centrifugação de 1' a 12.000 xg com rejeição do sobrenadante no tubo coletor. Marcaram-se novos tubos de recolha, transferindo-se para os mesmos a coluna, onde se adicionou, diretamente na malha, 30 µL de água, deixando a eluir por 1'. O passo final consiste na centrifugação a 12.000 rpm durante 2'. Seguidamente recolheu-se o eluído contendo o ADN.

Marcação do ADN com o kit Big Dye™ v1.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Bioscience)

A técnica “*dye terminator sequencing*” (Figura 24) permite a incorporação dos quatro ddNTPs (didesoxinucleótidos) que bloqueiam o alongamento da cadeia a partir do ponto onde o terminador foi inserido, combinado com diferentes sondas fluorescentes na cadeia simples do ADN obtido (<http://web.siumed.edu>).

A presente técnica consiste numa PCR de sequenciação, onde cada reação contém um 1 μL de amostra, 2 μL de tampão do kit, 2 μL de Mix BD1.1 (contendo Taq-polimerase, MgCl_2 e os terminadores *Big Dye*TM), 14 μL de água e 1 μL de *primer*, perfazendo um total de 20 μL de reação. Foram efetuadas reações com o *primer forward* e *primer reverse*, separadamente, de modo a obter a confirmação para cada sequência. Os tubos são colocados no termociclador e sujeitos a 25 ciclos com a seguinte sequência: 10" a 95 °C; 5" a 50 °C; 4' a 60 °C.

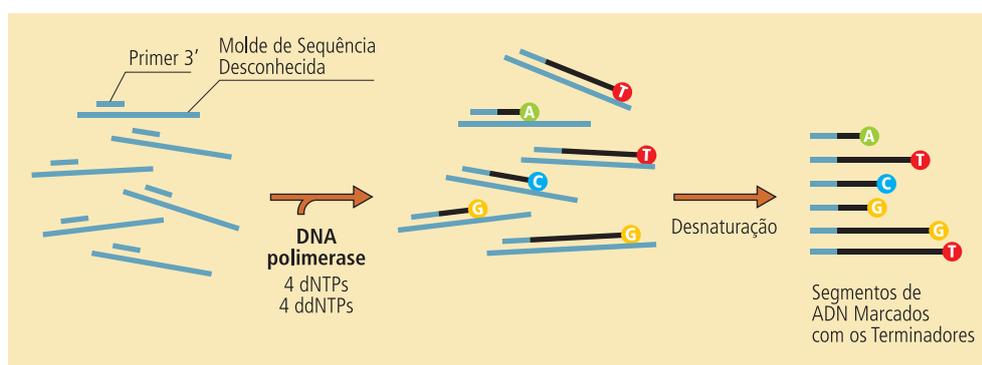


FIGURA 24

Técnica "dye terminator sequencing".

A figura esquematiza a síntese da cadeia de ADN complementar com a incorporação de ddNTPs, segundo a tecnologia "dye terminator sequencing". Esta abordagem permite que o processo se dê numa única reação, tornando-o simultaneamente mais rápido e eficaz.

(Adaptado de <http://web.siumed.edu>).

Purificação com o kit *Illustra*TM *AutoSeq G-50 Dye Terminator Removal*[®] (*GE Healthcare*)

Este processo permite a eliminação dos terminadores em excesso no produto anteriormente obtido através de filtração numa coluna contendo gel *sephadex G-50 para ADN*. Após agitação no vórtex, a coluna é submetida a uma centrifugação durante 1 minuto a 2.000 xg. A aplicação das amostras na coluna deverá ser efetuada imediatamente, não deixando a resina secar. Transferiu-se assim a coluna para um tubo coletor final, aplicando-se toda a amostra no centro da resina. Efetuou-se uma centrifugação a 2.000 xg durante 1', tendo-se recolhido a amostra purificada no tubo coletor.

Sequenciação automatizada por eletroforese capilar

De modo a iniciar o processo de sequenciação, aplicaram-se 17 μL de água bidestilada e 3 μL de produtos do PCR de sequenciação obtido numa placa de sequenciação. Após programação do sequenciador ABI3130 (*Applied Biosystems*TM), procedeu-se à separação dos ADN marcados com os ddNTPs por eletroforese capilar (com resolução de 1 pb). A migração efetua-se em função do tamanho dos fragmentos, o que permite proceder ao alinhamento das bases nucleotídicas das sequências em análise.

Os electrosferogramas obtidos foram analisados e confirmados por comparação com a sequência obtida utilizando o *primer* inverso. A existência de eventuais espectros sobrepostos no electrosferograma foi reavaliada tendo-se considerado significativo quando o “pico” inferior possui uma altura mínima de 25% do “pico” que o sobrepõe.

Comparação da similaridade entre sequências obtidas e publicadas por utilização do programa “Basic Alignment Search Tool”

A verificação da similaridade da sequência obtida com sequências presentes em bases de dados foi efetuada recorrendo ao endereço da Internet www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST, ao programa “Basic Alignment Search Tool” (BLAST), que procede à análise matemática/estatística entre sequências (www.ebi.ac.uk). Após a identificação dos locais de similaridade entre sequências, efetuou-se nova comparação com o eletrosferograma, avaliação das dissimilaridades e correção das sequências obtidas dos genes *N-RAS*, *H-RAS* e *K-RAS*.

3.2.3.2. Gene *FLT3* – Detecção das mutações ITD e D825V

A detecção de mutações no gene *FLT3* foi efetuada no ADN extraído da linha celular F-36P, de acordo com o descrito em 3.1.4.1., através da utilização do Kit *FLT3 Box 1.0 (Genebox)*. Com a utilização desta metodologia foi possível avaliar dois tipos de mutação no gene *FLT3*: as duplicações internas em *tandem* (ITD) e a mutação D835V, relacionada com a troca do aminoácido aspartato (Asp, D) por uma valina (Val, V), na posição 835 pb.

O procedimento deste kit é simples, de análise rápida e quase direta. Utiliza uma placa de PCR que contém *primers* desidratados e vermelho de cresol (um indicador de pH que adquire cor roxa em meio alcalino e amarela em meio básico), permitindo a amplificação específica do segmento do ADN a estudar. A identificação dos fragmentos de ADN é posteriormente efetuada por análise da amostra em eletroforese em gel de agarose a 2%. As placas contêm também um controlo positivo interno, que amplifica o gene *PIC1 (small ubiquitin-like modifier 1)*, originando fragmentos com 790 pb.

Detecção da Mutação ITD no gene *FLT3*

A detecção de duplicações internas em *tandem* (ITD), no gene *FLT3*, foi avaliada por comparação do tamanho dos fragmentos obtidos através da reação de PCR. Considera-se que existe a mutação ITD para fragmentos superiores a 234pb (comprimento do segmento normal), ou seja a forma mutada contém segmentos que excedem 234 pares de bases.

Num *ependorf* efetuou-se a mistura de 30µL de água bidestilada estéril com 15 µL de PCR Master Mix (Tampão NH₄, Cloreto de Magnésio (MgCl₂), Glicerol e Taq ADNpolimerase, agitando-se vigorosamente durante 15 segundos. Seguidamente, transferiram-se 9 µL da mistura anterior para cada poço da placa de PCR a utilizar. Juntou-se então 1 µL de cada amostra de ADN tendo-se adicionado igual quantidade de água para um outro poço, que operou como 'branco'.

A placa foi selada e submetida a PCR, utilizando os seguintes parâmetros: 1 ciclo de 1' a 96 °C (desnaturação); 5 ciclos a 25" a 96 °C (desnaturação) → 45" a 70 °C (emparelhamento) → 30" a 72 °C (extensão); 21 ciclos a 25" a 96 °C (desnaturação) → 45" a 65 °C (emparelhamento) → 30" a 72 °C (extensão); 4 ciclos a 25" a 96 °C (desnaturação) → 1' a 55 °C (emparelhamento) → 2' a 72 °C (extensão); 1' a 72 °C (extensão final).

Os produtos do PCR foram posteriormente identificados e analisados por eletroforese em gel de agarose a 2%, tendo-se utilizado uma voltagem de 115 volts.

Detecção da Mutação Pontual D825V no gene *FLT3*

Para a detecção da mutação pontual D825V no gene *FLT3* utilizada a placa de PCR para a detecção destas mutações, fornecida pelo kit *FLT3* Box 1.0 (*Genebox*). Esta placa encontra-se organizada segundo colunas contendo *primers* para cada um dos alelos a estudar, D ou V. Um controlo positivo interno amplifica o gene *PIC1*, originando fragmentos com 790 pb.

A 14 µL da Master Mix do PCR adicionaram-se 30 µL de água bidestilada estéril, distribuindo-se a mistura por 2 tubos *ependorf*. A um dos tubos foi adicionado 2 µL de ADN, agitando-se vigorosamente. Ao outro tubo foi adicionada igual quantidade de água bidestilada estéril, constituindo o 'branco' para as reações. Pipetaram-se 10 µL da mistura contendo ADN para um poço da placa contendo a mistura para amplificação do alelo D e a mesma quantidade para um poço com mistura para amplificação do alelo V. Procedeu-se do mesmo modo com a mistura contendo a água.

A placa foi selada e colocada no termociclador. Os produtos do PCR foram detetados por eletroforese em gel de agarose a 2%.

3.2.4. Análise do mecanismo de ação dos fármacos anticancerígenos

Para avaliarmos a eficácia do fármaco α -HFPA na inibição da farnesiltransferase recorreremos à expressão de laminas A/C, uma forma frequentemente utilizada como marcador farmacodinâmico de farnesilação.

De igual modo, para analisarmos o efeito da inibição do proteossoma pelo fármaco MG262 recorreremos à análise dos conjugados da ubiquitina, enquanto para a avaliação do efeito hipometilante da DEC utilizámos a MS-PCR.

3.2.4.1. Avaliação da expressão de laminas, conjugados da ubiquitina e moléculas da apoptose, por citometria de fluxo

Para analisar o efeito de inibição do proteossoma e da farnesilação induzida pelos fármacos MG262 e α -HFPA avaliámos, respetivamente, a expressão dos conjugados de ubiquitina e de laminas A/C, recorrendo a anticorpos monoclonais conjugados com fluorocromos. Avaliámos também a expressão de moléculas reguladoras da apoptose como a BAX, BAD, BCL2, survivina, caspase 3, FAS-R, e do ciclo celular como a ciclina D1, conjugados direta e indiretamente com fluocromos.

Para este efeito foram efetuadas incubações das células F-36P com uma densidade 1×10^6 células/mL, durante 48 horas. As concentrações farmacológicas a analisar foram previamente selecionadas com base em curvas dose-resposta, tendo-se avaliado as células incubadas em monoterapia com α -HFPA na concentração de 150 μ M (IC_{50}) e 100 nM de MG262 (IC_{50}), e com as associações farmacológicas de 50 nM de Ara-C e 100 μ M de α -HFPA (4H), de 100 nM de Imatinib com 50 μ M α -HFPA (4H) e ainda de 50 μ M de α -HFPA em adição simultânea com 25 nM de MG262.

A 1×10^6 de células em suspensão, tratadas nas condições anteriormente referidas, adicionou-se 100 μ L de solução A (solução fixante) num tubo de citómetro, e incubou-se durante 10 minutos à temperatura ambiente, no escuro. Adicionou-se 1 mL de PBS e centrifugou-se a 300 xg durante 5 minutos, decantando-se depois o sobrenadante. Seguidamente adicionou-se 1 μ g de anticorpo anticonjugados de ubiquitina conjugado com FITC, 1 μ g de anticorpo anti-lamina A/C conjugado com PE, e 100 μ L de solução B (solução permeabilizante), homogeneizando com a micropipeta, e incubou-se no escuro, à temperatura ambiente, durante 15 minutos. Efetuaram-se duas lavagens consecutivas, por adição de 1 mL de PBS e centrifugação a 300 xg durante 5 minutos, desprezando o sobrenadante. O sedimento foi então ressuspensão em

400 μL de PBS, ficando pronto para a leitura no citómetro de fluxo.

O mesmo protocolo foi efetuado para as moléculas BCL2, BAX, caspase 3, ciclina D1 e survivina.

Para a marcação da proteína BAD, foi necessária a utilização de um anticorpo secundário, executando-se, após a incubação do anticorpo primário, a adição de 20 μL de anticorpo secundário ligado a APC, diluído em PBS (1/10). A incubação decorreu durante 20' à temperatura ambiente e na ausência de luz, seguindo-se duas lavagens consecutivas PBS (como descritas anteriormente) e ressuspensão final em 500 μL do mesmo.

Para a marcação do recetor do FAS, uma molécula existente na membrana celular, procedeu-se de acordo com o protocolo a seguir descrito. A uma suspensão celular contendo 1×10^6 células foi adicionado 1 mL de PBS e centrifugou-se a 1.500 xg durante 5'. Retirou-se o sobrenadante e adicionou-se 10 μL de anticorpo primário e incubou-se no escuro, à temperatura ambiente, durante 15'. Adicionou-se 1 mL de PBS e centrifugou-se a 1.500 xg durante 5', desprezando o sobrenadante. Procedeu-se à adição de 20 μL de anticorpo secundário diluído em PBS (1/10) e incubou-se durante 20' à temperatura ambiente, no escuro. Após a adição de 1 mL de PBS, centrifugou-se a 1.500 xg durante 5'. A seguir, descartou-se o sobrenadante e ressuspendeu-se o sedimento em 500 μL de PBS.

Foram construídos histogramas e *dot plots* para as condições do estudo, após a aquisição de dez mil eventos por cada condição.

Os resultados são expressos em % de células que expressam cada uma das moléculas em estudo, bem como, em média de intensidade de fluorescência e representam a média \pm desvio padrão de 3 ensaios independentes.

3.2.4.2. Análise do perfil de metilação dos genes *p15* e *p16* por MS-PCR

Extração e quantificação do ADN genómico

A extração de ADN genómico das células F-36P foi realizada através do protocolo de extração de ADN utilizado para amostras de sangue desenvolvido por Bartlett & White (Bartlett, 2003), como descrito na secção 3.1.4.1.

Análise do perfil de metilação por MS-PCR

Para a análise do perfil de metilação dos genes *p15* e *p16* foi realizado um PCR específico de metilação, o MS-PCR, cujo procedimento está descrito na secção 3.1.4.2.

3.3. Análise estatística

Colocamos as seguintes hipóteses de estudo:

H_{1a} : há diferença estatística entre os subtipos para índices de prognóstico, parâmetros hematológicos, bioquímicos, metilação de genes, polimorfismos da MTHFR, célula estaminal e moléculas da apoptose.

Apresentamos aqui a hipótese estatística alternativa e não a nula por facilidade de escrita, sendo que a hipótese nula é por definição a contrária da apresentada. Estas hipóteses resumem as hipóteses devidas para cada parâmetro individualmente que, por serem idênticas, e por facilidade de leitura, não são apresentadas.

H_{1b} : há diferença estatística entre os indivíduos com evolução para LMA e os outros para índices de prognóstico, parâmetros hematológicos, bioquímicos, metilação de genes, polimorfismos da MTHFR, célula estaminal e moléculas da apoptose.

H_{1c} : há diferença estatística entre os indivíduos que morreram e os outros para índices de prognóstico, parâmetros hematológicos, bioquímicos, metilação de genes, polimorfismos da MTHFR, célula estaminal e moléculas da apoptose.

H_{1d} : há associação estatística entre a amostra e o grupo de controlo para os polimorfismos da MTHFR.

Os testes usados foram os do Qui-Quadrado, para a independência, o Mann-Whitney para 2 variáveis ordinais ou contínuas, o de Kruskal-Walis para mais do que duas variáveis, e a correlação de Spearman para a associação de duas variáveis ordinais. Na aplicação de testes temos de especificar um valor para α (nível de significância) e normalmente utiliza-se $\alpha=0,05$, que é uma medida de erro ligada ao acaso.

O valor de α representa a probabilidade máxima de cometermos um erro quando rejeitamos a hipótese nula. Em ciências da saúde, uma probabilidade de 0,05 de cometer um erro na rejeição da hipótese nula é, geralmente, considerada uma probabilidade de erro aceitável.

O teste de independência do Qui Quadrado, simbolizado por χ^2 é um teste de hipóteses não paramétrico que se destina a encontrar um valor da dispersão para duas variáveis nominais, avaliando a sua associação. O princípio básico deste método é comparar proporções, isto é, as possíveis divergências entre as frequências observadas e esperadas para um certo evento. (Maroco J., 2003). Quando o valor esperado das células é menor ou igual a 5, é usado o teste exato de Fisher para examinar a significância da associação entre duas variáveis.

O teste de Wilcoxon-Mann-Whitney, ou simplesmente teste de Mann-Whitney, é o teste não-paramétrico adequado para comparar as funções de distribuição de uma variável pelo menos ordinal medida em duas amostras independentes. Este teste pode também ser utilizado como alternativa ao teste t-Student para amostras independentes, nomeadamente quando os pressupostos deste teste não são válidos.

O teste de Kruskal-Wallis (KW) é uma extensão do teste de Wilcoxon-Mann-Whitney. É um teste não paramétrico (ANOVA não paramétrica) utilizado para comparar três ou mais grupos. É usado para testar a hipótese nula de que todas as populações possuem funções de distribuição iguais contra a hipótese alternativa de que ao menos duas das populações possuem funções de distribuição diferentes.

Na correlação de Spearman (*Spearman's rank-order correlation*) o coeficiente mede a força da associação entre duas variáveis e pode ser usado com o pressuposto duma relação monotónica entre as variáveis que podem ser ordinais, intervalares ou de razão.

Odds ratio é uma medida relativa que permite a comparação entre o grupo de estudo em relação ao grupo de controlo.

O desempenho de um teste, ou a precisão de um teste para discriminar casos de doença de casos normais é avaliada utilizando a curva *Receiver Operating Characteristic* (ROC) A área sob a curva ROC é uma medida de quão bem um parâmetro pode distinguir entre dois grupos de diagnóstico (doente/normal).

A análise de sobrevivência foi efetuada recorrendo à metodologia de Kaplan-Meier e as diferenças foram avaliadas pelos métodos de Log-rank e Wilcoxon.

4.

Resultados

4.1. Resultados na amostra de doentes com SMD

4.1.1. Caracterização da amostra

A amostra é constituída por 102 doentes de raça caucasiana com o diagnóstico de SMD *de novo*. Os estudos foram efetuados em amostras de sangue periférico e medula óssea, recolhidos durante os procedimentos de diagnóstico, num período de 55 meses.

A análise da distribuição por sexo revela um maior número de doentes do sexo feminino (58 doentes) em comparação com o número de doentes do sexo masculino (44 doentes) (Figura 25), com uma relação masculino/feminino de 0,8.

Os doentes têm uma mediana de idades de 74 anos (22-89 anos), com uma média de 73,1 anos (Figura 25), não se observando diferença estatística entre as idades dos homens e das mulheres (Teste de Mann-Whitney p – value > 0,05).

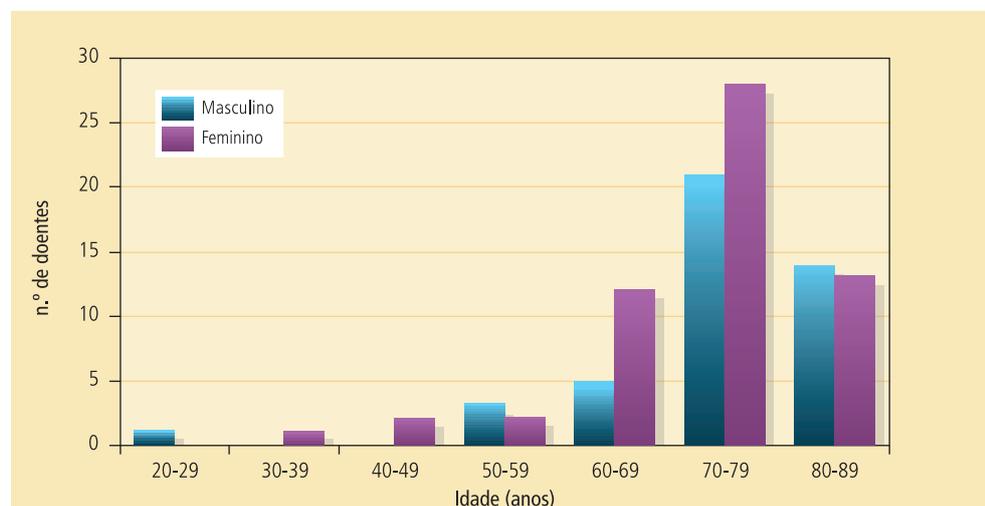


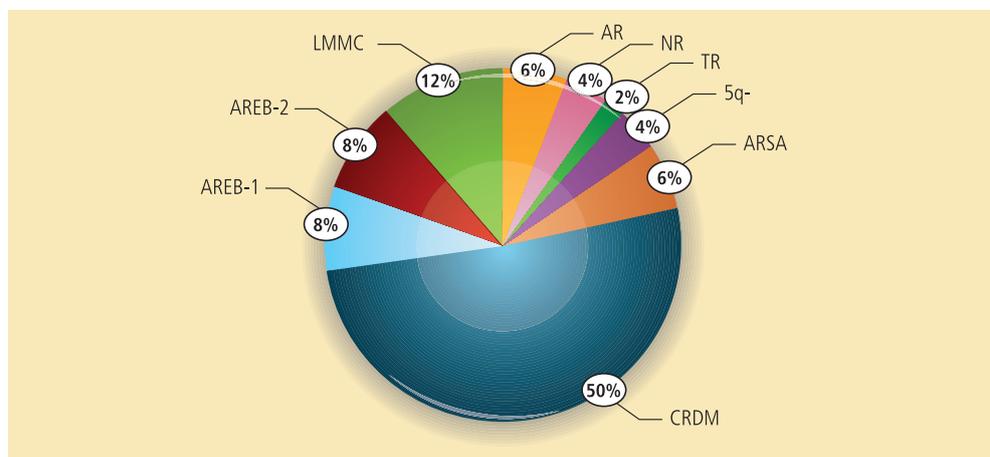
FIGURA 25

Caracterização da população de doentes com SMD por sexo e idade.

De acordo com a classificação da Organização Mundial de Saúde (OMS) de 2008 esta população de doentes com SMD está distribuída por 7 subtipos: 12 doentes (11,76%) com anemia refractária com displasia unilinha (CRDU); 52 doentes (50,98%) com citopenia refractária com displasia multilinha (CRDM); 6 doentes (5,88%) com anemia refractária com sideroblastos em anel (ARSA); 8 doentes (7,84%) com anemia refractária com excesso de blastos tipo 1 (AREB-1); 8 doentes (7,84%) com anemia refractária com excesso de blastos tipo 2 (AREB-2); 4 doentes (3,92%) com Síndrome 5 q- e 12 doentes (11,76%) com leucemia mielomonocítica crónica (LMMC) (Figura 26). Como podemos verificar na figura 26, a maioria dos doentes pertence ao subtipo CRDM, representando metade da população em estudo (52 doentes; 51%).

FIGURA 26
Caracterização da população de doentes com SMD segundo a OMS 2008.

AR - anemia refratária;
ARSA - anemia refratária com sideroblastos em anel;
NR - neutropenia refratária;
TR - trombocitopenia refratária;
5q- - síndrome 5q-;
AREB - anemia refratária com excesso de blastos;
LMMC - leucemia mielomonocítica crónica.



A avaliação do prognóstico foi efetuada utilizando o *International Prognostic Scoring System (IPSS)*, o *Revised International Prognostic Scoring System (IPSS-R)* e o *World Health Organization (WHO) Prognostic Scoring System (WPSS)*.

Para a determinação do IPSS foram utilizados os fatores de prognóstico descritos na literatura (P. Greenberg *et al.*, 1997), isto é, a percentagem de blastos na medula, as alterações citogenéticas e o número de citopenias (Tabela 8). Este score permitiu a distribuição dos doentes com citogenética conclusiva (87 doentes), em 4 categorias de risco: baixo (37 doentes; 42,53%); intermédio-1 (39 doentes; 44,83%), intermédio-2 (10 doentes; 11,49%) e alto (1 doente; 1,49%) (Figura 27). É evidente o predomínio de doentes com IPSS baixo e intermédio-1 representando 87,4% da população de doentes com SMD incluídos no estudo (76 doentes), que constituem o grupo denominado de baixo risco utilizado na prática clínica para decisão terapêutica.

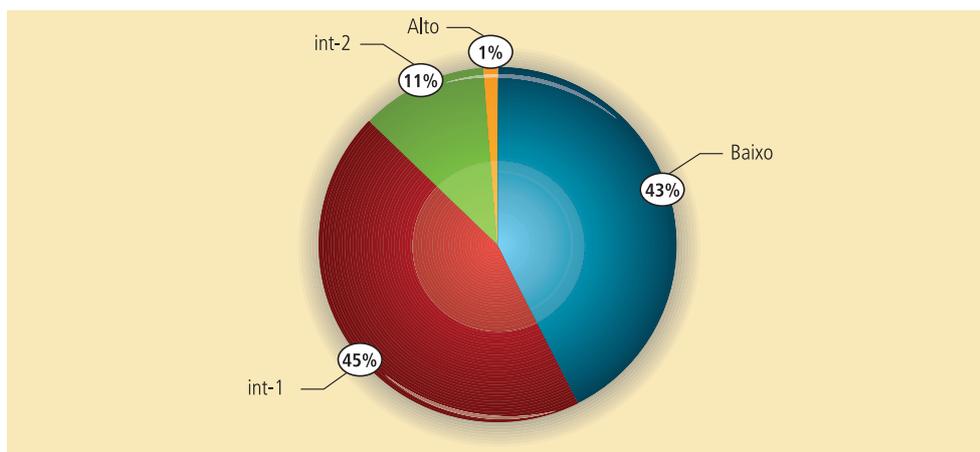


FIGURA 27

Caracterização da população de doentes com SMD, segundo o IPSS.

Também foi utilizado o IPSS-R, para o qual foram utilizados os seguintes parâmetros: citogenética, % de blastos medulares, valores de hemoglobina, plaquetas e neutrófilos (Tabela 10). A utilização deste *score* proposto em 2012 (P. L. Greenberg *et al.*, 2012) permitiu a classificação de 86 doentes em 5 grupos de risco: 20 doentes de muito baixo risco (23,96%), 32 doentes de baixo risco (37,2%), 19 doentes de risco intermédio (22,04%), 12 doentes de alto risco (13,95%) e 3 doentes de muito alto risco (3,48%) (Figura 28). Em 16 doentes não foram aplicados estes *scores* por citogenética inconclusiva ($n=15$) ou doentes com LMMC com contagem de leucócitos superior a 12 G/L ($n=1$) (taxa de exclusão 15,7%). Mesmo com a divisão das categorias de risco e a introdução de um grupo de risco intermédio, mantém-se o predomínio de doentes de baixo risco (52 doentes; 60,5%).

O WPSS (Malcovati, 2007), para além de contemplar a análise citogenética, utiliza o subtipo segundo a classificação da OMS e a necessidade transfusional (Tabela 9). De acordo com este índice dividimos a amostra em 5 grupos:

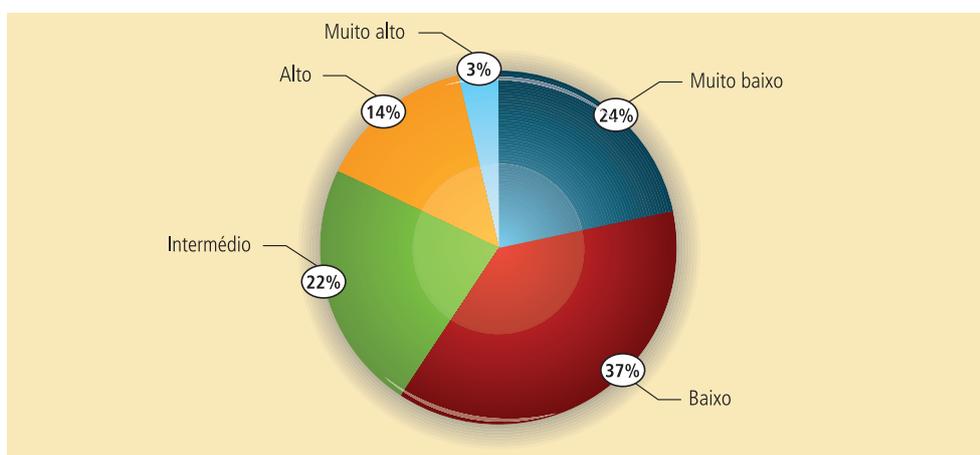


FIGURA 28

Caracterização da população de doentes com SMD, segundo o IPSS-R.

muito baixo (16 doentes; 20,78%), baixo (27 doentes; 35,06%), intermédio (20 doentes; 25,97%), alto (13 doentes; 16,88%) e muito alto (1 doente; 1,3%). À semelhança dos scores anteriores em 25 doentes, não foi possível a aplicação do WPSS (taxa de exclusão 24,5%), excluídos por citogenética inconclusiva ou diagnóstico de LMMC (Figura 29).

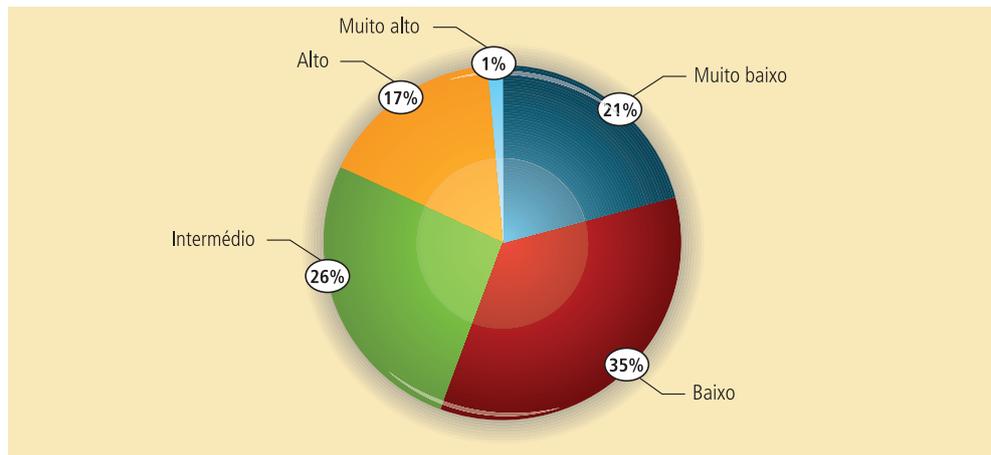


FIGURA 29

Caracterização da população de doentes com SMD, segundo o WPSS.

Na análise dos índices de prognóstico nos vários tipos da OMS, verificou-se existir uma diferença estatística entre os subtipos da OMS para os 3 índices de prognóstico, com um valor – $p < 0,05$ (Figura 30). Ou seja, os doentes com os subtipos CRDM e AREB-2 apresentam valores de IPSS, IPSS-R e WPSS superiores aos doentes dos outros subtipos ($p < 0,05$) (Figuras 30A, B e C, respetivamente). Também os doentes com o subtipo AREB-1 têm pontuações de IPSS-R e WPSS superiores quando comparados com os doentes dos restantes subtipos, ainda não citados ($p < 0,05$). Quanto aos doentes pertencentes ao subtipo LMMC, tal como os subtipos AREB-1 e -2 e CRDM, têm valores de IPSS-R significativamente mais elevados ($p < 0,05$).

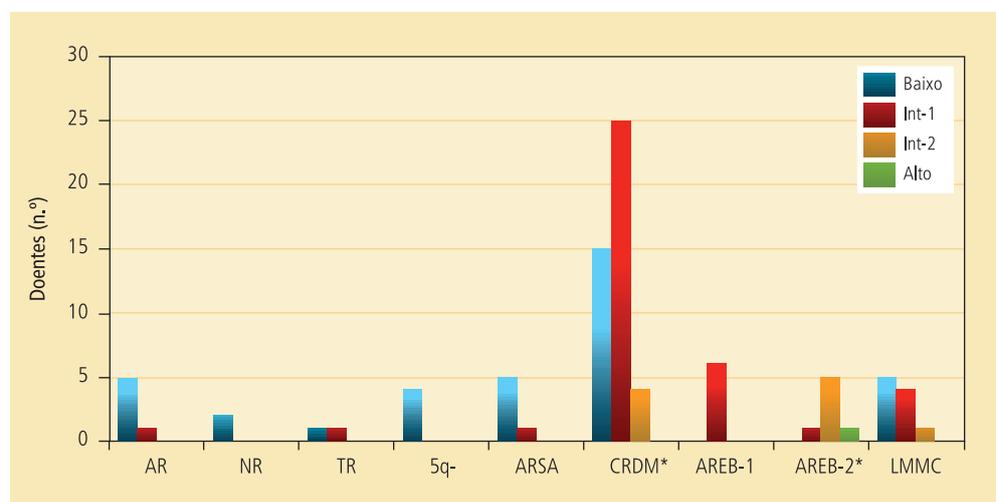


FIGURA 30A

Distribuição do IPSS segundo os subtipos OMS.

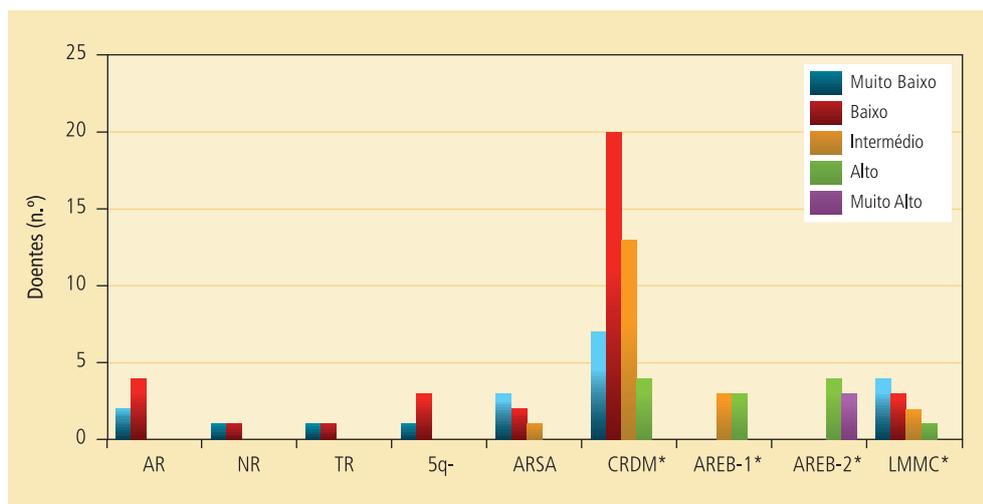


FIGURA 30B

Distribuição do IPSS-R segundo os subtipos OMS.

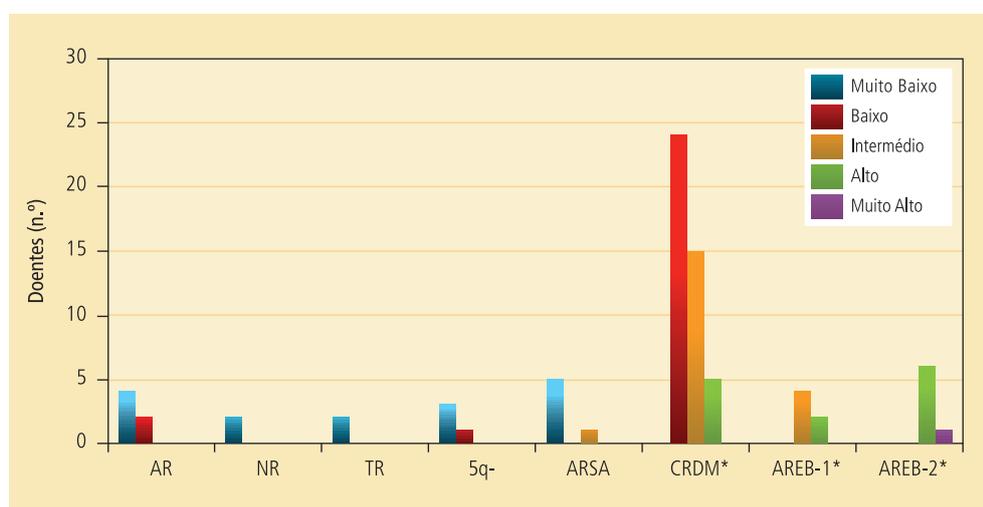


FIGURA 30C

Distribuição do WPSS segundo os subtipos OMS.

4.1.2. Caracterização clínica, laboratorial e molecular dos doentes com SMD segundo o subtipo da OMS

Nas tabelas A1 e A2 (anexos) estão representadas as características clínico-laboratoriais e moleculares estudadas nos doentes com SMD e agrupadas por subtipo OMS. Foram analisadas as médias, desvios padrão, medianas e frequências dos parâmetros para cada subtipo da OMS.

Na tabela A1 estão representados os índices de prognóstico (IPSS, IPSS-R e WPSS), os parâmetros hematológicos (leucócitos, neutrófilos, hemoglobina, plaquetas, blastos e sideroblastos em anel) e bioquímicos (ácido fólico, vitamina B12, LDH, ferritina, eritropoietina e β 2-microglobulina) e a análise citogenética.

Na tabela A2 estão representadas outras variáveis estudadas nesta amostra: idade, género, metilação de genes, polimorfismos da MTHFR, célula estaminal e moléculas da apoptose, igualmente agrupadas segundo os subtipos da OMS.

As tabelas A3 e A4 replicam as tabelas A1 e A2 mas apenas para o subgrupo de 11 indivíduos que evoluiu para LMA.

A tabela A5 foi utilizada para o cálculo de um novo índice de Progressão e representa uma pontuação que traduz uma maior probabilidade de evolução para LMA. Este índice é calculado através da soma das variáveis representadas na tabela A1 (parâmetros hematológicos e bioquímicos, célula estaminal, perfil de metilação e moléculas de apoptose) alteradas, em que cada variável contribui com um ponto quando anormal para cada subtipo.

4.1.2.1. Análise de parâmetros hematológicos

Os parâmetros hematológicos analisados foram: leucócitos, neutrófilos, hemoglobina, plaquetas, % de blastos e de sideroblastos em anel na medula. Todos estes valores foram analisados no geral e para cada subtipo da OMS 2008 e depois comparados entre os vários subtipos.

Assim, analisou-se a existência de diferença estatística entre os subtipos da OMS 2008 para os parâmetros hematológicos (hipótese H1a), tendo-se verificado diferença estatística para as variáveis leucócitos, neutrófilos, hemoglobina, plaquetas, blastos e sideroblastos em anel ($p < 0,05$) (Figuras 31 a 33).

Como podemos verificar na Figura 31, os doentes com LMMC são os que apresentam, em média, uma contagem de leucócitos mais elevada (8 G/L) em relação aos outros subtipos ($p < 0,05$), enquanto os doentes com os subtipos AREB e CRDM têm leucopenia (média de 1,2 e 1,9 G/L, respetivamente). A contagem absoluta de neutrófilos é também inferior nos subtipos AREB e CRDM e, como seria de esperar, na NR ($p < 0,05$).

Os doentes com a Síndrome 5q- apresentam em média um valor de hemoglobina mais baixo, em oposição aos doentes dos outros subtipos de SMD ($p < 0,05$). Estes apresentam valores de hemoglobina superiores ou iguais a 10 g/dL, sendo os doentes com NR e TR os que apresentam valores de hemoglobina mais elevados (superior a 12 g/dL) (Figura 32). Pelo contrário, os doentes com TR são os que apresentam valores de plaquetas mais baixos, como seria de esperar, à semelhança dos doentes com os subtipos CRDM e AREB (valor médio de plaquetas na AREB-2 < 50 G/L) ($p < 0,05$) (Figura 33). Os doentes com Síndrome 5q-, AR e ARSA apresentam plaquetas em número normal.

Como seria de esperar a contagem de blastos medulares é superior nas AREB e a contagem de sideroblastos em anel é superior na ARSA ($p < 0,05$).

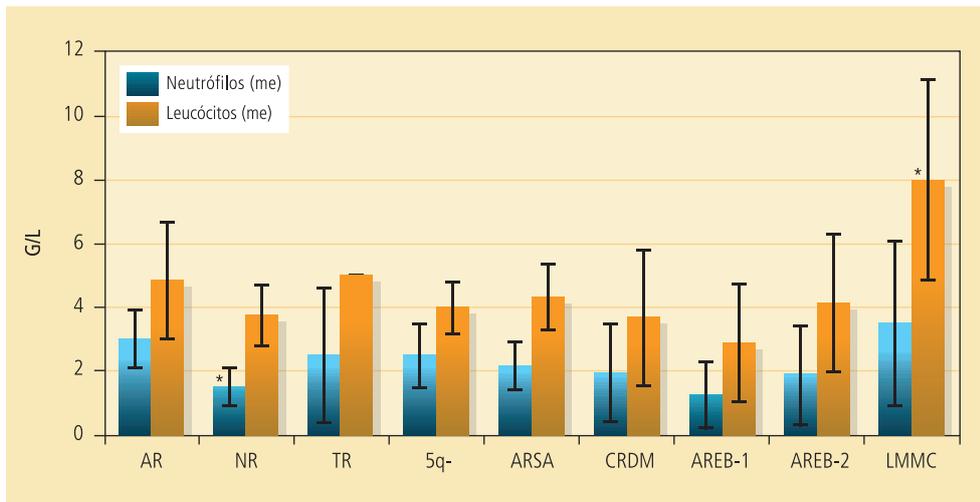


FIGURA 31

Valores de leucócitos e neutrófilos dos doentes com SMD, segundo os subtipos OMS.

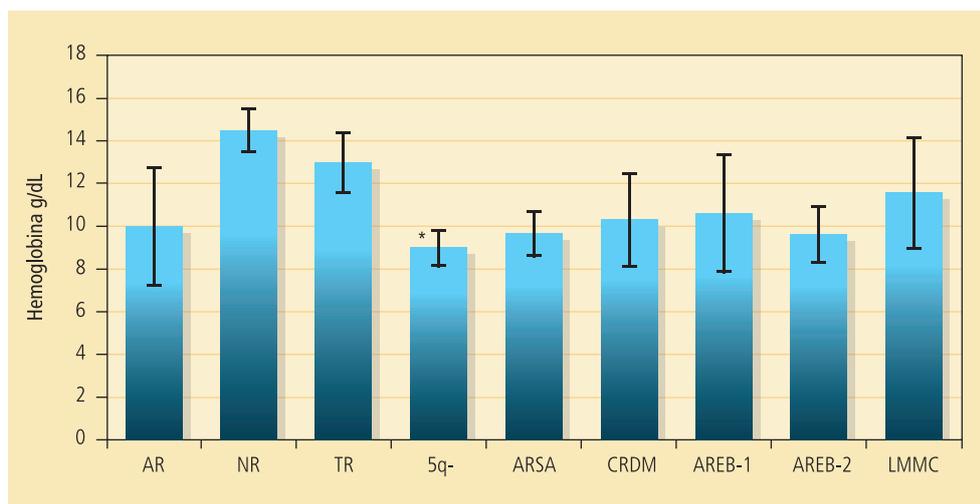


FIGURA 32

Valores de Hemoglobina dos doentes com SMD, segundo os subtipos OMS.

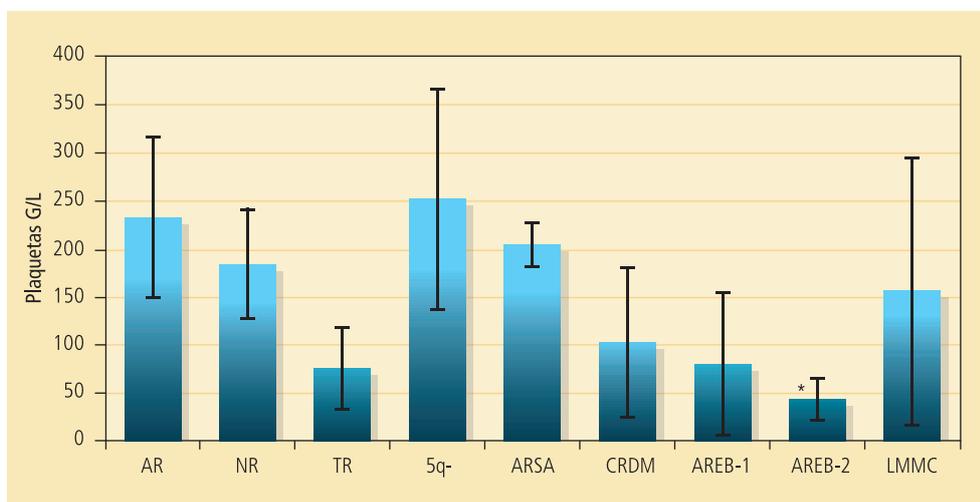


FIGURA 33

Valores de plaquetas dos doentes com SMD, segundo os subtipos OMS .

4.1.2.2. Análise do perfil citogenético

Na avaliação do perfil citogenético considerou-se a presença de um cariótipo normal quando foram observadas 20 metafases 46 XX ou XY. No entanto, 15 doentes não apresentaram resultados conclusivos por citogenética convencional, embora 11 destes apresentem um estudo citogenético por FISH normal, ou seja, a pesquisa das quatro alterações citogenéticas mais frequentes [trissomia 8, del(7q), del(5q) e del(20q)] foi negativa.

Para além do cariótipo normal foram detetadas outras alterações citogenéticas como a trissomia do cromossoma 8, a monossomia do 5 e a deleção do 5q, a deleção do 7q, a deleção do 20q, a ausência do cromossoma Y e o cariótipo complexo, quando observadas 3 ou mais alterações citogenéticas. A descrição deste perfil segundo os subtipos da OMS 2008 está representada na figura 34.

Na nossa amostra, 15 doentes (14,7%) não apresentam resultado citogenético conclusivo, embora 11 deles apresentem um FISH normal para as quatro alterações citogenéticas pesquisadas, conforme referido. A maioria dos doentes (62 doentes ou seja 71,3%) tem um cariótipo normal, sendo a maior parte do subtipo CRDM (43,5% dos doentes). Em 13 doentes (14,9%) foi evidenciada a trissomia do cromossoma 8, na maioria dos casos isoladamente (8 doentes), mas também associada a alterações do cromossoma 5 (n=4), à deleção do 7q (n=1) e à ausência do cromossoma Y (n=1).

Além do subtipo CRDM ser o que apresenta maior número de doentes com cariótipo normal é também o que apresenta um maior número de doentes com trissomia do cromossoma 8, embora as diferenças encontradas não tenham significado estatístico.

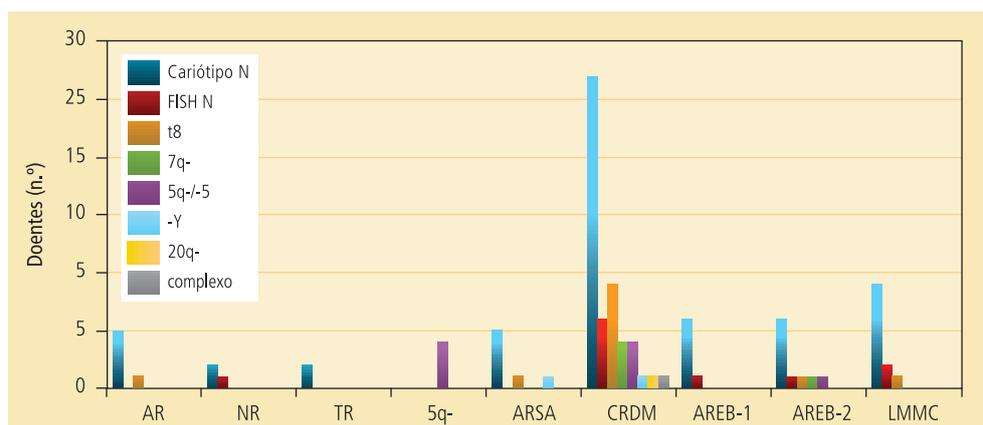


FIGURA 34

Distribuição das alterações citogenéticas pelos subtipos OMS 2008.

4.1.2.3. Análise dos parâmetros bioquímicos

Os parâmetros bioquímicos analisados nesta amostra foram o doseamento sérico do ácido fólico, da vitamina B12, da ferritina, da eritropoietina, da LDH e da β 2-

microglobulina. Tal como para os parâmetros hematológicos, foi calculada a média, a mediana e o desvio padrão para cada variável, e efetuada a comparação nos diferentes subtipos da OMS 2008, como representado na Tabela A1 dos anexos.

Como podemos observar na Tabela A1, os doentes com o subtipo NR apresentam os valores mais baixos de ácido fólico, vitamina B12, ferritina e β 2-microglobulina. Pelo contrário, nos doentes com Síndrome 5q- verificou-se a presença de níveis séricos de ácido fólico, eritropoietina e β 2-microglobulina mais elevados. A β 2-microglobulina encontra-se, em média, elevada nos doentes com AR, Síndrome 5q-, CRDM e AREB-1. Este parâmetro apresenta uma média mais baixa no subtipo ARSA ($p < 0,05$). A ferritina encontra-se mais elevada nos subtipos ARSA e AREB-2. Os doentes do subtipo CRDU, ou seja os doentes com AR, NR e TR, apresentam médias de eritropoietina significativamente mais baixas em relação aos doentes dos outros subtipos ($p < 0,05$). A LDH é ligeiramente superior nos doentes com AREB-2. Contudo, as diferenças observadas apresentam significado estatístico, entre os subtipos da OMS 2008, para os parâmetros bioquímicos (hipótese H1a), eritropoietina e a β 2-microglobulina ($p < 0,05$) (Figura 35 e 36). Ou seja, verificámos que os doentes pertencentes ao subtipo ARSA apresentam, em média, valores de β 2-microglobulina inferiores aos dos doentes dos restantes subtipos; e que os doentes do subtipo NR têm, em média, valores de eritropoietina inferiores aos dos doentes com os outros subtipos.

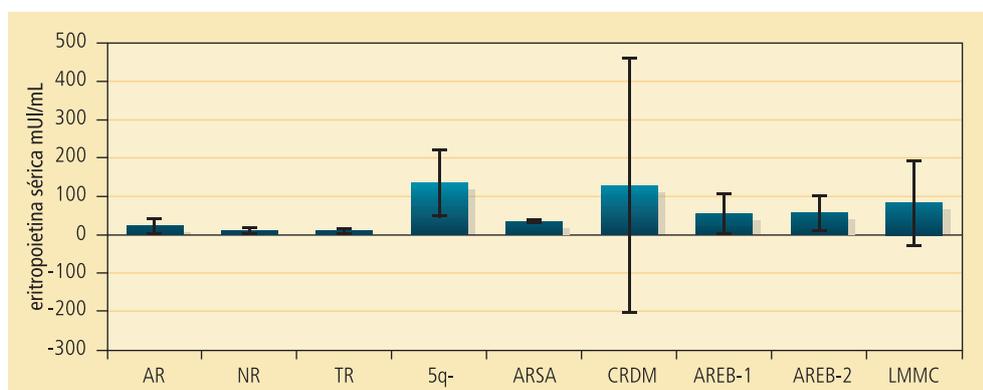


FIGURA 35

Valores de eritropoietina nos doentes com SMD, segundo os subtipos OMS.

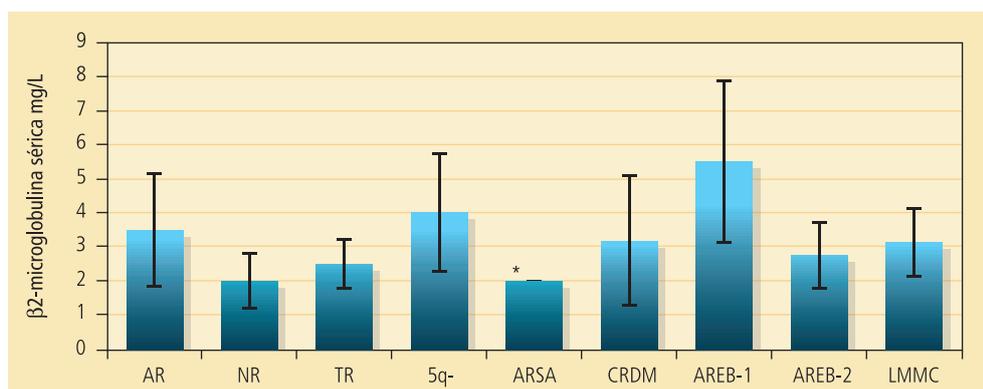


FIGURA 36

Valores de β 2-microglobulina nos doentes com SMD, segundo os subtipos OMS.

4.1.2.4. Análise do perfil de metilação

Nos doentes com SMD incluídos no nosso estudo foi analisado o *status* de metilação dos genes reguladores do ciclo celular e/ou apoptose *p15*, *p16*, *p53*, *DAPK* e, os recetores do *TRAIL*, *R1*, *R2*, *R3* e *R4*, assim como um gene envolvido na reparação do ADN, *MGMT*. O *status* de metilação dos genes *p15* e *p16* foi avaliado em todos os doentes; enquanto a metilação dos restantes genes foi avaliada em 78 dos 102 doentes (taxa de exclusão de 23,5%). Os genes *p53* e *MGMT* não estavam metilados em nenhum dos doentes testados. Por outro lado, os genes *p15* e *DAPK* encontram-se metilados em mais de 50% dos doentes estudados (55,9% e 53,8%, respetivamente), o *p16* e o *TRAIL-R1* e *R2* em mais de 20% dos doentes (24,5%, 25,6% e 24,4%, respetivamente), enquanto o *TRAIL-R3* e *R4* apenas se encontram metilados, respetivamente, em 11,5% e 17,9% dos doentes (Figura 37).

Posteriormente, fomos analisar o perfil de metilação dos genes referidos nos vários subtipos SMD da OMS (Figuras 38 e 39).

A metilação do gene *p15* é mais frequente nos doentes com Síndrome 5q- (75%), AR (67%) e CRDM (64%) e menos frequente nos doentes com o subtipo AREB-2 (13%). Também o *p16* se encontra mais frequentemente metilado na Síndrome 5q- e na TR (50%), em oposição ao subtipo LMMC, em que apenas 8% dos doentes apresentam este gene metilado. Quanto ao gene *DAPK*, verificou-se que a maior parte dos doentes pertencentes aos subtipos AREB-1, ARSA, NR e LMMC apresentam este gene metilado (83%, 83%, 70% e 67%). Em oposição, os doentes com os subtipos AREB-2 e TR não apresentam metilação deste gene (Figura 38). Nos restantes subtipos, ou seja na AR, CRDM e Síndrome 5q-, a percentagem de doentes que apresenta este gene metilado varia entre 33% e 50% (Figura 38).

Quanto aos recetores do TRAIL pró-apoptóticos, *R1* e *R2*, 67% dos doentes com NR apresentam estes genes metilados. Metade dos doentes com TR e Síndrome 5q- têm o *R1* metilado; e metade dos doentes com AREB-1 apresenta o *R2* metilado. Nos doentes pertencentes aos subgrupos AR, AREB-1 e 2 e LMMC não se verificou metilação do recetor *R1*; e nos doentes pertencentes aos subgrupos AR, TR, Síndrome 5q- e AREB-2 não se constatou metilação de *R2*.

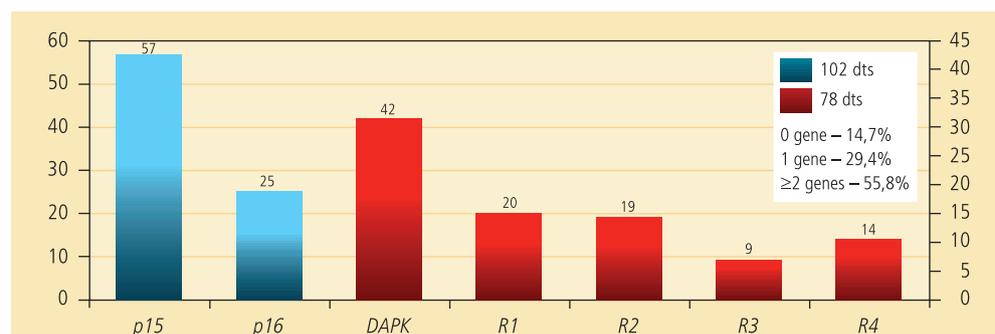


FIGURA 37

Avaliação da metilação dos genes *p15*, *p16*, *DAPK*, *R1*, *R2*, *R3* e *R4* em doentes com SMD.

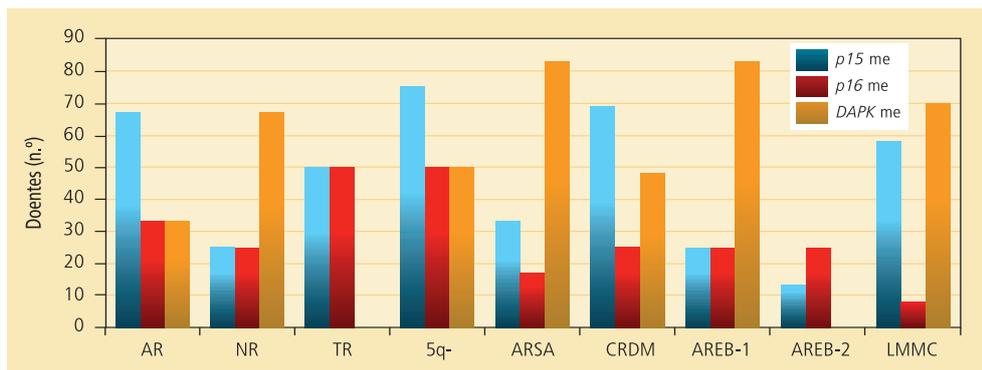


FIGURA 38

Perfil de metilação dos genes *p15*, *p16* e *DAPK* segundo os subtipos OMS.

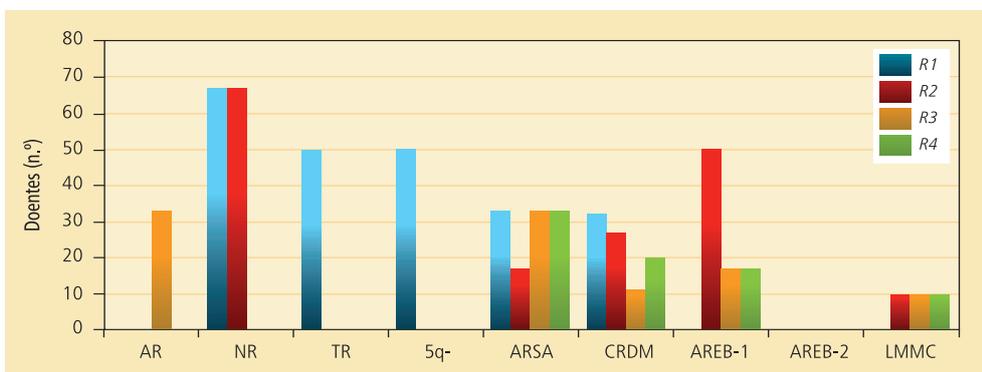


FIGURA 39

Perfil de metilação dos recetores do *TRAIL* segundo os subtipos OMS.

Os recetores antiapoptóticos do *TRAIL-R3* e *R4*, mostram um perfil de metilação diferente. O *R3* está metilado apenas em 33% dos doentes com *ARSA*, enquanto nenhum doente pertencente aos subtipos Síndrome 5q-, *CRDU* e *AREB-2* apresenta este gene metilado. O *R4* também está metilado em 33% dos doentes com *ARSA* e também na mesma percentagem de doentes com *AR*. Em oposição, nenhum doente com *NR*, *TR*, Síndrome 5q- e *AREB-2* apresenta metilação deste gene (Figura 39).

Em suma, no geral, embora sem significado estatístico, é evidente a maior frequência de genes metilados nos subtipos de SMD sem excesso de blastos.

4.1.2.5. Análise das moléculas de apoptose

O estudo das proteínas envolvidas nas vias de apoptose foi efetuado na maioria dos doentes (99 doentes; taxa de exclusão de 2,94%), através da determinação por citometria de fluxo da expressão (MIF) e da percentagem de células que expressam as moléculas membranares e citoplasmáticas com funções pró- e anti-apoptóticas. As proteínas pró-apoptóticas analisadas foram as proteínas *BAX*, *TRAIL-R1* e *R2*, *FAS* ligando, *caspase 3*, *citocromo C* e *p53* e as anti-apoptóticas foram a *survivina*, *BCL2*, *TRAIL-R3* e *R4*.

Os resultados estão representados nas figuras 40 a 42 tendo em linha de conta a localização membranar e citoplasmática das proteínas anti-apoptóticas (Figura 40) e das pró-apoptóticas (Figura 41), além da razão entre estes dois grupos de proteínas reguladoras da apoptose (Figuras 42).

Como podemos verificar na figura 40, os doentes com AREB-2 são os que apresentam tendencialmente menor percentagem de células a expressar os recetores anti-apoptóticos do TRAIL, -R3 e -R4 (7,6% e 18,9%, respectivamente) (Figura 40A). Contudo, é o subtipo de SMD que tem maior percentagem de células a expressar survivina (17,6%) (Figura 40B) e menor de TRAIL-R1 e R2 (Figura 41A), citocromo C e caspase 3 (17,8%, 8,1%, 2,7% e 2,9%, respectivamente) (Figura 41B). Apenas as diferenças encontradas para a caspase 3 são estatisticamente significativas ($p < 0,05$), no que diz respeito ao subtipo AREB-2. A percentagem de células que expressa caspase 3 varia desde 8,4%, nos doentes com CRDM, a 20,7% nos doentes com NR (Figura 41B), ou seja é cerca de 2,9 vezes a 10,4 vezes superior em relação aos doentes com AREB-2.

Verificou-se diferença estatística entre AREB-2 e os outros subtipos somente para a caspase 3 (hipótese H1a).

FIGURA 40A

Distribuição das moléculas anti-apoptóticas membranares segundo os subtipos da OMS.

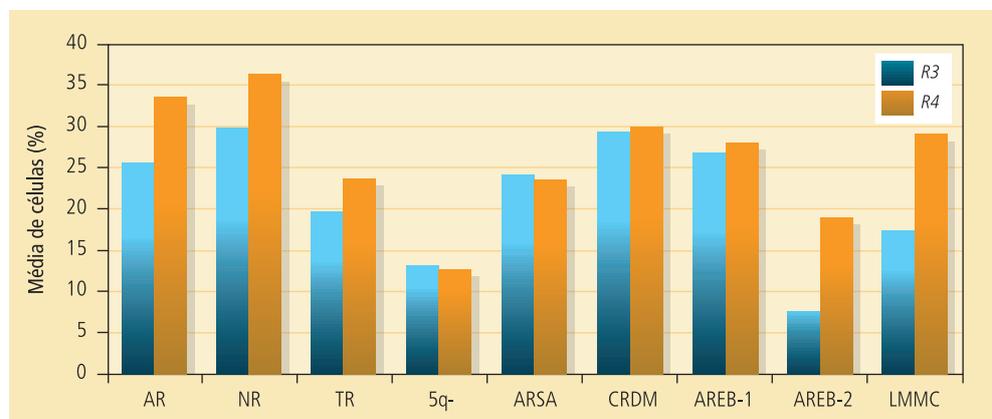
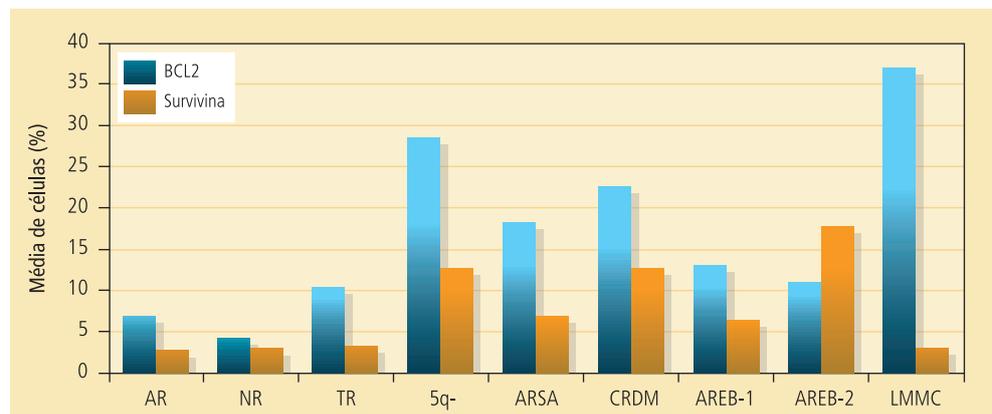


FIGURA 40B

Distribuição das moléculas anti-apoptóticas citoplasmáticas segundo os subtipos da OMS.



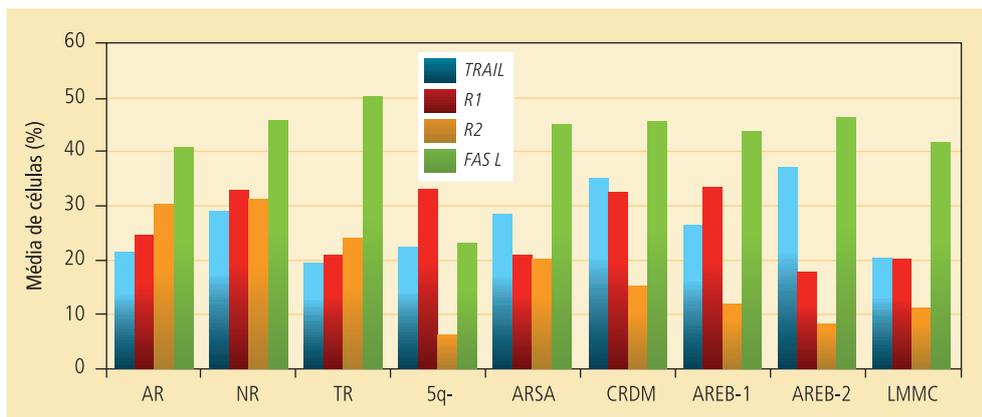


FIGURA 41A

Distribuição das moléculas pró-apoptóticas membranares segundo os subtipos da OMS.

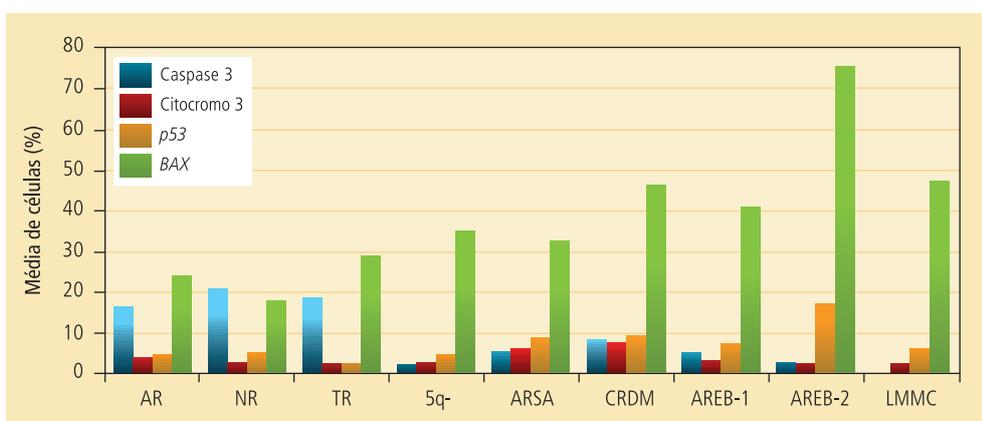


FIGURA 41B

Distribuição das moléculas pró-apoptóticas citoplasmáticas segundo os subtipos da OMS.

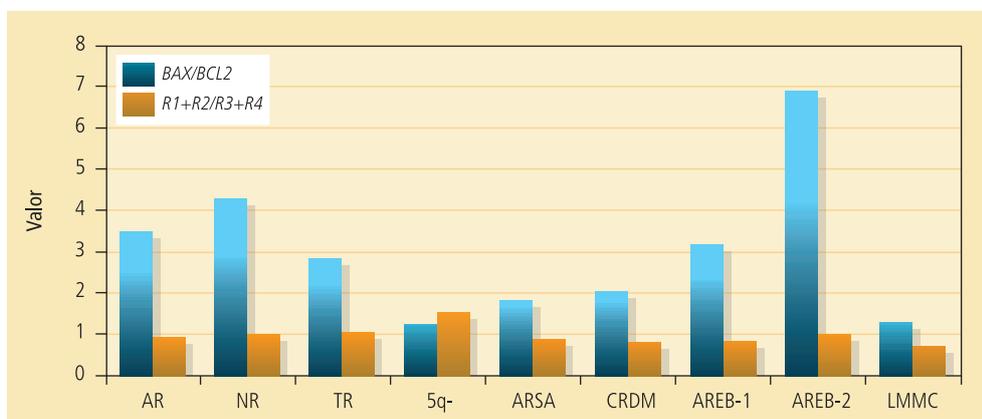


FIGURA 42

Razão moléculas pró-apoptóticas/anti-apoptóticas.

Não se verificaram diferenças estatisticamente significativas na análise das médias de intensidade de fluorescência em relação aos subtipos OMS, com exceção das razões entre os MIF das moléculas pró e anti-apoptóticas.

4.1.2.6. Análise das mutações *FLT3*

Somente um dos 102 doentes estudados apresentava a mutação de ITD do gene *FLT3*. Trata-se do doente mais jovem, e que evoluiu para LMA.

4.1.3. Análise da célula estaminal por citometria de fluxo

Sendo a SMD uma doença da célula estaminal, efectuámos a caracterização desta célula na maioria dos doentes (71 doentes, taxa de exclusão 30,4%), conforme descrito na secção de materiais e métodos (Figura 43A-D).

Como podemos verificar na figura 43A, os doentes com AREB-2 são os que apresentam, em média, maior percentagem de células estaminais hematopoiéticas, ou seja células CD34 positivas (8,6%). Pelo contrário, os doentes com LMMC, ARSA e Citopenias Refractárias, em particular com NR e TR, são os que têm menor percentagem destas células (1,76% e 1,2%, respectivamente). Além disso, as células CD34 dos doentes AREB-2 evidenciam uma tendência para o aumento da percentagem de células que expressam IL-6 e TNF- α (Tabela A2) assim como do recetor de tirosina cinase, c-KIT (42,5% das células são CD117 positivas) e da subunidade alfa do recetor da IL-3 (84,1% das células são CD123 positivas), relativamente aos outros subtipos de SMD (Figura 43C). De salientar que as células CD34/CD117 positivas dos doentes com AREB-2 e LMMC apresentam um aumento significativo da percentagem de células que expressa, respectivamente, IL6 e TNF- α , relativamente aos outros subtipos SMD.

Para analisar a relevância da célula estaminal cancerígena na SMD fomos avaliar a percentagem destas células nos vários subtipos da OMS (Figura 43B) e comparar, nestas células, os marcadores referidos anteriormente, com os das células estaminais com fenótipo aparentemente normal (Figura 43-D e Tabela A2 dos Anexos).

Assim, a percentagem de células estaminais cancerígenas (CD34+/CD117+/CD123+) é mais elevada nos doentes com CRDM, AREB-1 e ARSA (22,2%, 22,6 e 29,7%, respectivamente), sendo os doentes com AR e AREB-2 os que apresentam menor percentagem destas células (7,4% e 10%, respectivamente) (Figura 43B). Nestas células, a percentagem que expressa IL-6 é superior nos doentes com CRDU, sendo sobretudo significativo na TR, enquanto a percentagem que expressa TNF- α é mais elevada nos doentes AREB-2 (Figura 43D). No entanto, quando comparamos a percentagem destas células que expressa IL-6 e TNF- α , com a das células com um fenótipo não neoplásico (CD34+/CD117+/CD123-) verificamos que é inferior nos doentes com 5q-, CRDM e LMMC, sendo a diferença mais acentuada para a IL-6 nos doentes com AREB-2 (Figura 43D).

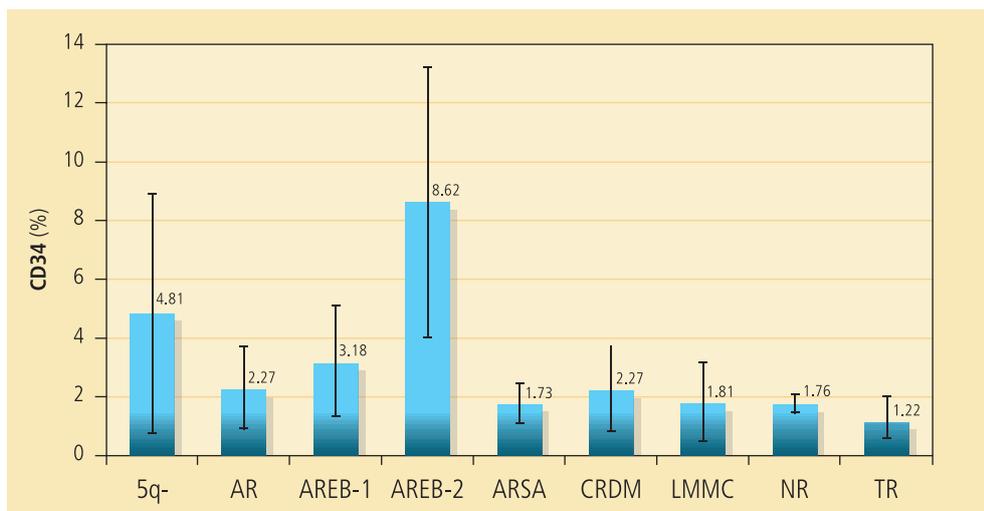


FIGURA 43A

Percentagem de células CD34 nos doentes com SMD.

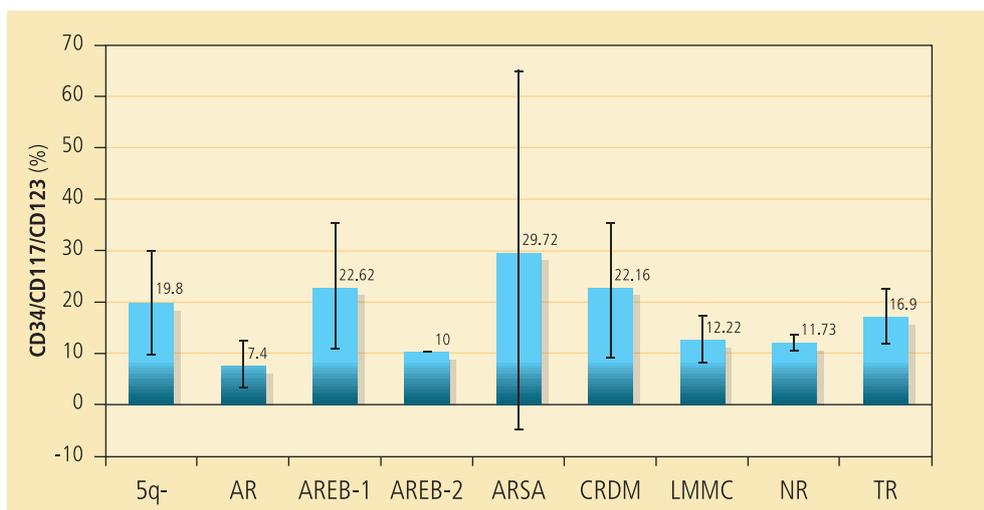


FIGURA 43B

Percentagem de células estaminais cancerígenas em doentes com SMD.

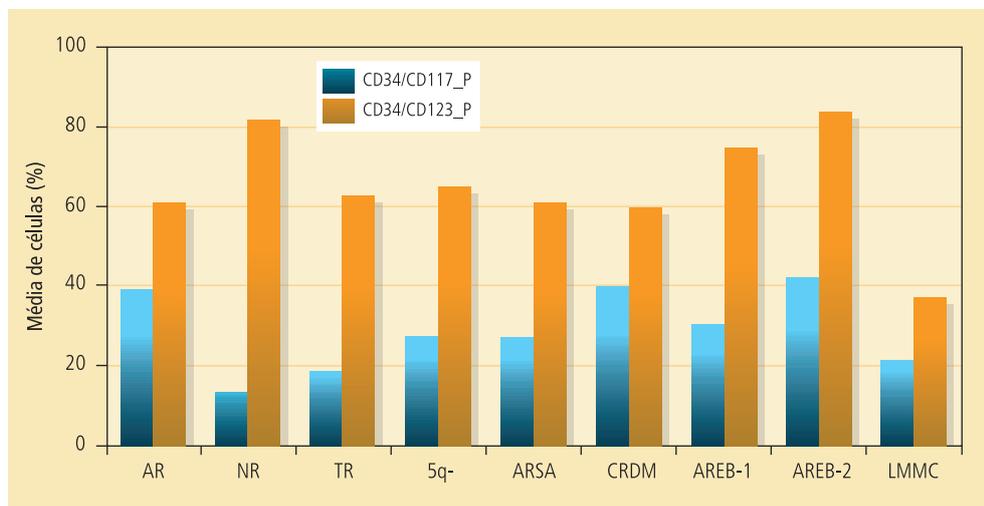
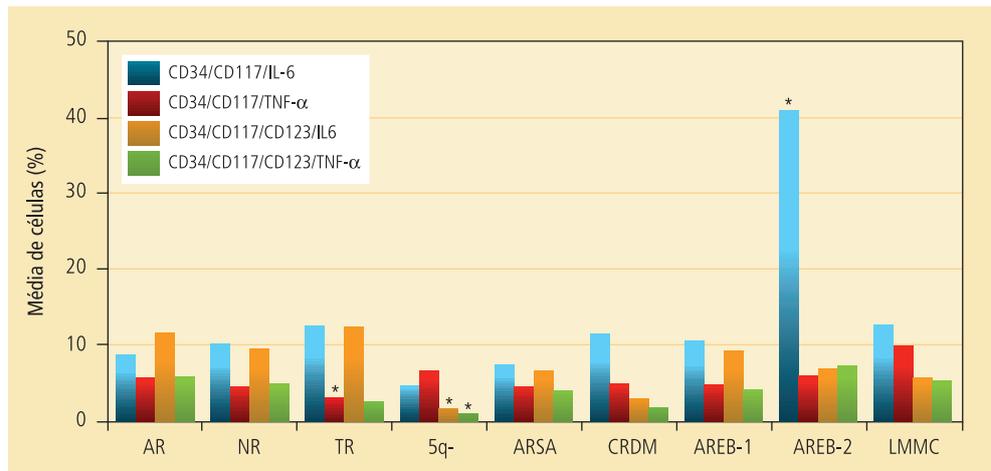


FIGURA 43C

Percentagem de células CD34 que expressam CD117/c-KIT e CD123/IL3-R.

FIGURA 43D

Avaliação da percentagem de células estaminais normais e neoplásicas que expressam IL-6 e TNF- α em doentes com SMD.



4.1.4. Análise dos polimorfismos da MTHFR

Uma vez que a enzima MTHFR participa no metabolismo do folato, essencial nas reações de formação de SAM, um dador de grupos metilo, fomos avaliar a frequência dos diferentes genótipos do gene que codifica esta enzima bem como os polimorfismos, A1298C e C677T, nos 102 doentes com SMD e em 263 e 248 controlos saudáveis (MTHFR A1298C e C677T, respetivamente).

Para o polimorfismo A1298C verificámos diferença estatística, com p -value < 0,05 (0,0127), e para o polimorfismo C677T verificámos não haver diferença estatística, p -value > 0,05 (no entanto, o valor é quase *borderline* p -value = 0,057) (Tabela 16 e 17). Ou seja, utilizando o teste do Qui Quadrado constatámos uma associação entre a SMD e o genótipo AC do polimorfismo A1298C da MTHFR. Este dado foi confirmado pelo *Odds Ratio* (OR – 2; IC – 1,3-3,2; p – 0,004).

O grupo de controlo comparado com os indivíduos com evolução para LMA não apresentou associação estatística.

TABELA 16

Polimorfismos da MTHFR A1298C	MTHFR A1298C	Controlo	Amostra
	A / A	123 (46,8%)	34 (33,3%)
A / C	105 (39,9%)	56 (54,9%)	
C / C	35 (13,3%)	8 (7,8%)	

TABELA 17

Polimorfismos da MTHFR C677T	MTHFR C677T	Controlo	Amostra
	Ala / Ala	98 (39,5%)	50 (49,0%)
Ala / Val	113 (45,6%)	41 (40%)	
Val / Val	37 (14,9%)	7 (6,8%)	

Com o objetivo de avaliar a interferência de polimorfismos funcionais nas reações de metilação nos vários subtipos de SMD da OMS 2008, analisámos os polimorfismos da MTHFR, A1298C e C677T nestes doentes e efetuámos e correlacionámos os dados obtidos com o perfil de metilação dos genes estudados (Figuras 44 a 47).

Quanto ao polimorfismo da MTHFR C677T, a maior parte dos doentes com genes metilados tem o genótipo Ala/Ala, com exceção do grupo de doentes com metilação do gene *p16* (Figura 44).

Analisando o polimorfismo da MTHFR A1298C, verificamos que o genótipo A/C é o mais frequente nos doentes com genes metilados, exceto no grupo de doentes com metilação do gene *TRAIL-R4*, em que o genótipo A/A está presente em maior número de doentes que o genótipo A/C (Figura 45).

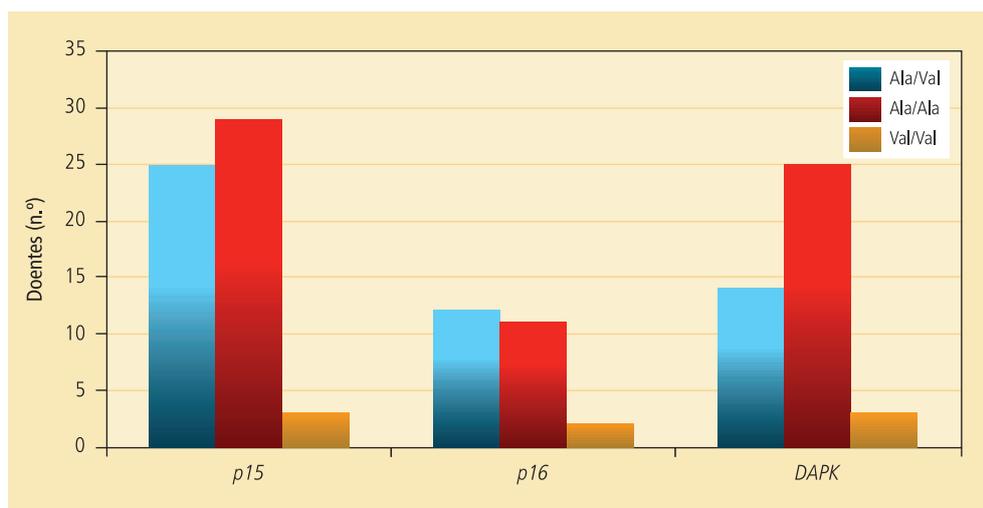


FIGURA 44A

Distribuição das variantes genóticas da MTHFR C677T em função do perfil de metilação dos genes *p15*, *p16* e *DAPK*.

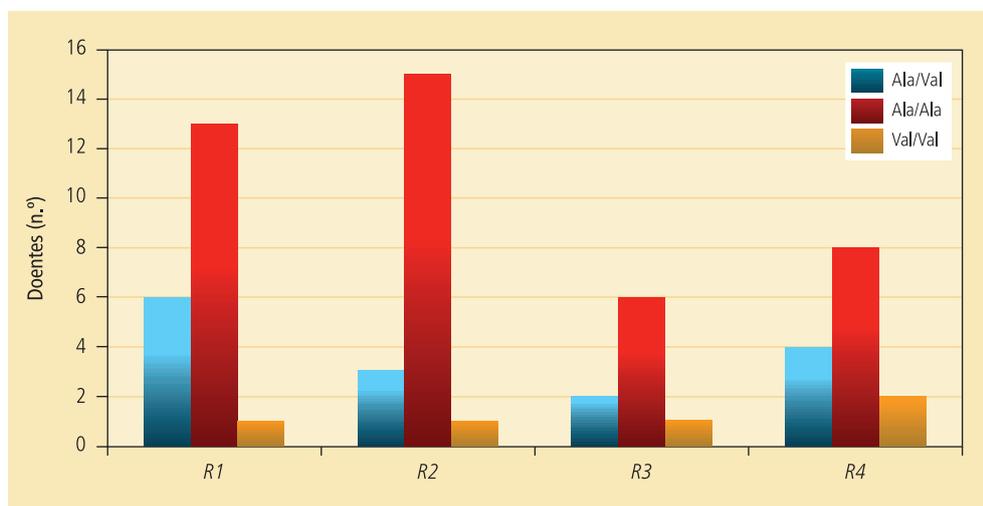
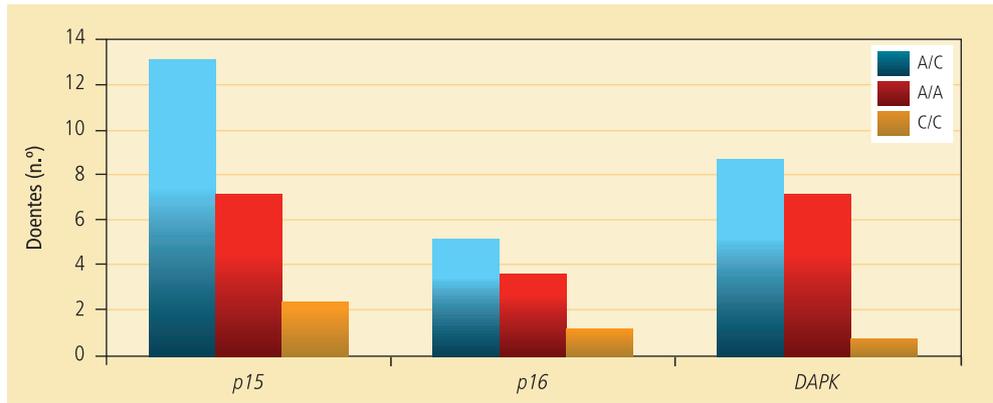


FIGURA 44B

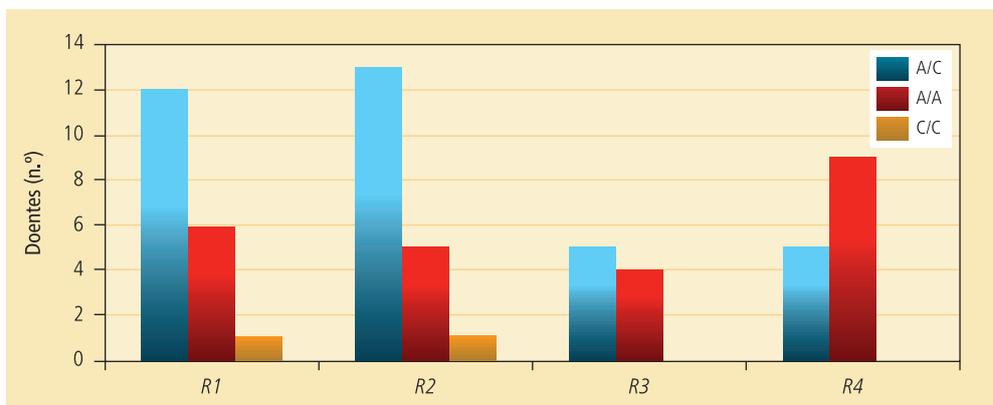
Distribuição das variantes genóticas da MTHFR C677T em função do perfil de metilação dos genes *TRAIL-R1*, *R2*, *R3* e *R4*.

FIGURA 45A

Distribuição das variantes genotípicas da MTHFR A1298C em função do perfil de metilação dos genes *p15*, *p16* e *DAPK*.

**FIGURA 45B**

Distribuição das variantes genotípicas da MTHFR A1298C em função do perfil de metilação dos genes *TRAIL-R1*, *R2*, *R3* e *R4*.

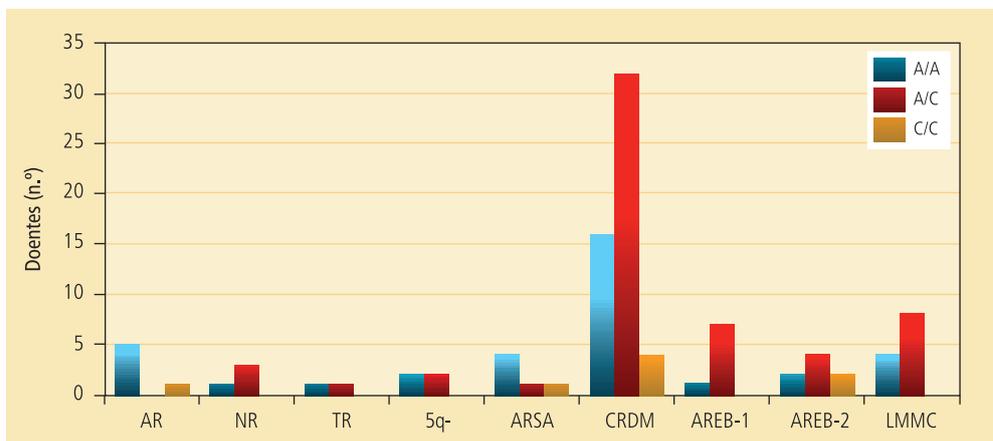


Qualquer um dos genótipos mais frequentemente encontrados na nossa população, *A/C* para o polimorfismo A1298C da MTHFR ou *Ala/Ala* do polimorfismo da MTHFR da C677T, está presente em maior número de doentes que apresenta metilação dos genes *p15* e *DAPK*, que são também os genes mais frequentemente metilados nestes doentes.

Relativamente aos subtipos da OMS, não foi evidenciada diferença estatística entre os genótipos da MTHFR e os subtipos da OMS (Figuras 46 e 47).

FIGURA 46

Distribuição das variantes genotípicas da MTHFR A1298C em função dos subtipos OMS.



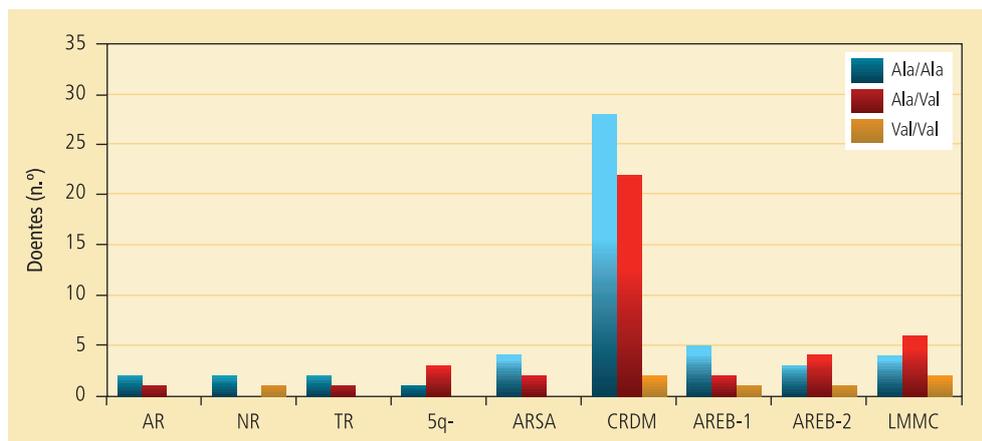


FIGURA 47

Distribuição das variantes genotípicas da MTHFR C677T em função do subtipos da OMS.

4.1.5. Análise dos doentes que evoluíram para LMA e determinação de um novo índice de progressão para Leucemia Aguda

Do total da amostra de 102 doentes, 11 evoluíram para LMA sendo 7 doentes com AREB-2, 2 doentes com CRDM, 1 doente com AREB-1 e outro com LMMC. As tabelas A3 e A4 (anexo) referem-se a este grupo de doentes.

Verificou-se diferença estatística entre os indivíduos com evolução para LMA e os outros para as seguintes variáveis: % de sideroblastos e blastos, IPSS, IPSS-R, WPSS, plaquetas, eritropoietina, CD34/CD117/IL-6, todos com valor $p < 0,05$ (hipótese H1b).

Ou seja, os doentes que progrediram para LMA apresentam, em média, uma % de blastos medulares superior e um nível sérico de eritropoietina superiores aos doentes que não progrediram. Também apresentam um maior número de células com expressão de CD34/CD117/IL-6, para além de índices de prognóstico de alto risco. No entanto, o valor médio de plaquetas é inferior no grupo que evoluiu para LMA.

As curvas ROC demonstraram que a % de blastos é o parâmetro que mais prediz a evolução com 90%, seguido pela célula estaminal com marcação CD34/CD117/CDIL-6 e a variável eritropoietina (Figura A1 e Tabela A6).

4.1.5.1. O novo índice de progressão para Leucemia Aguda (IPLA)

Com base nos nossos resultados, foi construído um novo índice, designado por IPLA, que soma o número de variáveis (parâmetros hematológicos e bioquímicos, célula estaminal, perfil de metilação e moléculas de apoptose) com valores alterados para cada subtipo da OMS 2008, representando uma pontuação que traduz uma maior probabilidade de evolução para LMA. (Tabela A5 dos anexos).

O IPLA é calculado através da soma das variáveis alteradas, em que cada variável contribui com um ponto quando anormal para cada subtipo.

Pode-se verificar que os subtipos que apresentam o “risco” mais elevado, são os que correspondem aos doentes que progrediram para LMA. Assim, o novo IPLA é também significativo ($p\text{-value}<0,05$), sendo que todos os indivíduos com evolução para LMA apresentam uma pontuação superior a 6. Por exemplo, 7 dos 8 doentes com o subtipo AREB-2 evoluíram para LMA e o índice “risco” neste subgrupo soma uma pontuação de 19.

Ainda para os indivíduos com evolução para LMA encontrámos as seguintes correlações significantes: diretas - *R4* e hemoglobina ($p=0,652$); FAS e sideroblastos em anel ($p=0,738$); e inversas - p53 e vitamina B12 ($p=-0,691$), blastos e sideroblastos em anel ($p=-0,650$).

4.1.6. Análise dos doentes que faleceram

Dos 102 doentes incluídos desde o início do estudo (55 meses) faleceram 35 doentes (34,3%). Destes, fazem parte os 11 doentes que evoluíram para LMA, já descritos no ponto anterior. Dos restantes 24 doentes, 18 (75%) faleceram por complicações secundárias às citopenias que apresentavam e seis doentes faleceram devido a outras causas não relacionadas com a doença.

Da análise deste grupo de doentes, verificámos diferença estatística para as seguintes variáveis: blastos, IPSS, IPSS-R, WPSS, hemoglobina, ferritina e CD34, todos com valor- $p<0,05$ (hipótese H1c).

Ou seja, o grupo de doentes que faleceu apresenta uma maior % de blastos medulares e de células CD34, um nível de ferritina sérica superior e índices de prognóstico de alto risco. Este grupo de doentes apresenta, em média, um valor de hemoglobina inferior ao dos doentes que não faleceram.

4.1.7. Análise da sobrevivência

Por último, efetuámos a análise de sobrevivência de acordo com a metodologia de Kaplan-Meier e as diferenças foram avaliadas pelos métodos de Logrank e Wilcoxon, para a população total e em função de determinados parâmetros: progressão para LMA, perfil de metilação, citopenias e variáveis bioquímicas (β 2-microglobulina, LDH, ferritina, vitamina B12, eritropoietina).

– *Sobrevivência global da população*

Analisámos a sobrevivência global (OS) dos 102 doentes com SMD e verificámos que aos 23 meses de *follow-up*, 50% dos doentes estavam vivos e aos 36 meses apenas 32% dos doentes permanecia em seguimento (Figura 48).

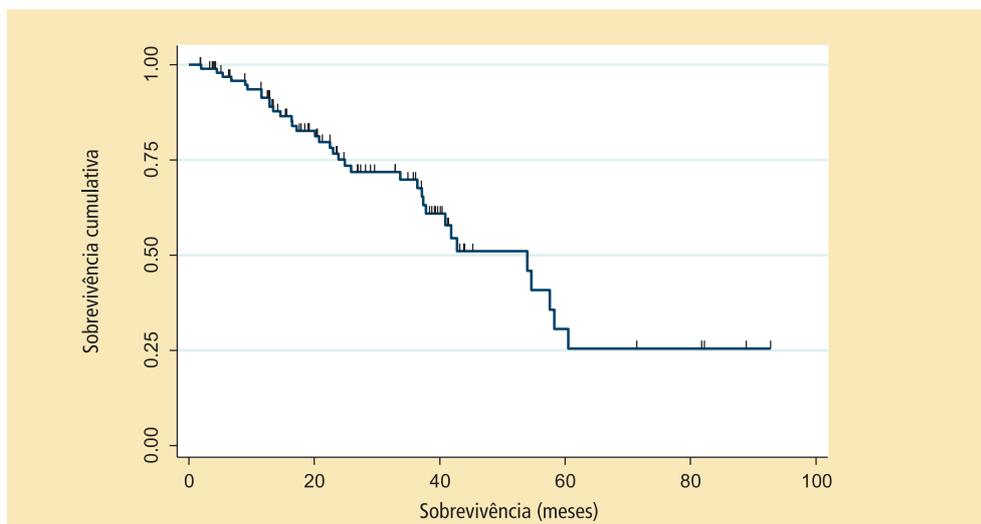


FIGURA 48

Sobrevivência Global da população.

– Sobrevivência segundo a progressão para LMA

O grupo de 11 doentes que evoluiu para LMA apresenta uma taxa de sobrevivência inferior ao grupo que não progrediu, comprovado por um $p < 0,01$ (0,0000) (Figura 49).

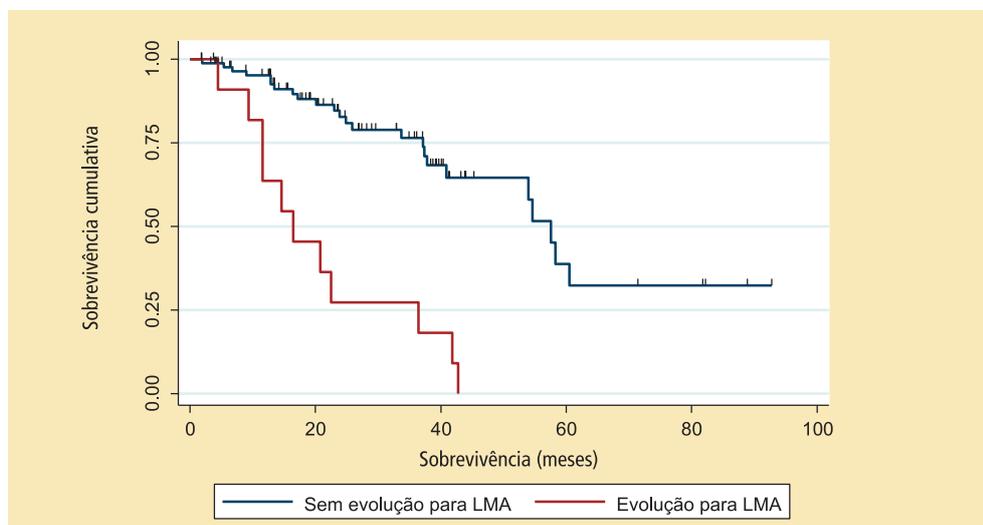


FIGURA 49

Sobrevivência dos doentes que evoluíram para LMA vs os doentes sem progressão.

– Relação entre perfil de metilação e sobrevivência

Para estudarmos a influência do perfil de metilação na sobrevivência fomos determinar as curvas de sobrevivência de cada subgrupo de doentes em função da ausência e/ou presença de 1 ou mais de 2 genes metilados em particular para os genes *p15*, *p16*, *DAPK*, *R1*, *R2*, *R3* e *R4* (gene metilado vs não metilado). Embora se verifique uma diferença na sobrevivência no que diz respeito aos doentes com o gene *p15* metilado vs não metilado, esta diferença não é estatisticamente significativa ($p=0,0889$) (Figura 50).

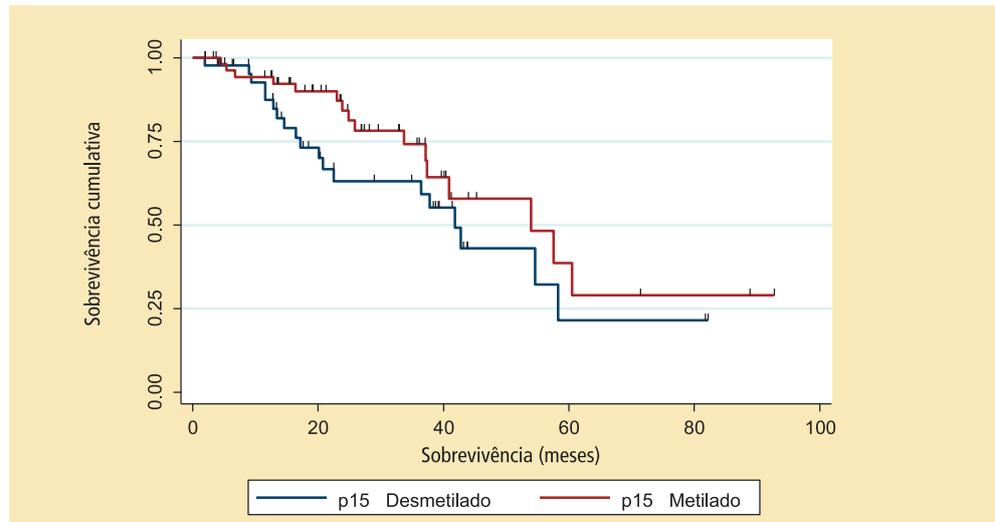


FIGURA 50

Relação entre *status* de metilação do gene *p15* e sobrevivência.

– *Relação entre parâmetros bioquímicos e sobrevivência*

Neste estudo de sobrevivência, analisámos os parâmetros $\beta 2$ -microglobulina, LDH, ferritina, vitamina B12 e eritropoietina na sobrevivência. Excluimos o folato sérico para esta análise, uma vez que alguns doentes faziam suplementação com ácido fólico à data de diagnóstico, portanto, à data de recolha dos dados. Para as variáveis $\beta 2$ -microglobulina, LDH, ferritina, vitamina B12 e eritropoietina utilizámos os valores de referência citados na secção materiais e métodos, sendo a comparação efetuada entre os subgrupos de doentes com valores normais em relação aos que têm valores elevados. Para o parâmetro eritropoietina e ferritina, efetuámos ainda a divisão em outros subgrupos: eritropoietina (baixo vs normal vs <100 mUI/mL vs $100-500$ mUI/mL vs ≥ 500 mUI/mL) e ferritina (baixo vs normal vs elevado).

Assim, verificámos diferença estatisticamente significativa na sobrevivência para as variáveis LDH ($p=0,0048$) e eritropoietina ($p=0,0336$), ou seja, os doentes que apresentam valores acima do limite superior da normalidade, para as duas variáveis, têm uma sobrevivência inferior aos doentes com valores dentro da normalidade (Figuras 51 e 52).

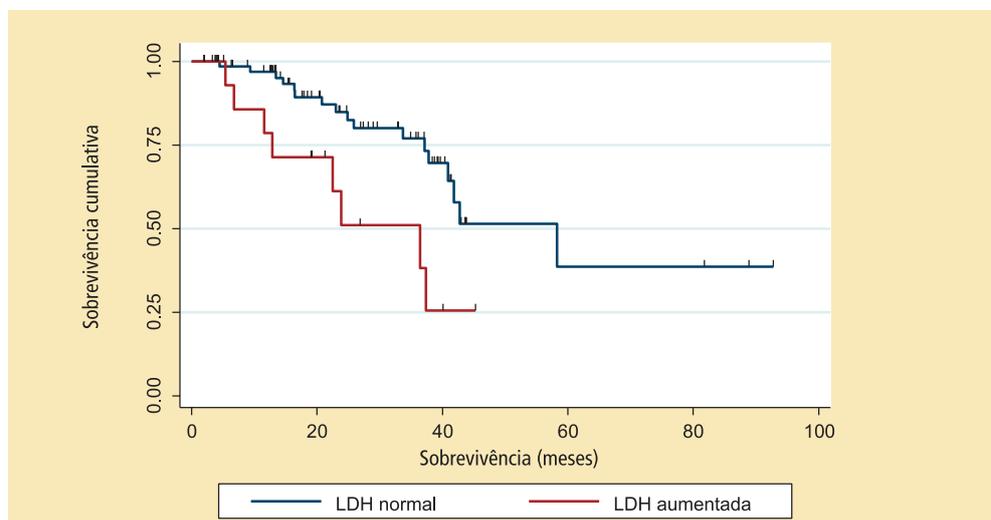


FIGURA 51

Relação entre a LDH sérica e a sobrevivência.

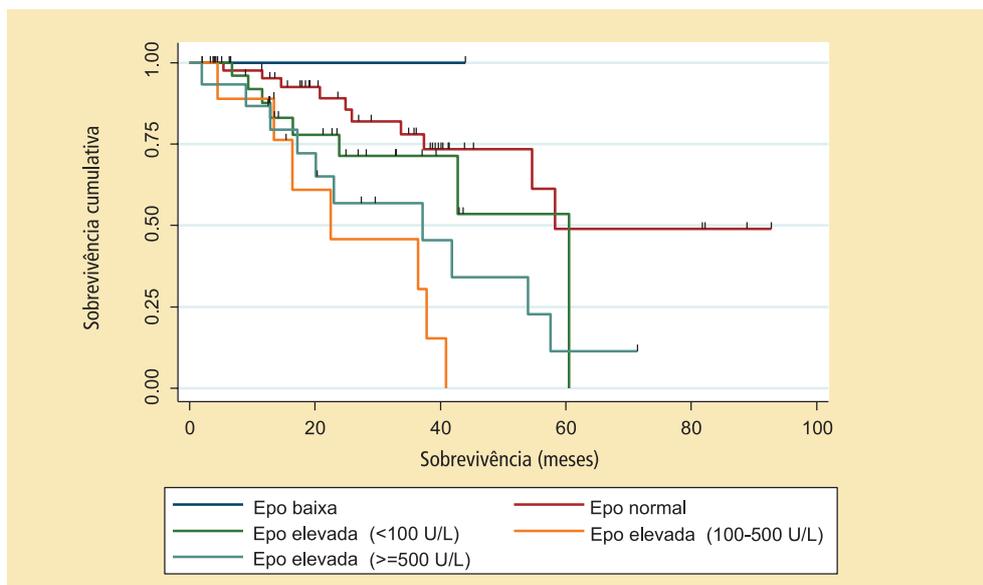


FIGURA 52

Relação entre a eritropoietina e a sobrevivência sérica.

– *Relação entre parâmetros hematológicos e a sobrevivência*

Por último, analisámos a sobrevivência por citopenias (anemia, neutropenia e trombocitopenia) na sobrevivência. Nesta análise, utilizámos os *cut-off* considerados no IPSS, ou seja, doentes com hemoglobina inferior a 10 g/dL em comparação com os doentes com hemoglobina superior ou igual a 10 g/dL, doentes com neutrófilos inferiores a 1,8 em relação aos que têm valores superiores ou iguais a 1,8 G/L e plaquetas inferiores a 100 G/L vs superior ou igual a 100 G/L. Deste modo, comprovámos uma diferença estatisticamente significativa para o parâmetro hemoglobina ($p=0,0249$), sendo que os doentes com valores de hemoglobina mais baixos apresentam taxas de sobrevivência superiores (Figura 53). Para a variável neutrófilos, não se verificou diferença estatística na sobrevivência ($p=0,09$).

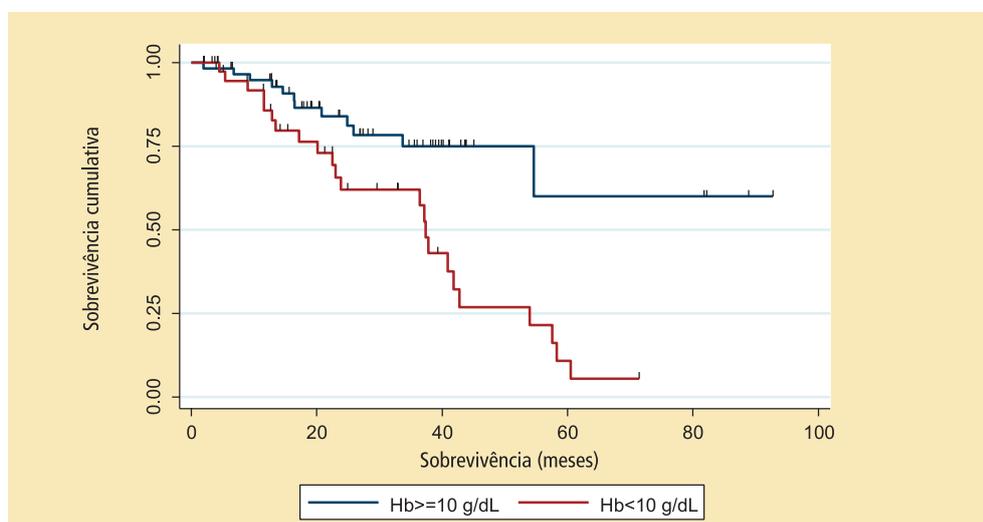


FIGURA 53

Relação entre a hemoglobina e a sobrevivência.

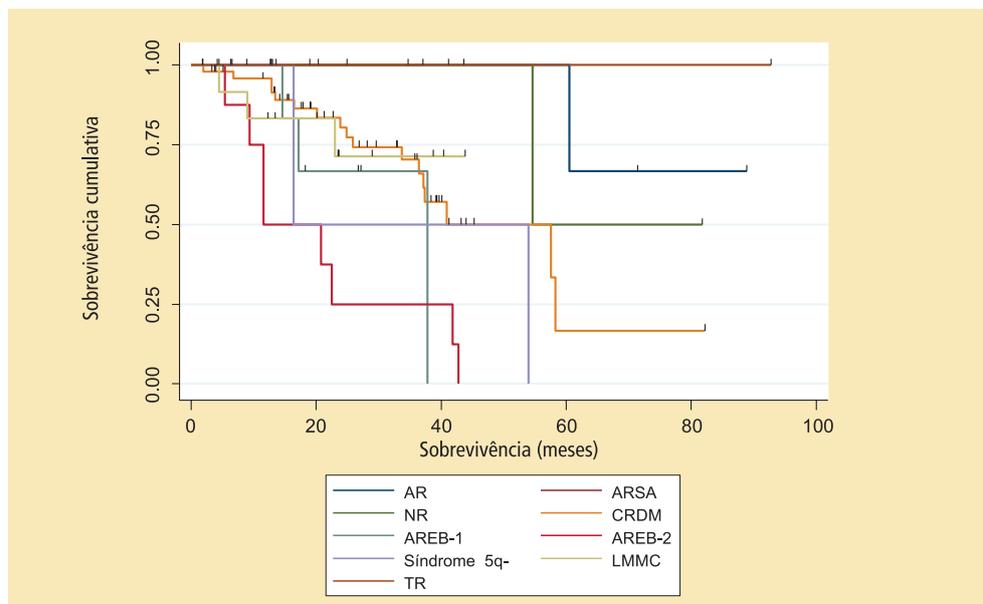
– Relação entre os subtipos da OMS 2008 e a sobrevivência

A análise da sobrevivência para os vários subgrupos demonstrou existir uma diferença estatisticamente significativa para este parâmetro ($p=0,004$) (Figura 54).

FIGURA 54

Análise da sobrevivência entre os subtipos da OMS.

AR - anemia refratária; NR - neutropenia refratária; TR - trombocitopenia refratária; Síndrome 5q-; ARSA - anemia refratária com sideroblastos em anel; AREB - anemia refratária com excesso de blastos; LMMC - leucemia mielomonocítica crónica; CRDM - citopenia refratária com displasia multilinha.



4.2. Estudos efetuados na linha celular F-36P

4.2.1. Caracterização da linha celular F-36P

No presente trabalho foi utilizada a linha celular F-36P, obtida de um doente com Síndrome Mielodisplásica do subtipo AREB-t, segundo a classificação da OMS de 2001, ou LMA segundo a classificação da OMS de 2008.

De modo a conhecer o ritmo de crescimento destas células, foi elaborada a curva de crescimento, obtida pelo cálculo do logaritmo do número de células viáveis presentes na cultura celular, a cada 24 horas, durante 96 horas. Como se pode verificar na figura 55, ocorre um crescimento exponencial até às 72 horas de incubação, apresentando um tempo de duplicação entre as 24 e as 48 horas. O ritmo de crescimento diminui a partir das 72 horas de incubação, provavelmente devido ao efeito de inibição por contacto e depleção de nutrientes no meio de cultura, atingindo um *plateau* que se mantém até às 96 horas.

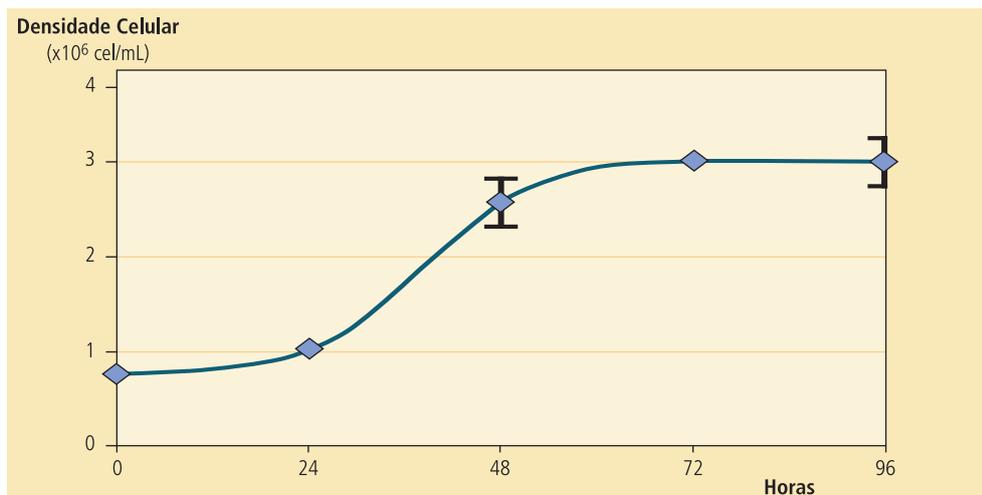


FIGURA 55

Curva de crescimento da linha celular F-36P.

A curva obtida demonstra um crescimento exponencial entre as 24 e as 72 horas de incubação, seguido de uma fase de estabilização do crescimento até às 96 horas.

4.2.2. Detecção de mutações nos genes *RAS* e *FLT3*

4.2.2.1. Detecção de mutações nos genes *RAS* por sequenciação

A deteção de mutações nas três isoformas do gene *RAS*, *N-RAS*, *H-RAS* e *K-RAS*, foi efetuada por sequenciação, a partir de uma amostra de ADN extraído das células F-36P com concentração de 745 µg/ml e uma razão D.O.260/D.O.280 de aproximadamente 1,8, de acordo com o referido na secção de materiais e métodos. A técnica de sequenciação permite, através da construção de eletroferogramas, obter uma sequência nucleotídica amplificada que inclui os codões a estudar. Assim, como se observa na figura 56, a isoforma *N-RAS* apresenta a sequência GGT para os codões 12 e 13, e CAA para codão 61. A isoforma *K-RAS* apresenta a sequência GGT no codão 12, GGC no codão 13 e CAA no codão 61, enquanto a isoforma *H-RAS* exibe a sequência GGC no codão 12, GGT no codão 13 e CAG no codão 61. Deste modo, a comparação das sequências com o ADN das células F-36P não revelou a presença de mutações nos codões em estudo.

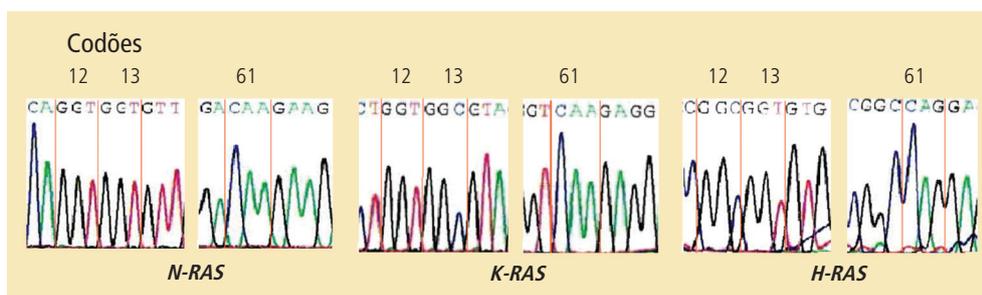


FIGURA 56

Eletroferograma das sequências nucleotídicas dos codões 12, 13 e 61 dos genes *RAS*.

Verifica-se a presença das sequências *wild type* dos codões 12, 13 e 61 das isoformas *N-RAS* (A), *K-RAS* (B) e *H-RAS* (C) da linha celular F-36P, delimitados a vermelho.

Para além dos codões em estudo, foi igualmente confirmada a inexistência de mutação na restante sequência amplificada.

4.2.2.2. Detecção de mutações no gene *FLT3*

A deteção de mutações internas em *tandem*, ITD, e da mutação pontual, D835V, no gene *FLT3*, foi efetuada a partir de 32µg/ml de amostra de ADN isolado das células F-36P, de acordo com o mencionado na secção de materiais e métodos. A figura 57 representa uma imagem do gel onde foi possível a visualização de mutações ITD, no gene *FLT3* das células F-36P.

Nos resultados obtidos na linha celular F-36P, observa-se uma banda correspondente a um fragmento contendo 250 a 500 pares de bases (assinalado com o círculo na figura 57), resultante da duplicação interna em *tandem* do gene *FLT3*. Nesta figura encontra-se ainda visível uma banda de, aproximadamente, 790pb, correspondente ao controlo interno.

Na figura 58, está representado o gel de agarose para deteção da mutação pontual D835V no gene *FLT3*. Como se pode observar, apenas se identifica a amplificação de um fragmento de aproximadamente 325 pb, correspondente ao gene normal (*WT*). A ausência de banda na coluna denominada D835V significa que a linha celular F-36P não possui esta mutação pontual.

FIGURA 57

Detecção de mutações ITD no gene *FLT3* por eletroforese em gel de agarose nas células F-36P.

O círculo vermelho evidencia a banda relativa às mutações ITD. A banda situada acima desta possui aproximadamente 790bps, correspondendo ao controlo interno. Foi utilizado um marcador de pesos moleculares (MPM).

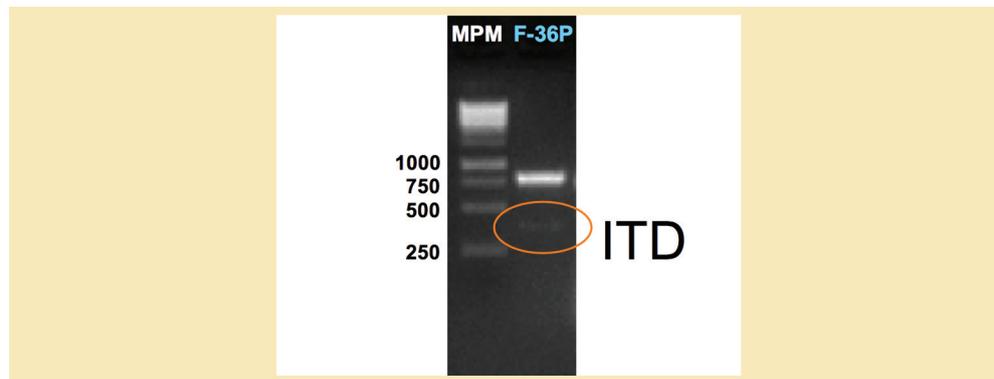
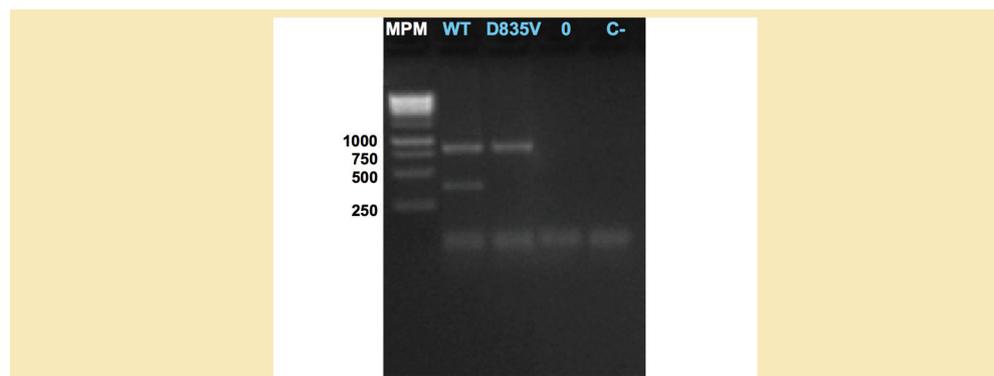


FIGURA 58

Detecção da mutação pontual D835V no gene *FLT3* por Eletroforese em gel de agarose nas células F-36P.

A ausência da banda na coluna D835V demonstra a ausência de mutação pontual D835V. Nas células F-36P é apenas possível detetar a banda correspondente ao gene normal (*wild type*, WT). Foi utilizado igualmente um marcador de pesos moleculares (MPM), um controlo negativo (C-) e um tubo branco (0).

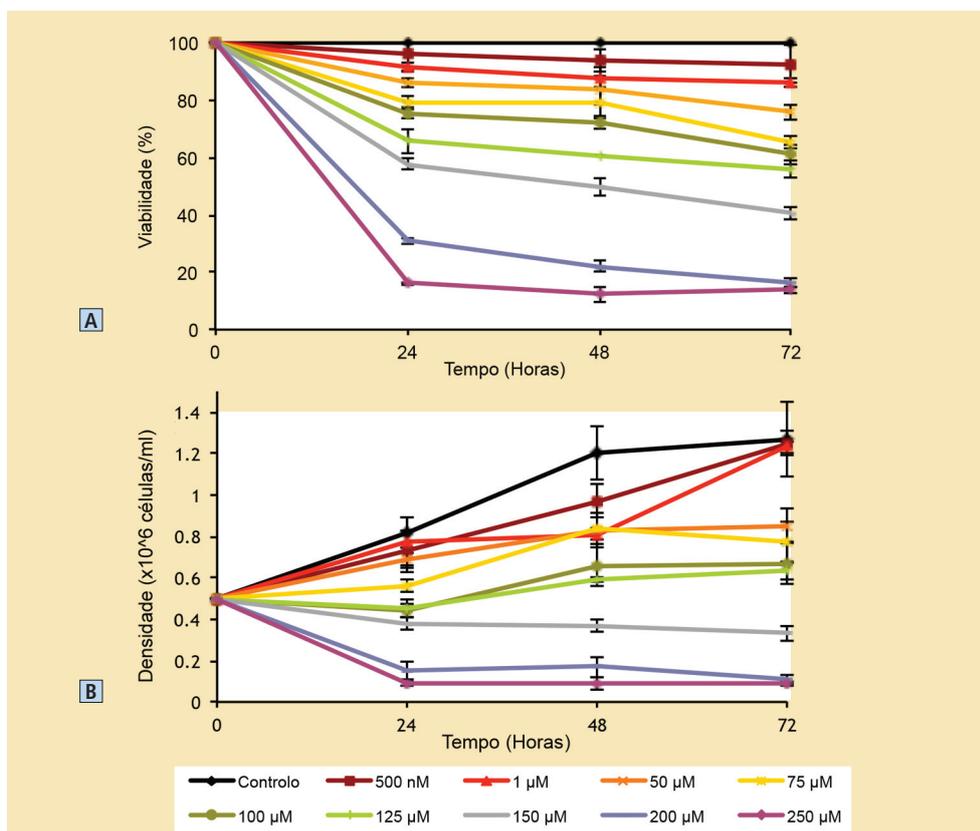


4.2.3. Análise do efeito citotóxico e citostático de novos fármacos anticancerígenos nas células F-36P

4.2.3.1. Análise da viabilidade e densidade celular pelo método do Azul de Tripiano - Curvas Dose-Resposta

AS células F-36P foram incubadas com os fármacos α -HFPA, Imatinib, MG262, Decitabina e Tricostatina A nas condições referidas na secção Materiais e Métodos. Foram ainda administradas às células as combinações farmacológicas entre α -HFPA e Ara-C, α -HFPA e Imatinib, α -HFPA e MG262, e ainda Decitabina com TSA A. As figuras 59 a 67 representam as curvas de viabilidade e densidade celular nas diferentes condições testadas.

Como se pode observar na figura 59, nas células F-36P tratadas com o inibidor da farnesiltransferase, α -HFPA, ocorreu diminuição da viabilidade celular (Figura 59A) e da densidade celular (Figura 59B) de forma dependente da dose e do tempo de incubação. O α -HFPA induz assim um efeito citotóxico e citostático após 24 horas de incubação. Este efeito é máximo quando as células são tratadas com este inibidor da farnesiltransferase na concentração de 250 μ M, onde a viabilidade das células decresce até 15% (Figura 59A).



Por outro lado, o IC_{50} , ou seja, a concentração à qual o fármaco possui a capacidade de reduzir a viabilidade celular para 50%, é atingido na concentração de, aproximadamente, 150 μM após 48 horas de tratamento. O efeito antiproliferativo é bastante significativo às 24 horas de incubação, quando as células são tratadas com α -HFPA na concentração de 250 μM . Nesta condição, a densidade celular decresce até ao valor médio de $0,09 \times 10^6$ células/mL (cerca de 6,5 vezes inferior à concentração inicial (Figura 59B).

Por outro lado, quando as células foram tratadas com Ara-C (Citarabina), o efeito citotóxico e antiproliferativo foi observado após 48 horas de incubação das células com o fármaco. Este efeito nas células F-36P é também dependente da dose e do tempo de incubação, tendo-se verificado uma inibição de 50% de proliferação celular (IC_{50}) com o fármaco na concentração de 100 μM após 48 horas de incubação.

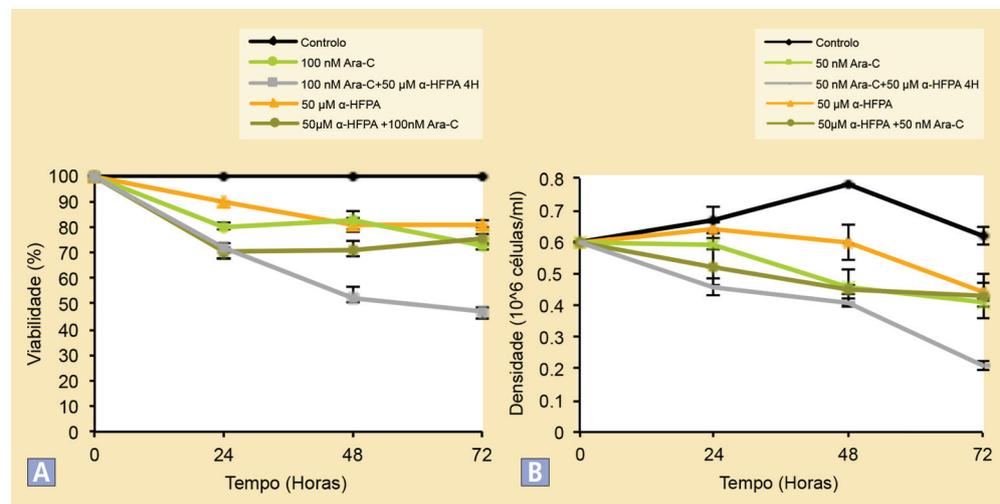
Posteriormente, as células F-36P foram incubadas com α -HFPA e Ara-C em administração simultânea, tendo-se utilizado doses inferiores ao IC_{50} dos fármacos em monoterapia. Como se pode verificar na figura 60, esta associação farmacológica induz um decréscimo de viabilidade (Figura 60A) e da densidade (Figura 60B) de modo dependente da dose e do tempo de exposição. No entanto, a associação mais eficaz foi a resultante da administração de 100nM de Ara-C seguida de 50 μM de α -HFPA, com um intervalo de 4 horas entre as duas administrações.

De facto, foi observada uma redução da viabilidade celular para 47% após 72 horas de incubação, ou seja, ocorreu uma potenciação do efeito citotóxico que se traduziu por uma diminuição da viabilidade em cerca de 26% relativamente ao tratamento com Ara-C em monoterapia na dose de 100nM, e de 34% em relação à incubação de α -HFPA isolado. No entanto, o seu efeito antiproliferativo

FIGURA 60

Curvas Dose-Resposta das células F-36P tratadas com a combinação farmacológica α -HFPA e Ara-C.

Em (A) encontra-se representada a viabilidade celular e em (B) a proliferação das células tratadas com a associação da α -HFPA e Ara-C, em administração simultânea e temporalmente desfasadas (4H). Os resultados têm significado estatístico ($p < 0.05$) para as concentrações de 50 nM de Ara-C, 100 nM de Ara-C com 150 μM de α -HFPA e 100 nM de Ara-C com 150 μM de α -HFPA 4H em (A) e para as concentrações de 50 μM de α -HFPA, 50 nM de Ara-C, 100 nM de Ara-C com 150 μM de α -HFPA e 100 nM de Ara-C com 150 μM de α -HFPA 4H em (B), em relação ao controlo.

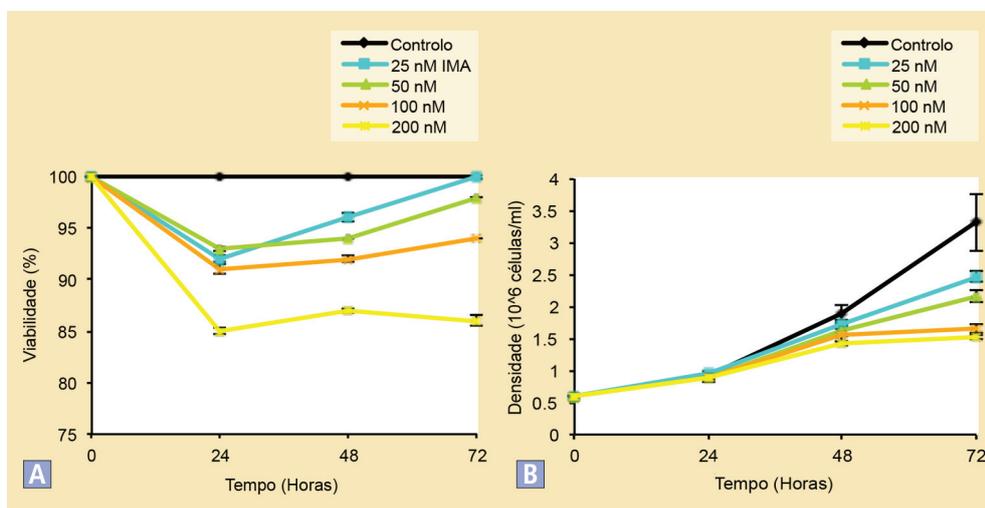


foi menos acentuado, tendo-se observado diminuição máxima da densidade celular para $0,21 \times 10^6$ células/mL (cerca de 2,9 vezes inferior à densidade ao tempo zero) com a associação farmacológica de 50 nM Ara-C seguida de 50 μ M α -HFGA após 4 horas. Regista-se assim aumento do efeito citostático de 1,8 vezes superior, comparativamente à incubação de Ara-C em monoterapia na mesma concentração. Em suma, a associação entre os fármacos Ara-C e α -HFGA possui um efeito citostático e antiproliferativo sinérgico, nomeadamente quando a incubação de Ara-C precede 4 horas a incubação de α -HFGA.

Quando as células F-36P foram tratadas com o inibidor de tirosina-cinase, Imatinib, em monoterapia, observou-se um efeito citotóxico (Figura 61A) ou citostático (Figura 61B) ligeiro, tendo-se registado uma redução de viabilidade de aproximadamente 15% para a concentração de 200 nM de Imatinib. Apesar de ser observada redução da viabilidade celular às 24 horas de tratamento com este fármaco nas concentrações inferiores a 200 nM, este efeito revelou-se reversível após 72 horas de incubação (Figura 61A).

Nas células F36-P tratadas com a associação de Imatinib na concentração de 100 nM com α -HFGA na concentração de 50 μ M observou-se potenciação do efeito citotóxico, mas não do antiproliferativo (Figura 62A), relativamente ao observado com 100 nM de Imatinib em monoterapia (Figura 62A). De facto, nas células tratadas com ambos os fármacos observámos uma diminuição da viabilidade em cerca de 34% relativamente aos fármacos isoladamente. Assim, a combinação farmacológica de α -HFGA com Imatinib revelou possuir eficácia citotóxica importante, embora esta se verifique sobretudo quando os fármacos são adicionados com um intervalo de 4 horas.

Foi avaliado também o potencial efeito terapêutico do inibidor do proteasoma, MG262, na linha celular F-36P, em monoterapia e em associação



Seguidamente, analisou-se se a eficácia terapêutica do MG262 poderia ser potenciada pela adição de outros fármacos anticancerígenos. A figura 64 mostra os resultados obtidos quando as células foram tratadas com a associação entre MG262 e α -HFPA, em concentrações inferiores às utilizadas para atingir os respetivos IC_{50} em monoterapia. Como se pode observar, a administração em simultâneo de MG262 e α -HFPA mostra maior eficácia terapêutica, em relação ao efeito dos fármacos para as concentrações testadas em monoterapia.

Assim, a diminuição da viabilidade celular (Figura 64A) ocorreu progressivamente a partir das 24 horas, atingindo 24% de células vivas às 72 horas, quando as células foram incubadas com 50 μ M de α -HFPA e 25 nM de MG262. Estes resultados mostram uma redução em 20% relativamente à registada com as mesmas concentrações de MG262 em monoterapia, sugerindo sinergia farmacológica entre os fármacos utilizados. Apesar de se observar redução da densidade celular de 2,3 vezes em relação às células tratadas, e de 1,6 vezes relativamente ao MG262 em monoterapia (25 nM) (Figura 64B), este efeito antiproliferativo sinérgico não é significativo. Deste modo, a administração simultânea dos fármacos α -HFPA e MG262 potencia essencialmente o seu efeito citotóxico.

Para avaliar o potencial terapêutico dos moduladores epigenéticos, as células foram colocadas em cultura na ausência e na presença do inibidor da HDAC, Tricostatina A (Figura 65A), e do hipometilante, Decitabina (Figura 65B), em monoterapia durante 96 horas. Como se observa na figura 65, a TSA A e a DEC induzem diminuição da viabilidade das células F-36P, de forma dependente da concentração e do tempo de exposição, verificando-se o efeito máximo após 48 horas de incubação. Deste modo, a redução de 50% da viabilidade/proliferação celular (IC_{50}) foi atingida quando as células foram tratadas com 750 nM de TSA A (Figura 65A) e 50 μ M de DEC (Figura 65B).

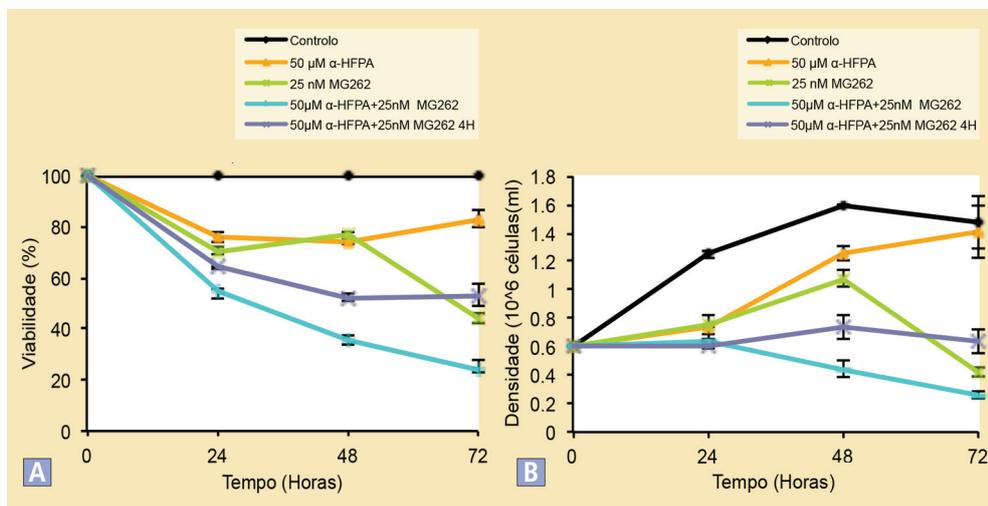
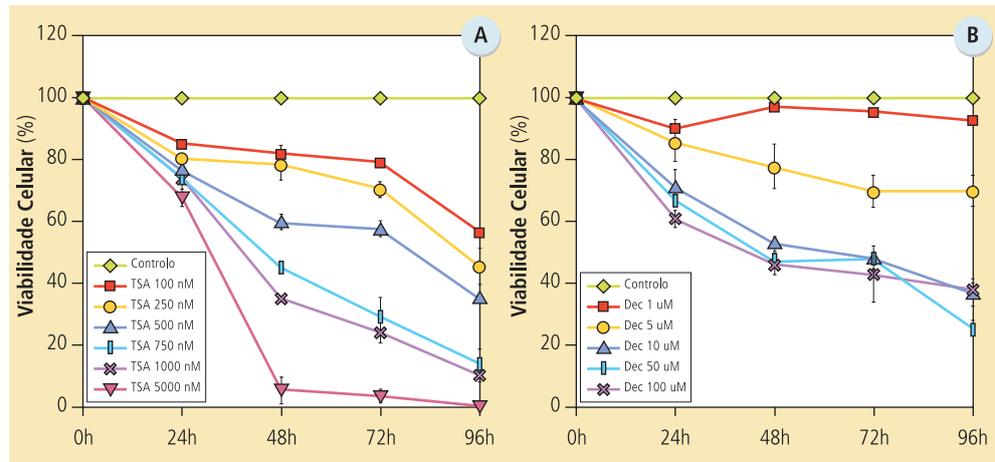


FIGURA 65

Curvas dose-resposta de TSA A e DEC em administração única, nas células F-36P.

A viabilidade celular foi analisada cada 24h, durante as 96h de incubação com diferentes concentrações de TSA A **(A)** e DEC **(B)**, em monoterapia. Os dados são expressos em percentagem (%), relativamente ao controlo, e representam a média \pm desvio padrão de pelo menos 3 ensaios independentes. TSA A – Tricostatina A; DEC – Decitabina; ‡, $p < 0,05$; *, $p < 0,01$; †, $p < 0,001$.



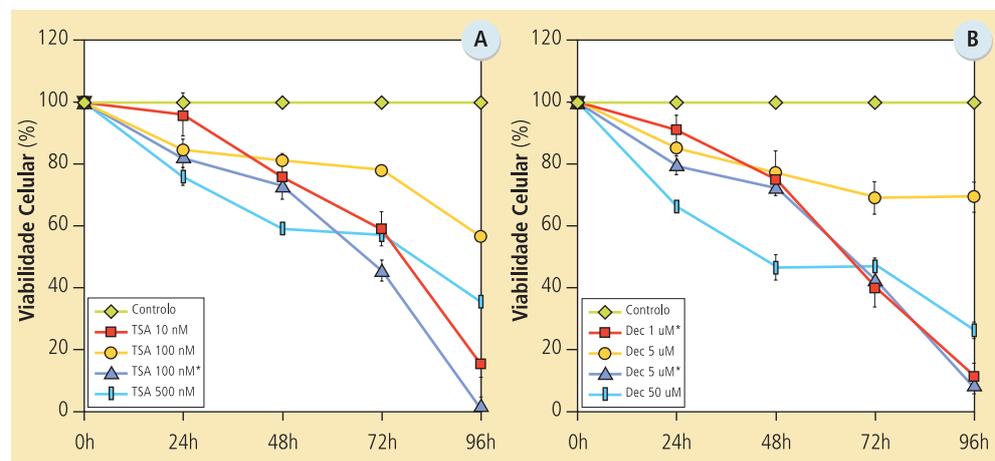
Nas células tratadas com TSA A e DEC em baixas doses (10 nM e 1 μ M, respetivamente) apenas se verificou uma diminuição de 20% e 10%, respetivamente, após 96 horas de incubação, comparativamente com o controlo.

Devido à reversibilidade dos efeitos antiproliferativos da TSA A e DEC, avaliámos se a administração diária seria mais eficiente na redução da proliferação celular do que a administração de uma dose única. Verificámos uma redução superior da proliferação celular comparativamente à verificada quando as células foram tratadas com concentrações mais elevadas numa administração única. De facto, quando combinadas doses diárias de 100 nM de TSA A (Figura 66A) ou de 5 μ M de DEC (Figura 66B), a proliferação celular diminuiu para valores perto do zero, após 96 horas de incubação (quase 100% de redução da proliferação celular). Por outro lado, nas células tratadas com 500 nM de TSA A e 50 μ M de DEC respetivamente, em dose única, constatou-se um decréscimo somente de 60% e 70%, respetivamente (Figuras 66A e 66B).

FIGURA 66

Curvas dose-resposta de TSA A e DEC em administração diária, nas células F-36P.

A proliferação celular foi analisada cada 24h, durante as 96h de incubação com diferentes concentrações de TSA A **(A)** e DEC **(B)**, em administração diária, comparativamente com a administração de dose única. Os dados são expressos em percentagem (%), relativamente ao controlo, e representam a média \pm desvio padrão de pelo menos 3 ensaios independentes. TSA A – Tricostatina A; DEC – Decitabina; ‡, $p < 0,05$; *, $p < 0,01$; †, $p < 0,001$; § dose diária administrada.



Com o objetivo de analisar o efeito sinérgico da associação terapêutica de moduladores epigenéticos, as células F-36P foram tratadas com os dois fármacos em administração simultânea e com um intervalo de 3 horas entre os dois, em concentrações inferiores às utilizadas em monoterapia (Figura 67). Quando as células foram tratadas com os fármacos em monoterapia em baixas concentrações (TSA A 10 nM e DEC 5 μ M), não observamos um efeito citotóxico significativo. A viabilidade celular, após 96 horas de incubação, diminuiu para cerca de 76% e 70%, respectivamente. No entanto, quando as células foram incubadas com os fármacos em associação, observou-se um aumento do efeito citotóxico de cerca de 50% para concentrações inferiores ao IC_{50} , quando comparado com as células tratadas com os fármacos em monoterapia. Este efeito foi mais marcado quando as células F-36P foram previamente incubadas com o inibidor das histonas desacetilase, TSA A, e depois com o agente hipometilante, DEC, atingindo uma decréscimo de 90% na viabilidade celular (Figura 67).

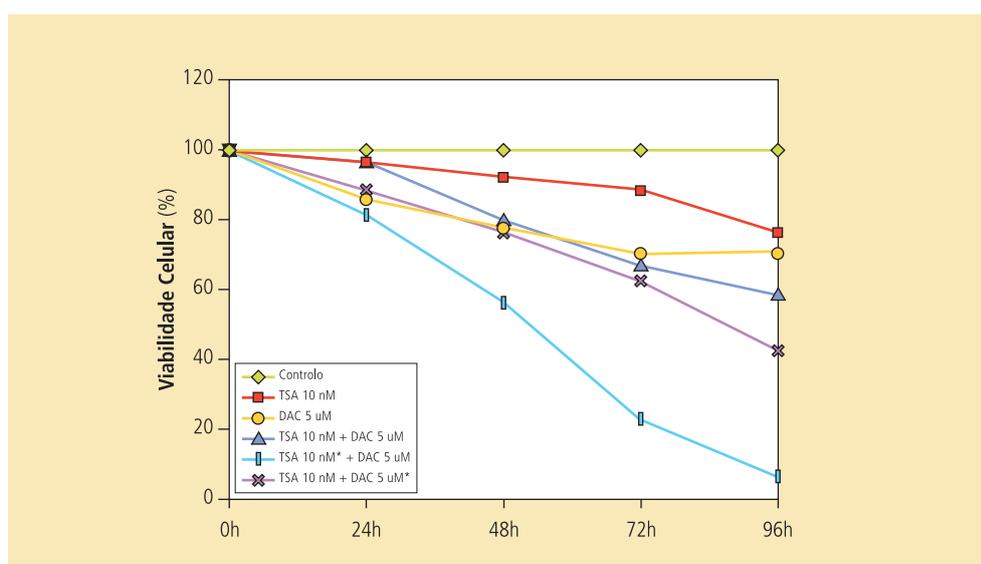


FIGURA 67

Curvas dose-resposta da associação de TSA A e DEC, nas células F-36P.

A proliferação celular foi analisada cada 24h, durante as 96h de incubação com diferentes concentrações de TSA A e DEC, isoladamente ou em combinação. Os dados são expressos em percentagem (%), relativamente ao controlo, e representam a média \pm desvio padrão de pelo menos 3 ensaios independentes. TSA A – Tricostatina A; DEC – Decitabina; ‡, $p < 0,05$; *, $p < 0,01$; †, $p < 0,001$; ¶, pré-incubação de 3 horas.

4.2.3.2. Análise da morte celular induzida pelos fármacos anticancerígenos nas células F-36P

O tipo de morte celular induzida pelos fármacos anticancerígenos, em monoterapia e em associação, foi avaliado com base nas características morfológicas das células, recorrendo à microscopia ótica e por citometria de fluxo, após marcação das células com Anexina V.

4.2.3.2.1. Avaliação da morte celular por microscopia ótica

Algumas das características morfológicas dos esfregaços efetuados na linha celular F-36P encontram-se representadas na figura 68A e B. Assim, estas células possuem características típicas de blastos, apresentando-se com uma elevada relação núcleo/citoplasma, por vezes apresentando também pequenas protuberâncias citoplasmáticas e nucléolos bem visíveis. O citoplasma apresenta características basófilas, enquanto o núcleo se encontra muitas vezes em posição excêntrica, observando-se em geral um significativo número de mitoses (Figura 68A e B). Embora a maioria das células apresente apenas um núcleo, observou-se com alguma frequência a presença de células binucleadas e trinucleadas, como se pode visualizar na figura 68A e B, demarcando a sua imaturidade e características displásicas.

Após tratamento das células F-36P com α -HFPA na concentração de 150 μ M (IC_{50}), a morfologia foi drasticamente alterada (Figura 68C e D). Como se pode observar na figura 68, as células possuem características morfológicas de apoptose, nomeadamente, presença de corpos apoptóticos e de *blebs*, sendo visível a condensação da cromatina e a retração de volume (Figura 68C). Não foram detetadas mitoses e a frequência de células multinucleadas foi muito reduzida. Além disso, observa-se células com núcleos de menores dimensões, cromatina menos condensada e basofilia citoplasmática menos acentuada (Figura 68D).

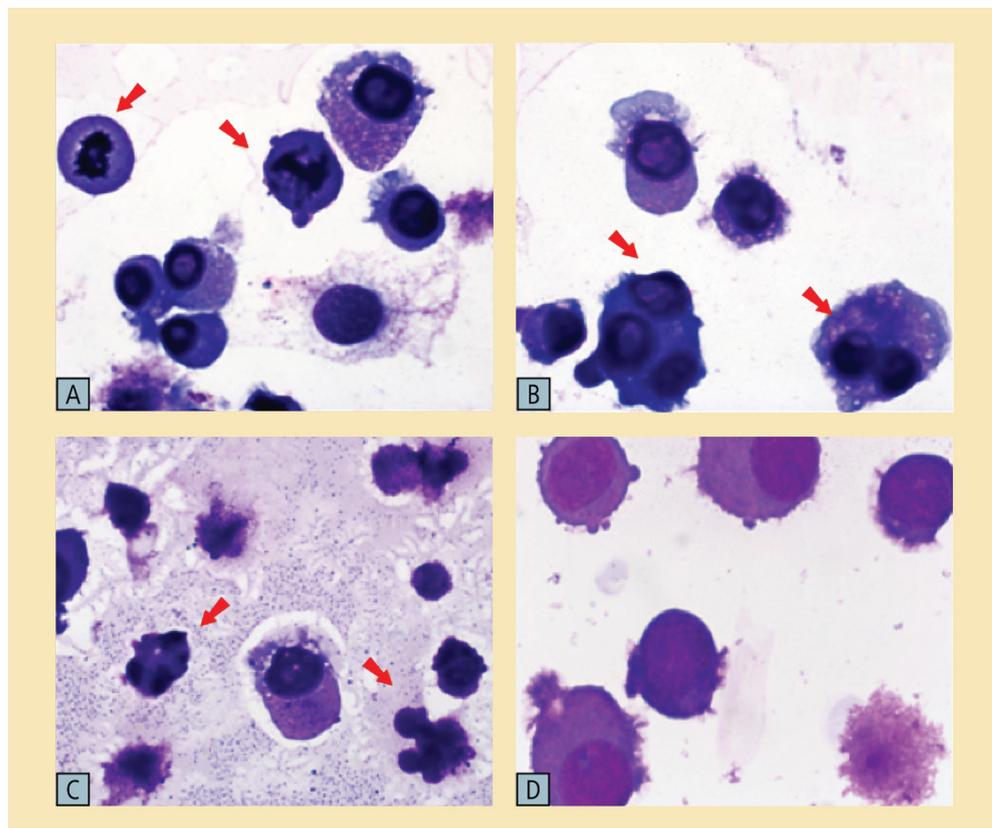


FIGURA 28

Aspeto morfológico das células F-36P na ausência de tratamento e incubadas com α -HFPA.

Em **A e B** estão representadas as características morfológicas das células controlo. Em **(A)** são visíveis mitoses e em **(B)** evidenciam-se células binucleadas e trinucleadas. Em **C e D** estão representadas as características morfológicas das células tratadas com 150 μ M de α -HFPA. Em **(C)** observam-se blastos rodeados por vários corpos apoptóticos, com *blebbing* e fenómenos de picnose. Estas características encontram-se evidenciadas pelas setas. Em **(D)** são visíveis células que apresentam alguma maturação. (ampliação de 1000x).

Da mesma forma, quando as células foram tratadas com MG262 na concentração de 25nM, em monoterapia, verificou-se a presença de diversas células em apoptose, evidenciando vacuolização citoplasmática, *blebs*, retração celular, fragmentação nuclear, como também corpos apoptóticos (Figura 69A). Além disso, as células são menos irregulares, mas apresentam nucléolos, núcleos excêntricos, elevada frequência de mitoses e exteriorização de cromossomas (Figura 69 B-D).

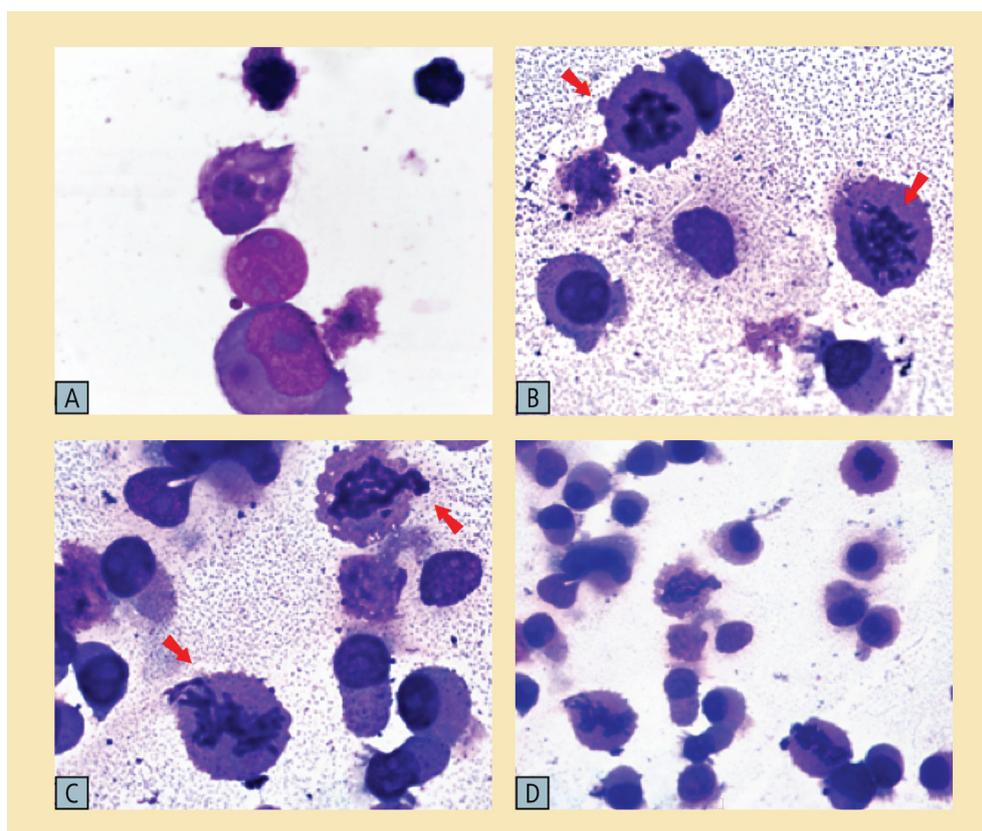


FIGURA 69

Características morfológicas das células F-36P tratadas com MG262.

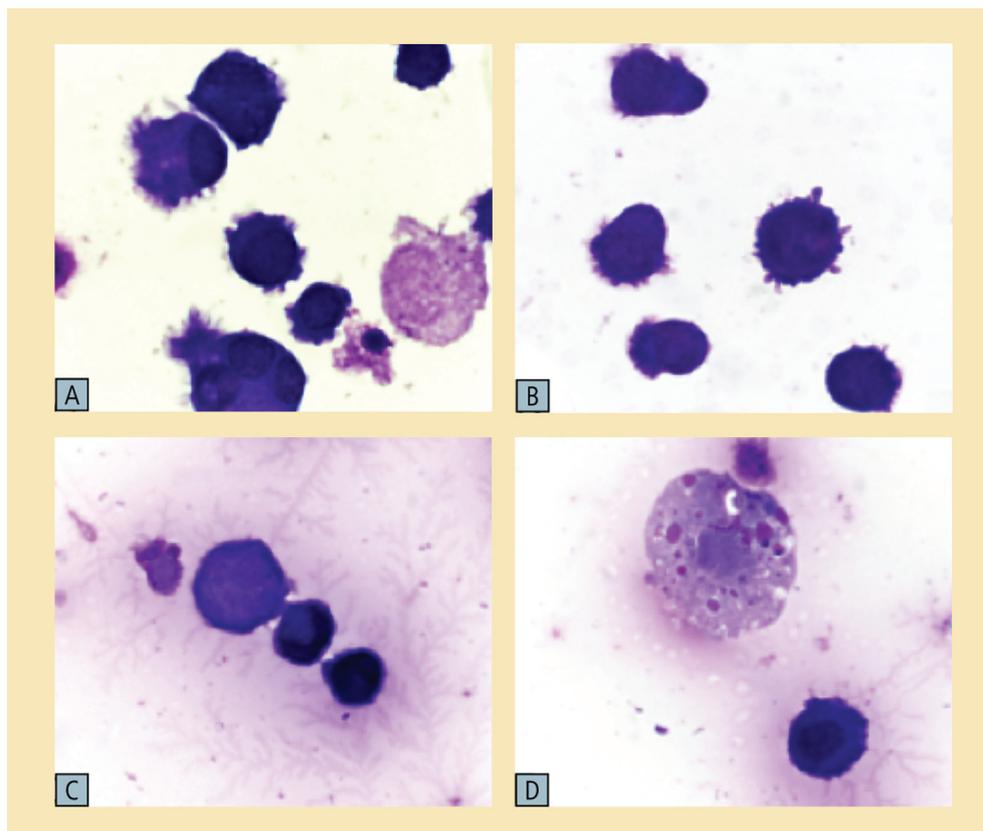
Em **(A)** estão representadas células em diferentes fases do processo apoptótico. Na figura **(B)** evidenciam-se defeitos na divisão celular mitótica e desorganização cromossômica acompanhadas de formações em *blebs*; observa-se ainda em **(C)** a exteriorização de cromossomas (ampliação de 1000x). Em **(D)** a ampliação de 400x permite a percepção da frequência significativa de mitoses anômalas no esfregaço.

Na figura 70, estão representadas as alterações morfológicas nas células após tratamento com as associações farmacológicas de 50nM de Ara-C com 100 μ M de α -HFPA na figura 70A, 100nM de Imatinib com 50 μ M de α -HFPA na figura 70B, e 25nM de MG262 com 50 μ M de α -HFPA nas figuras 70C e D. Em todas as condições farmacológicas testadas observam-se células em apoptose inicial. No entanto, enquanto que com as associações entre α -HFPA e Ara-C, e α -HFPA e Imatinib se evidenciam sobretudo retração de volume e formação de *blebs*, na associação entre α -HFPA e MG262 é possível visualizar uma elevada quantidade de células com fragmentação nuclear e vacuolização citoplasmática.

FIGURA 70

Características morfológicas das células F-36P tratadas com fármacos anticancerígenos em associações farmacológicas.

Nas células tratadas com 50nM de Ara-C e 100 μ M de α -HFPA (4H) **(A)**, evidencia-se a presença de corpos apoptóticos e um número residual de células multinucleadas. Em **(B)** são visíveis corpos apoptóticos alusivos à incubação com 100 nM de Imatinib e 50 μ M de α -HFPA (4H). Em **(C)** e **(D)** estão representadas algumas características apresentadas pelas células tratadas com 50 μ M α -HFPA e 25 nM de MG262, nomeadamente corpos apoptóticos e vacuolização (ampliação de 100x).

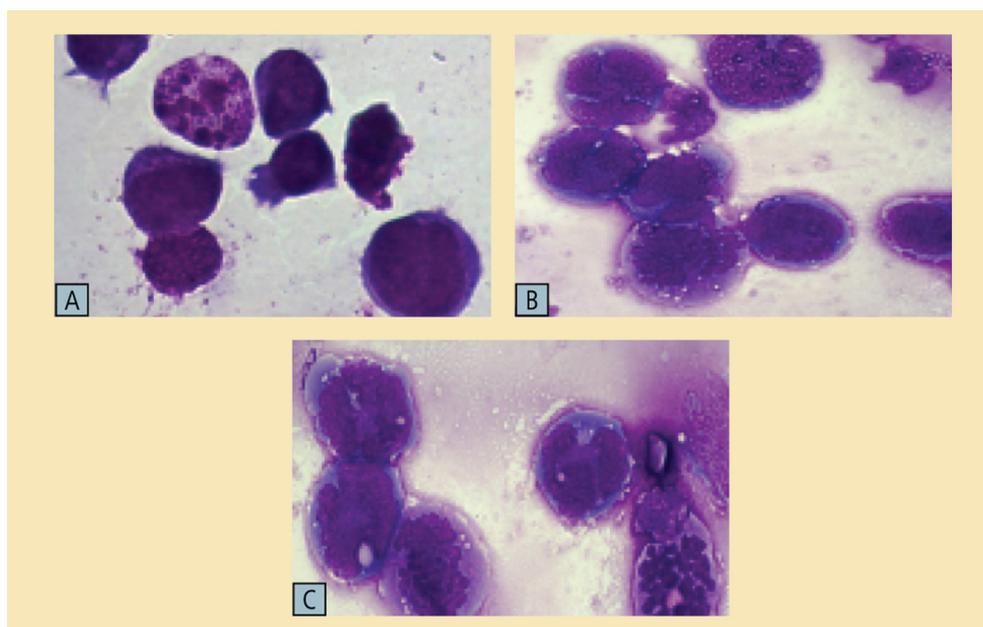


Após o tratamento com os modificadores epigenéticos, as células apresentavam características morfológicas de morte por apoptose, como o *blebbing*, a condensação da cromatina, a fragmentação nuclear e os corpos apoptóticos (Figura 71).

FIGURA 71

Características morfológicas das células F-36P tratadas com fármacos anticancerígenos em associações farmacológicas.

(A) Células tratadas com DEC **(B)** Células tratadas com TSA **(C)** Células tratadas com DEC e TSA **(D)** Células tratadas com DEC e TSA **(E)** Células tratadas com DEC e TSA (ampliação de 1000x).



4.2.3.2.2. Análise da morte celular por citometria de fluxo recorrendo à marcação por Anexina V

A análise do tipo de morte celular foi ainda efetuada recorrendo à marcação das células com anexina V ligada a APC. Desta forma foi possível proceder à avaliação do tipo de morte celular, decorrente da ação dos fármacos α -HFPA e MG262 em monoterapia nas células F-36P. Os resultados obtidos estão de acordo com os estudos morfológicos, tendo-se observado, de um modo geral, aumento da percentagem de células em apoptose e diminuição da percentagem de células viáveis de modo dependente da dose e do tempo de incubação (Figura 72).

Da mesma forma, a ação citotóxica dos fármacos α -HFPA e MG262 já verificada confirma-se pelos resultados obtidos através da marcação com a anexina V. Apenas se verificou uma discordância relativamente às células incubadas com a concentração de 150 μ M de α -HFPA, onde se observou uma maior percentagem de morte celular por apoptose do que o verificado pelas curvas dose-resposta.

Para avaliar o tipo de morte celular induzido pela TSA A e DEC, utilizámos a análise por citometria de fluxo após coloração das células com anexina V e iodeto de propídeo. Como ilustra a figura 73, a TSA e a DEC induzem morte celular preferencialmente por apoptose tardia e/ou necrose. De acordo com as curvas dose-resposta, a análise da morte celular por citometria de fluxo demonstra que a redução da morte celular é dependente do fármaco e do esquema utilizado. De facto, observou-se uma diminuição da viabilidade de cerca de 40% das células F-36P e um aumento de aproximadamente de 10% das células em apoptose/necrose, quando estas foram tratadas com 10 nM de TSA seguidos de 5 μ M de DEC, comparativamente com as células controlo (90% de viabilidade vs 10% de apoptose/necrose) (Figura 73).

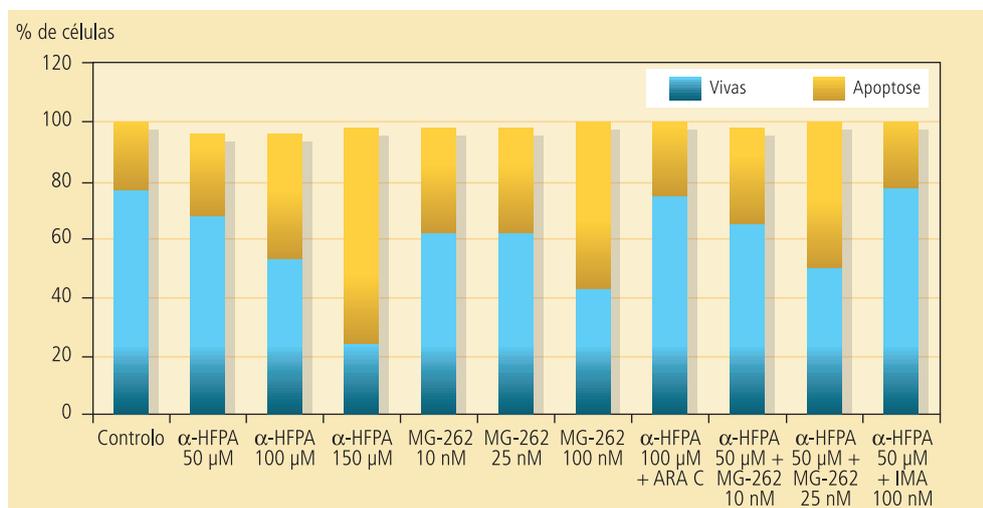


FIGURA 72

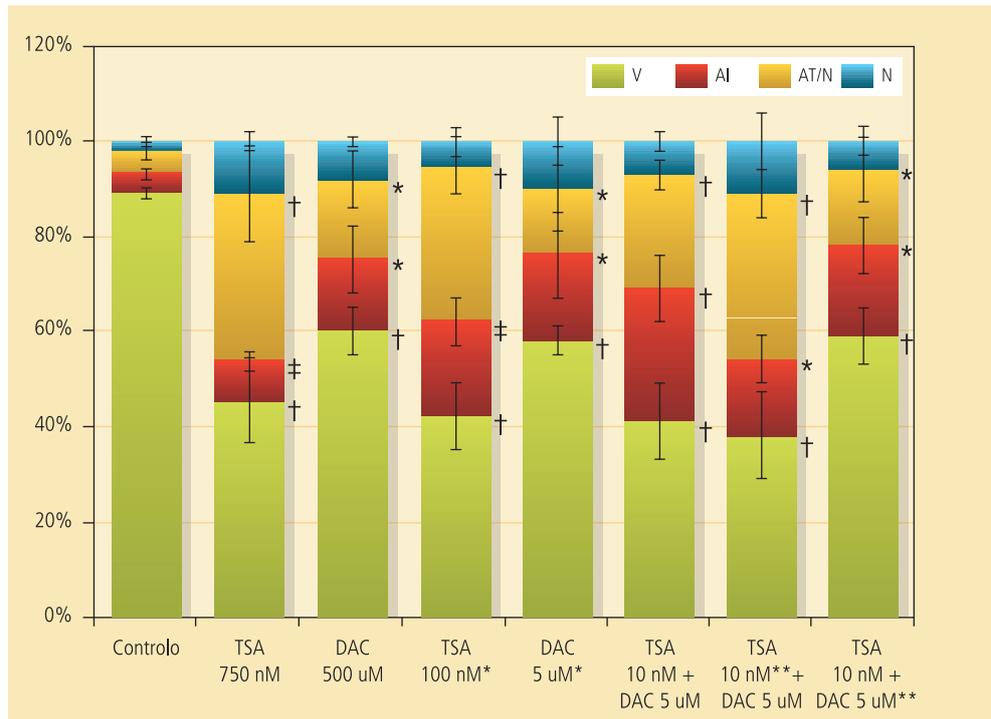
Análise da morte celular por citometria de fluxo através da marcação por anexina V-APC.

As células F-36P foram tratadas na ausência (controlo) e na presença de α -HFPA e MG262 nas concentrações indicadas na figura, e segundo o descrito na secção de materiais e métodos. Verifica-se em geral um aumento da percentagem de células em apoptose e diminuição de células vivas, de forma dependente da dose dos fármacos administrados, após 48h. Os resultados estão expressos em % de células e representam a média de 3 ensaios independentes.

FIGURA 73

Análise da morte celular por citometria de fluxo.

Resultados obtidos por citometria de fluxo quando as células F-36P foram incubadas, na ausência (controlo) e na presença de TSA A e DEC, em monoterapia e em associação. Os dados são expressos em percentagem (%), relativamente ao controlo, e representam a média \pm desvio padrão de pelo menos 3 ensaios independentes. TSA A – Tricostatina A; DEC – Decitabina; ‡, $p < 0,05$; *, $p < 0,01$; †, $p < 0,001$; ††, pré-incubação de 3H; V – células viáveis; AI – células em apoptose inicial; AT/N – células em apoptose tardia/necrose; N – células em necrose.



4.2.4. Análise dos mecanismos envolvidos na citotoxicidade induzida pelos novos fármacos anticancerígenos na linha celular F-36P

Após confirmado o potencial efeito citotóxico e antiproliferativo dos novos fármacos anticancerígenos no tratamento de SMD, e de verificar que este efeito se deve à morte celular por apoptose, foram avaliados alguns dos possíveis mecanismos moleculares envolvidos no mecanismo de ação destes fármacos. Para o efeito foi analisada, por citometria de fluxo, a expressão de moléculas reguladoras da apoptose, como as proteínas BAD, BAX, BCL-2, Survivina, Caspase 3, FAS e reguladoras do ciclo celular como a Ciclina D1.

Inicialmente foi analisada a eficácia do fármaco α -HFPA na inibição da farnesiltransferase através da expressão das Laminas A/C, frequentemente utilizadas como marcador fármaco-dinâmico para a farnesilação. Na figura 74 pode-se observar, nas células F-36P tratadas com α -HFPA em monoterapia e em associação com novos fármacos, um decréscimo da expressão da Lamina A/C. Por outro lado, nas células tratadas com MG262 observou-se o efeito contrário.

De igual modo, para avaliar a eficácia do MG262 na inibição do proteasoma nas células F-36P, fomos determinar a expressão dos conjugados de Ubiquitina, como se observa na figura 75.

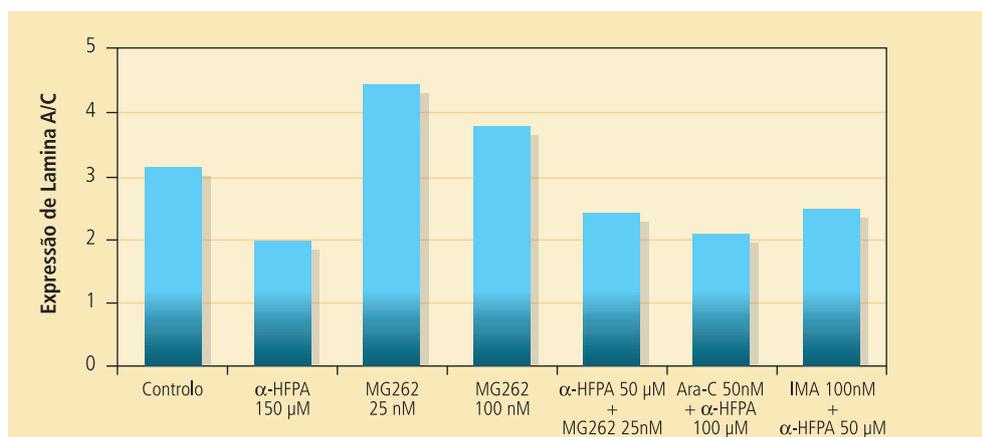


FIGURA 74

Avaliação da expressão de Laminas A/C nas células F-36P por citometria de fluxo.

A expressão de Laminas A/C foi analisada nas células F-36P na ausência (controlo) e após tratamento com α-HFPA e MG262 em monoterapia e em associação com os fármacos, nas concentrações referidas na Figura, recorrendo-se a anticorpos monoclonais conjugados com fluorocromos e detetados por citometria de fluxo, de acordo com o referido na secção de materiais e métodos. Os resultados são expressos em média de intensidade de fluorescência (MIF) e representam a média de 3 ensaios independentes.

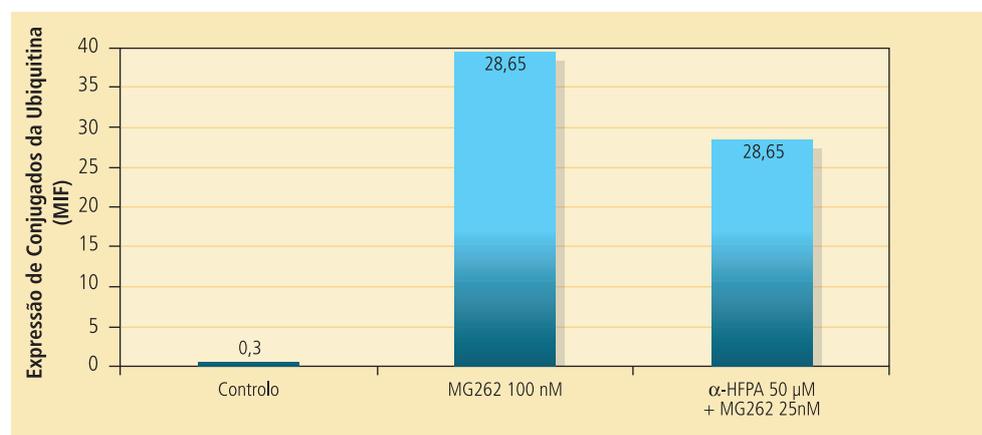


FIGURA 75

Avaliação dos conjugados de ubiquitina nas células F-36P por citometria de fluxo.

A expressão das proteínas marcadas pela Ubiquitina (conjugados de ubiquitina) foi analisada nas células F-36P incubadas na ausência (controlo) e presença de MG262, em monoterapia e em associação com α-HFPA, nas concentrações indicadas na Figura, recorrendo-se a anticorpos monoclonais conjugados com fluorocromos e deteção por citometria de fluxo, como referido na secção de materiais e métodos. Os resultados são expressos em média intensidade de fluorescência (MIF) e representam a média 3 ensaios independentes.

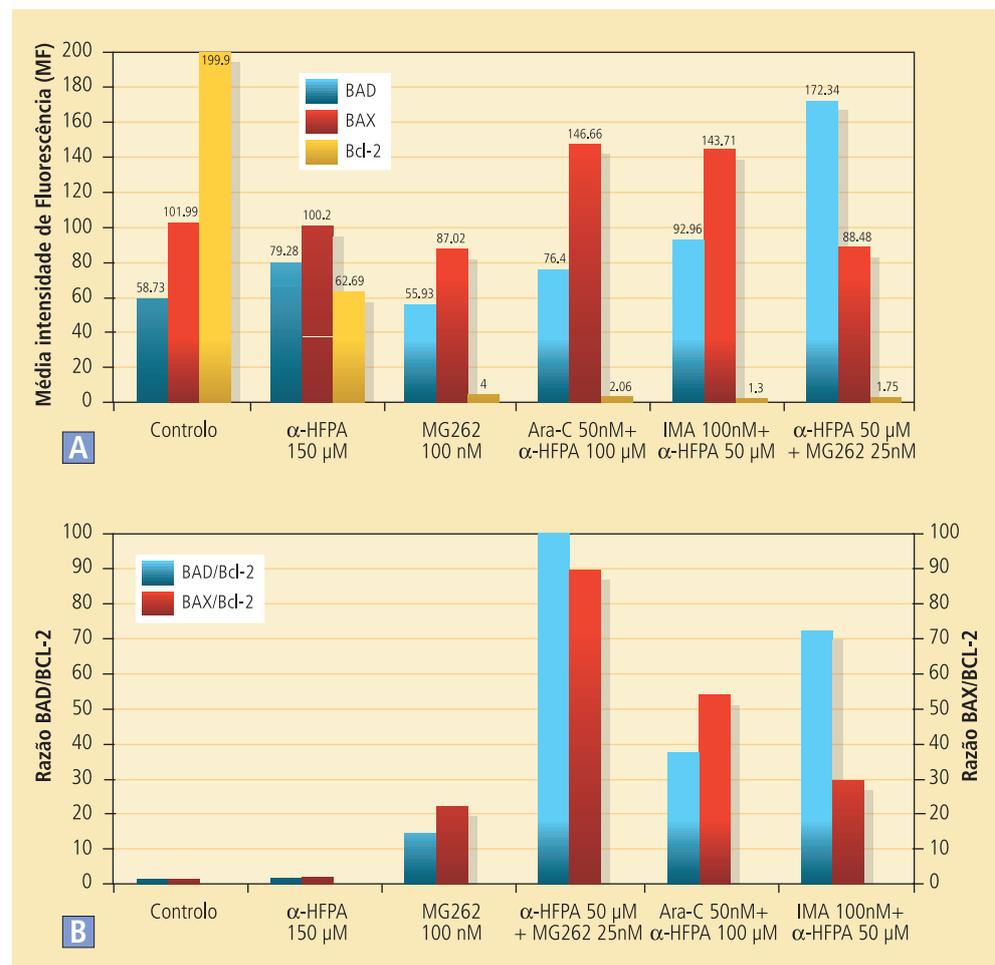
Verificamos que, na presença de MG262 em monoterapia, a expressão dos conjugados de Ubiquitina aumentou cerca de 40 vezes relativamente ao controlo. Nas células tratadas com MG262 em associação com o IF observou-se que este aumento foi de cerca de 29 vezes.

Após confirmar o mecanismo primário de ação do MG262 e IFT, foram analisados alguns mecanismos moleculares envolvidos no efeito citotóxico e antiproliferativo dos fármacos em estudo, quer em monoterapia quer em associação nas condições representadas nas figuras 76 e 77.

Na figura 76A está representada a expressão das proteínas pertencentes à família BCL-2, nomeadamente a BAD, BAX e BCL-2. Como se pode observar, em todas as condições testadas ocorreu uma diminuição acentuada na expressão de BCL-2, relativamente ao controlo. Por outro lado, observou-se um aumento da expressão da proteína pró-apoptótica BAD em todas as condições, com particular evidência nas células tratadas com a associação de

25nM de MG262 com 50 μ M α -HFPA. Quando as células foram tratadas com as associações farmacológicas de 50 μ M de Ara-C com 100 μ M de α -HFPA e de 100nM de Imatinib e 50 μ M α -HFPA observou-se um aumento da expressão da BAX de cerca de 1,4 vezes. Por outro lado, tanto na incubação de 100nM de MG262 isolado como na associação 25nM de MG262 com 50 μ M de α -HFPA foi verificado um ligeiro decréscimo.

Como se pode observar na figura 76B, ocorreu um aumento da razão BAX/BCL-2 e BAD/BCL-2 em todas as condições testadas, relativamente ao controlo, o que confirma os dados obtidos anteriormente nas curvas dose-resposta e nos estudos morfológicos. É possível observar que esta razão é significativamente superior nas células tratadas com os fármacos em associação comparativamente às células tratadas com os fármacos em monoterapia, sendo esta diferença mais significativa nas células incubadas com a associação de 25 nM de MG262 com 50 μ M de α -HFPA. De igual modo, na associação entre 100 nM de Imatinib e 50 μ M de α -HFPA (4H) é visível uma clara diferença entre a razão BAD/BCL-2 e a razão BAX/BCL-2, com notório predomínio da primeira.



Para além das proteínas da família BCL-2, foi analisado também a expressão de outras proteínas reguladoras da apoptose, como o recetor FAS, a Caspase 3 e a Survivina (Figura 77). Assim, na figura 77A observa-se um aumento da expressão do recetor de morte FAS, nas células F-36P incubadas com 100 nM de MG262, contrastando com a diminuição da expressão desta proteína nas restantes condições testadas. De igual modo, nas células tratadas com a concentração de 100 nM de MG262, observou-se um aumento da Caspase 3, um efector de morte onde convergem as vias extrínseca e intrínseca da apoptose, não se tendo verificado para as restantes condições uma variação significativa em relação ao controlo (Figura 77B). A análise da expressão da Survivina revela que ocorre um decréscimo na sua expressão nas associações farmacológicas, nomeadamente na combinação entre 100 nM de Imatinib com 100 μ M de α -HFPA e na adição de 25 nM de MG262 com 50 μ M de α -HFPA, como é possível verificar na Figura 77C.

Para confirmar o efeito antiproliferativo foi ainda analisada a expressão da proteína reguladora do ciclo celular, Ciclina D1, como representado na figura 77D. Como podemos observar nesta figura, nas concentrações referidas anteriormente, verifica-se diminuição da expressão de Ciclina D1 na totalidade dos casos, relativamente ao controlo, sendo este decréscimo mais acentuado nas células tratadas com MG262 isoladamente, e na associação simultânea de 25 nM de MG262 com α -HFPA.

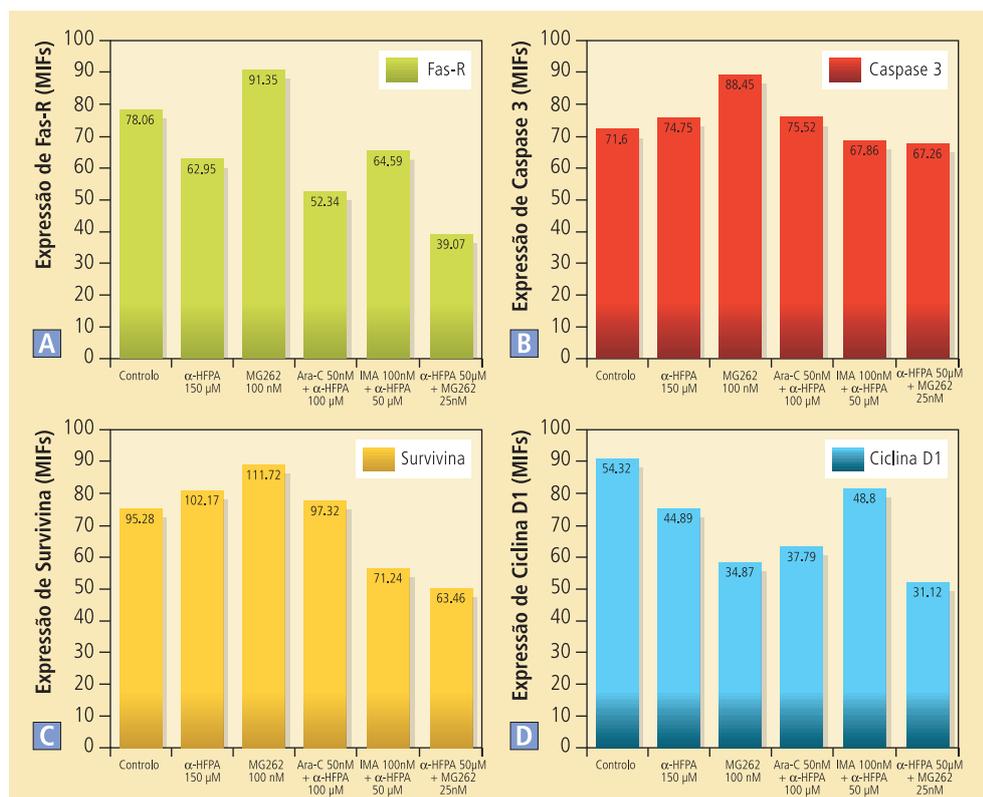


FIGURA 77

Avaliação da expressão de FAS, caspase 3, survivina e ciclina D1 por citometria de fluxo.

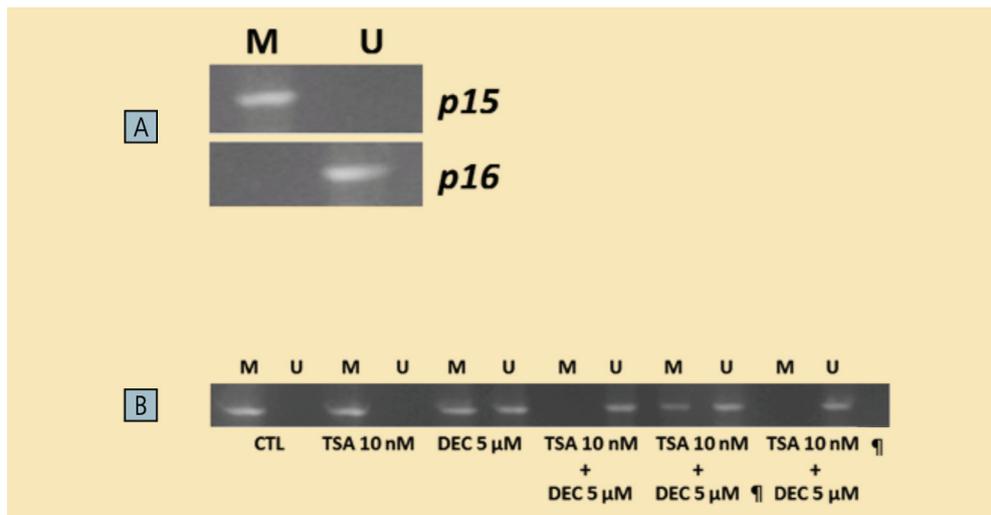
A expressão das proteínas foi analisada nas células F-36P tratadas com α -HFPA e MG262 em monoterapia e em associação (α -HFPA com Ara-C, α -HFPA com MG262 e α -HFPA com Imatinib) recorrendo-se a anticorpos monoclonais conjugados com fluorocromos e detetados por citometria de fluxo. Os resultados são expressos em média de intensidade de fluorescência (MIF) e representam a média de 3 ensaios independentes.

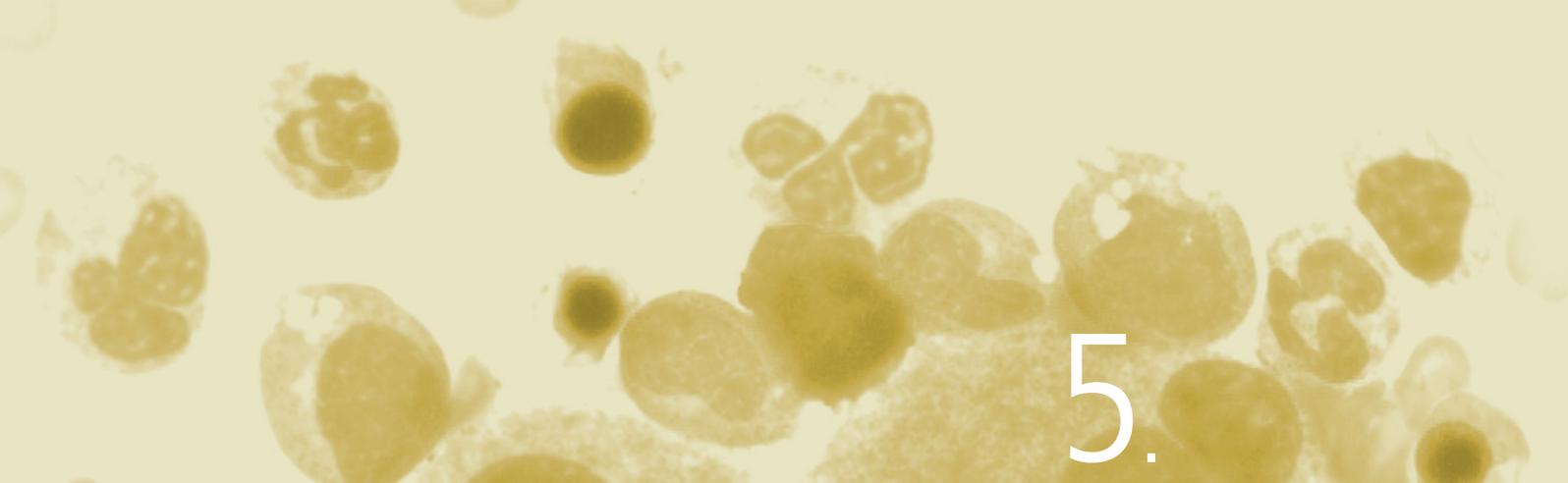
Sabendo que na SMD o gene *p16*, mas sobretudo o gene *p15* estão frequentemente metilados, fomos analisar o *status* de metilação destes genes nas células F-36P para posterior avaliação do efeito hipometilante dos moduladores epigenéticos utilizados. Assim, nas células F-36P, somente o gene supressor tumoral *p15* se encontra metilado (Figura 78A), pelo que o efeito hipometilante da DEC e TSA A, em monoterapia ou em combinação, foi avaliado somente no gene *p15* (Figura 78B). Como seria de esperar e tendo em atenção o mecanismo de ação da TSA A, nas células tratadas com este HDACi em monoterapia, não modifica o estado de metilação do *p15*; por outro lado, a DEC induz um efeito hipometilante, observando-se diminuição dos alelos *p15* metilados e um aumento dos alelos não metilados (Figura 78). Este efeito desmetilante foi mais evidente quando as células foram tratadas simultaneamente com a associação de 5 μ M de DEC e 10 nM de TSA A com um intervalo de 3 horas, tendo como consequência uma eliminação de todos os alelos *p15* metilados.

FIGURA 78

Status de metilação das células F-36P.

(A) O *status* de metilação dos genes *p15* e *p16* foi analisado por PCR-MS. Nas células F-36P o gene *p15* está metilado e o *p16* não metilado. (B) Análise por PCR-MS da metilação do gene *p15* após as células F-36P serem tratadas com TSA A e DEC. A Figura representa o *status* de metilação do gene *p15* nas células F-36P não tratadas e após 72H de tratamento com 10 nM de TSA A e 5 μ M de DEC, isoladamente ou em combinação. M – metilado; U – não metilado; TSA A – Tricostatina A; DEC – Decitabina; ¶ - pré-incubação de 3H.



A microscopic image showing various types of cells, likely from a bone marrow smear, with different sizes and shapes, some with prominent nuclei. The background is a light yellowish-green.

5.

Discussão

5.1. Influência da análise de parâmetros clínicos, laboratoriais e moleculares no diagnóstico, prognóstico e avaliação de grupos de risco em doentes com SMD

A SMD é um grupo de doenças clonais da célula estaminal hematopoiética pluripotencial caracterizadas por displasia, hematopoiese ineficaz e potencial risco de evolução para LMA, apresentando resistência às terapêuticas convencionais. Os mecanismos envolvidos na patogénese desta doença são múltiplos e complexos e envolvem várias alterações genéticas e epigenéticas que atingem a célula pluripotencial em várias etapas (Pfeilstöcker *et al.*, 2007), originando alterações na proliferação, diferenciação e apoptose das células do sistema hematopoiético (Hirai, 2003; Pfeilstöcker *et al.*, 2007).

Apesar dos múltiplos esforços para esclarecer os mecanismos moleculares da SMD, a patogénese dos estádios iniciais desta patologia e da transição para LMA não estão ainda totalmente clarificados. Além disso, a relevância clínica desses mecanismos para o diagnóstico e para a avaliação do prognóstico, assim como, para a identificação de novos grupos de risco continuam por definir.

5.1.1. Caracterização clinico-laboratorial dos doentes com SMD

O estudo decorreu ao longo de 54 meses e englobou 102 doentes com SMD *de novo*, os quais apresentam uma idade mediana de 74 anos, com uma relação masculino/feminino de 0,8. Estes dados estão de acordo com os disponíveis na literatura, embora a maior parte dos estudos, refira um ligeiro

predomínio do sexo masculino (Ma, Does, Raza, & Mayne, 2007; Ma, Selvin, Raza, Foti, & Mayne, 2007).

Relativamente à distribuição dos doentes pelos subtipos da OMS de 2008, verificamos um predomínio de doentes com citopenias refractárias, destacando-se o subtipo CRDM, que representa 50,98% da amostra, um valor superior ao descrito na literatura (aproximadamente 30%) (Germing *et al.*, 2006; Malcovati *et al.*, 2005). Por outro lado, a percentagem de doentes com anemias refractárias com excesso de blastos (AREBs) é inferior ao referido por outros autores (15,68% vs 40%, respetivamente). Os subtipos Síndrome 5q- e ARSA, representam 3,92% e 5,88%, respetivamente, valores que estão de acordo com a literatura (Breccia *et al.*, 2006; Germing *et al.*, 2006; Malcovati *et al.*, 2005). O subtipo LMMC representa 11,76% da amostra, valor inferior ao descrito (31%) por Williamson em 1994 (Williamson, Kruger, Reynolds, Hamblin, & Oscier, 1994).

Esta distribuição por subtipos permite uma previsão relativamente aos grupos de prognóstico, ou seja, o predomínio de doentes com SMD em estádios iniciais irá corresponder a índices de prognóstico baixos e intermédios. Assim, a distribuição segundo o IPSS divide a nossa população em 87% de doentes de baixo risco (incluindo o risco baixo e intermédio-1) e 13% de alto risco (incluindo risco intermédio-2 e alto). A nossa população apresenta um predomínio de doentes com baixo risco em relação aos 70% descritos por Greenberg (P. Greenberg *et al.*, 1997).

Utilizando o IPSS-R e o WPSS, a distribuição por grupos de risco diluiu-se, diminuindo o número de doentes com baixo risco, embora a maioria de doentes continue a pertencer a estes subgrupos, a percentagem de doentes nos grupos de intermédio e alto risco aumenta, aproximando-se da literatura (P. L. Greenberg *et al.*, 2012; Malcovati *et al.*, 2007).

Analisando os parâmetros hematológicos, verificam-se constatações esperadas tais como, uma média superior de leucócitos nos doentes com LMMC, uma média inferior de neutrófilos nos doentes com NR e uma média inferior de plaquetas na TR, mas também na AREB-2 ($p < 0,05$).

Os doentes com os subtipos CRDM e AREBs, juntamente com a NR ($p < 0,05$), apresentam médias de neutrófilos inferiores, relativamente a outros subtipos. De igual modo, estes doentes (CRDM e AREBs) também apresentam médias de contagens plaquetares inferiores às dos doentes com Síndrome 5q-, AR e ARSA. Estes resultados podem eventualmente representar um estado proliferativo, com bloqueio da diferenciação e/ou apoptose terminal, que se traduz na diminuição das células maduras, sobretudo da série mielóide.

Apesar da anemia ser a citopenia mais prevalente na SMD, todos os subtipos, à exceção dos doentes com Síndrome 5q-, apresentam uma média

de hemoglobina superior ou igual a 10 g/dL. Aliás, os doentes com Síndrome 5q- são os que apresentam uma concentração de hemoglobina mais baixa ($p < 0,05$), em oposição aos doentes com NR e TR.

Dos parâmetros bioquímicos avaliados, apenas a eritropoietina e a $\beta 2$ -microglobulina apresentam resultados cujas diferenças encontradas são estatisticamente significativas, podendo influenciar o prognósticos, sobretudo a eritropoietina que mostrou apresentar taxas de sobrevivência inferiores para valores séricos mais elevados ($p = 0,0336$). Também Neumann (2009) (Neumann, Gattermann, Barthelmes, Haas, & Germing, 2009) mostrou em doentes com SMD de alto risco que a $\beta 2$ -microglobulina é um parâmetro prognóstico independente para a OS e progressão para LMA.

Embora a LDH não apresente diferença estatística entre os diferentes subtipos da OMS, mostrou influenciar a sobrevivência ($p = 0,0048$), à semelhança de outros trabalhos (Moon *et al.*, 2010; Rauw *et al.*, 2011). O mesmo não se verificou para a ferritina, também apontada como fator de prognóstico independente em SMD de risco intermédio-1 (B. Li *et al.*, 2013).

A análise citogenética não foi conclusiva em cerca de 14% de doentes, valor este um pouco superior aos 10% descritos na literatura. Na maioria dos doentes verificámos a existência de um cariótipo normal (71,3%), seguido pela trissomia do cromossoma 8 (14,9%). No entanto, não encontramos relação entre este resultado citogenético e as outras variáveis estudadas.

5.1.2. Caracterização celular e molecular dos doentes com SMD

5.1.2.1. Influência da célula estaminal pluripotencial no diagnóstico e prognóstico dos diferentes subtipos de SMD

A SMD é considerada uma doença clonal da célula estaminal hematopoiética (HSC), pelo que a existência de alterações neste tipo de células, além de estar na base da etiopatogenia da doença (Xie *et al.*, 2010), também pode influenciar a evolução para LMA. Mais recentemente, foi identificado um pequeno subconjunto destas células, com capacidade exclusiva de se autorrenovar e diferenciar em diferentes linhagens de células cancerígenas que constituem o tumor (Xie *et al.*, 2010), as chamadas células estaminais cancerígenas (CSC). Estas células já foram identificadas em muitos tipos de cancros, nomeadamente no cancro do cérebro, mama, próstata, cólon e pâncreas (Xie *et al.*, 2010), e também em leucemias e mieloma múltiplo (células estaminais leucémicas, LSC). Assim, é crucial identificar e caracterizar molecularmente estas células de modo a identificar novos marcadores preditivos de prognóstico e novos alvos terapêuticos.

Pensa-se que a leucemia aguda pode ser erradicada durante o seu desenvolvimento, através de terapêuticas dirigidas a propriedades únicas da célula estaminal leucémica. Como a SMD é uma condição pré-leucémica, a aplicação deste modelo de célula estaminal leucémica permitiria uma erradicação do clone de maneira semelhante. Por este motivo procedemos à análise deste compartimento medular.

Vários estudos mostram que as HSC expressam CD34 (Xie et al., 2010) e que a marcação com CD117 (c-KIT) identifica a diferenciação em célula estaminal mielóide. As CSC/LSC, além de expressarem CD34, expressam CD123 (IL3-R) (Jordan et al., 2000), o que as distingue das células estaminais normais.

Consistente com o descrito na literatura (Xie et al., 2010), no nosso estudo verificámos um aumento tendencial da percentagem de células CD34+ nos doentes SMD em estádios mais avançados (AREB-2), bem como de células que coexpressam CD117 o que pode contribuir para a evolução destes doentes para LMA. O aumento da percentagem de células CD34+/CD117+ verificado nos doentes com CRDM pode, após seguimento mais alargado destes doentes, identificar aqueles que tem maior risco de transformação leucémica, tal como descrito num doente pediátrico com SMD (Tavil, Cetin, & Tuncer, 2006). A evolução da SMD acompanha-se de alterações imunes complexas, incluindo defeitos na célula T e NK, diminuição das funções dos neutrófilos e células apresentadoras de antígenos, alterações na produção de anticorpos e citocinas inflamatórias (Mewawalla & Dasanu, 2011), como a IL-6 e o TNF- α . A utilização de terapêutica imunomoduladora, como a lenalidomida e o ATG, está de acordo com a presença de um mecanismo imune em alguns subtipos da doença.

No entanto, a avaliação destas citocinas na HSC e LSC não foi ainda analisada em doentes com SMD.

Assim, a análise da célula estaminal hematopoiética permitiu a identificação de grupos de células com produção de citocinas inflamatórias, nomeadamente IL-6 e TNF- α . A produção de IL-6 foi observada na célula estaminal hematopoiética no subtipo AREB-2 e na célula estaminal leucémica no subtipo TR. OTNF- α foi também observado na célula estaminal hematopoiética no subtipo LMMC e na célula estaminal leucémica no subtipo AREB-2. Salienta-se, assim, a presença das duas citocinas inflamatórias nos doentes com AREB-2 ($p < 0,05$), embora a IL-6 predomine na HSC de características fenotípicas "normais" e o TNF- α na LSC. Uma vez que neste subtipo se encontra o maior número de doentes que progrediu para LMA, estão resultados poderão estar relacionadas com a evolução da doença.

A heterogeneidade da SMD representa uma limitação inerente, pelo que a integração de informação relativa a investigação molecular, genética e

imunológica com a prática clínica pode traduzir-se em avanços no conhecimento da doença.

5.1.2.2. Avaliação da influência da apoptose no diagnóstico e prognóstico dos diferentes subtipos de doentes com SMD

A hematopoiese ineficaz, e consequentes citopenias periféricas, é um marcador biológico da SMD, podendo estar associada a um aumento da apoptose nos precursores hematopoiéticos. Raza A. e colaboradores (Raza *et al.*, 1995) mostraram a presença de apoptose marcada nos vários subtipos de SMD, incluindo AR e AREB, em 26 dos 50 doentes estudados. No entanto, a apoptose estava presente nas células diferenciadas, aparentemente sem envolvimento dos mieloblastos. Mais recentemente, Li X. e seus colaboradores (X. Li, Bryant, & Deeg, 2004) demonstraram que a apoptose ocorre primariamente nas células da medula não clonais (determinado por FISH), mas também, em menor extensão, nos precursores clonais, incluindo mieloblastos. Estas observações juntamente com os dados sobre a atividade do NF- κ B (que regula a expressão de vários genes antiapoptóticos, e que está relacionada com estádios avançados de SMD) (Kerbaui *et al.*, 2005) são consistentes com outros dados da literatura que mostram que as células de doentes em estádios iniciais de SMD, incluindo os precursores CD34+, apresentam uma maior tendência para a apoptose. Contrariamente, os precursores hematopoiéticos em estádios avançados de SMD exibem menos apoptose e mais características proliferativas (Parker & Mufti, 2000; Rajapaksa, Ginzton, Rott, & Greenberg, 1996). Este padrão sugere que com a progressão da doença, as células clonais adquirem a capacidade de escapar aos sinais pró-apoptóticos (Bogdanović *et al.*, 1997; Parker & Mufti, 2000; Tsoplou *et al.*, 1999). No entanto, ainda existe muito por esclarecer sobre a participação da apoptose na SMD.

São várias as moléculas envolvidas na apoptose e na progressão da doença como, recetores membranares e moléculas sinalizadoras intracitoplasmáticas. Entre as primeiras encontram-se os recetores da família do TNF, nomeadamente os pró-apoptóticos, TNF- α -R1, os recetores do TRAIL, TRAIL-R1/R2 (ou TRAIL-DR4 e DR5) e o FAS (e o seu ligando, FAS-L), e os antiapoptóticos, TRAIL-R3 e R4 (TRAIL-Dc-R1 e R2). Nas segundas, salientamos as proteínas pró-apoptóticas, TRADD, FADD e a proteína da família BCL-2, BAX, e as anti-apoptóticas, FLIP, IAP, NF- κ B, PI3K/AKT e BCL-2.

No nosso trabalho, as moléculas estudadas foram as proteínas da família BCL-2, BCL-2 e BAX, o TRAIL e seus recetores, o FAS-L, a IAP sobrevivina, a caspase 3, o citocromo C e a p53. Os nossos resultados mostram um aumento da expressão do recetor TRAIL-R1 nos doentes com Síndrome 5q- e do TRAIL-

R2 no subtipo AR; um aumento de FAS-L na TR e, também, um aumento de caspase 3 nas CRDU. Por sua vez a média da percentagem de células a expressar caspase 3 é inferior na AREB-2 em relação aos outros subtipos, sendo este último o único valor com significado estatístico ($p < 0,05$). Embora a caspase 3 seja a única molécula cuja expressão é significativa, traduzindo resistência à apoptose nos estádios avançados, observou-se uma maior expressão de moléculas pró-apoptóticas nos subtipos sem excesso de blastos e citopenias refractárias. Estes resultados corroboram o envolvimento da apoptose na SMD, em particular em doentes de baixo risco. Por outro lado, Ohshima K e colaboradores (Ohshima *et al.*, 2003) também descreveram um aumento da expressão de caspase 3 associado a mau prognóstico.

Em oposição, a expressão do recetor R3 do TRAIL é maior no subtipo CRDM e a expressão de survivina mais elevada no subtipo AREB-2, embora sem significado estatístico. Ambas são moléculas anti-apoptóticas e o aumento nestes subtipos está de acordo com os dados publicados e já citados (Bogdanović *et al.*, 1997; Parker & Mufti, 2000; Tsoplou *et al.*, 1999). Os dados disponíveis sobre o inibidor da apoptose, survivina, são contudo inconclusivos (Invernizzi *et al.*, 2004; Yamamoto *et al.*, 2004), pelo que mais estudos abrangendo um maior número de doentes poderão contribuir para avaliar a relevância da survivina como marcador de diagnóstico e prognóstico em doentes com SMD.

Estes dados suportam o conceito de que a apoptose é um mecanismo central na patogénese de SMD. Não comprovámos, no entanto um aumento significativo dos reguladores negativos da hematopoiese, FAS e TRAIL, nos estádios mais iniciais, tal como referido por outros autores (Bouscary *et al.*, 1997; Zang, Goodwin, Loken, Bryant, & Deeg, 2001).

Relativamente à razão BAX/BCL2, apesar de aumentada nas CRDU (NR e AR), também apresenta valores elevados nos subtipos com excesso de blastos, nomeadamente na AREB-2. No entanto, a sensibilidade de uma célula para a apoptose é determinada pela proporção de moléculas anti e pró-apoptóticas.

5.1.2.3. Influência do perfil de metilação de genes no diagnóstico e prognóstico de doentes com SMD

As SMD são doenças hematológicas clonais com grande variabilidade clínica que podem evoluir para LMA. Os doentes que evoluem para LMA apresentam mau prognóstico e a morte surge precocemente devido à resistência à quimioterapia e a várias complicações fatais (Uchida *et al.*, 1997).

Os defeitos de maturação hematopoiética são a “marca” desta doença, e afetam maioritariamente a eritropoiese (Hopfer *et al.*, 2009). Têm sido

descritos múltiplos mecanismos na tentativa de explicar a etiopatogenia da SMD. No entanto, até à data não existe nenhum modelo conclusivo para explicar a patogénese da SMD. Assim, o estudo molecular da SMD pode permitir identificar o ou os mecanismos envolvidos na evolução neoplásica da doença (Jiang *et al.*, 2009).

Os padrões de metilação aberrante são um evento comum nas neoplasias e constituem um importante fator regulador da expressão génica. As alterações da metilação do ADN ocorrem em múltiplos genes e constituem uma das mais frequentes alterações moleculares em vários tipos de tumores, em particular nas neoplasias hematológicas (Mulero-Navarro & Esteller, 2008).

Têm sido descritas numerosas alterações epigenéticas na SMD, principalmente a metilação aberrante das ilhas CpG nas regiões promotoras de vários genes reguladores chave. Em particular, a metilação de genes supressores tumorais leva ao seu silenciamento, o que equivale à perda de função por mutações ou deleções. Sendo uma modificação reversível representa um alvo terapêutico muito atrativo (Brakensiek, Länger, Kreipe, & Lehmann, 2005; Brakensiek, Länger, Schlegelberger, Kreipe, & Lehmann, 2005). Estudos clínicos promissores utilizando agentes hipometilantes e inibidores das desacetilases das histonas, em doentes com SMD, mostraram que os doentes submetidos a este tipo de terapêutica apresentavam independência transfusional, aumento da sobrevivência e atraso na transformação leucémica (Silverman *et al.*, 2002; Wijermans *et al.*, 2000).

Assim, a metilação de regiões promotoras e o silenciamento de genes supressores tumorais, em particular de reguladores do ciclo celular, são considerados um passo importante no desenvolvimento tumoral e foram demonstrados em várias neoplasias hematológicas, incluindo a SMD (Manel Esteller, 2003; Lehmann, Brakensiek, & Kreipe, 2004; Singal & Ginder, 1999; Toyota & Issa, 2005).

A progressão do ciclo celular é regulada pelas ciclinas e cinases dependentes de ciclinas. Por outro lado, a atividade destes complexos é regulada por proteínas, codificadas por genes supressores tumorais, nomeadamente pelas proteínas inibidoras das cinases dependentes de ciclinas (CDKI), p15 e p16. O aumento de expressão destas proteínas é reconhecido como um mecanismo de bloqueio do ciclo celular. Consequentemente, a inativação dos genes que codificam estas proteínas por mecanismos epigenéticos, como a hipermetilação da sua região promotora, pode ser um alvo terapêutico importante no cancro (Brakensiek, Länger, Kreipe, *et al.*, 2005).

A presença de metilação em genes específicos tem sido demonstrada em leucemias agudas, mielóides, linfóides e bifenotípicas. Os genes supressores tumorais *p15^{INK4B}* e *p16^{INK4A}*, são dos que se encontram frequentemente

hipermetilados nas neoplasias hematopoiéticas (Teofili *et al.*, 2001; Uchida *et al.*, 1997). Aproximadamente 70 a 80% das LMA caracterizam-se por vários graus de metilação do gene *p15*, e níveis inferiores do *p16*, embora de significado indeterminado. A metilação do *p15* e *p16* está associada à perda de transcrição, e no caso do *p15* na leucemia aguda, a inativação ocorre quando mais de 40% das ilhas CpG estão metiladas. Um potencial mecanismo para a inativação epigenética consiste nos níveis elevados de DNMT1 e 3B nos doentes com LMA e metilação do gene *p15*. O gene inibidor do ciclo celular *p16* tem sido o mais extensamente estudado e documentado como estando hipermetilado numa variedade de tumores primários humanos e em linhas celulares (Chen *et al.*, 2014; Haroun *et al.*, 2014; X. Wang, Zhu, Cui, & Yu, 2014).

Neste contexto, avaliámos o perfil de metilação de nove genes, os genes *p15*, *p16*, *p53*, *MGMT*, *DAPK* e os recetores do *TRAIL* (*TRAIL-R1*, *-R4*, *-R3* e *-R4*), em doentes com SMD *de novo* e correlacionámos este perfil com parâmetros hematológicos e bioquímicos, assim como, com os marcadores de apoptose estudados. Todos os parâmetros foram depois correlacionados com os subtipos da OMS, a evolução para LMA, sobrevivência e grupos de risco prognóstico.

O estudo do perfil de metilação dos genes *15*, *p16* e *p53* foi efetuado em todos os doentes (102), enquanto os restantes genes (*MGMT*, *DAPK*, *p53*, recetores do *TRAIL*) foram estudados em 78 doentes.

Os genes *p53* e *MGMT* não se apresentavam metilados em nenhum doente. Do total da amostra, apenas 15 doentes (14,7%) não apresentam metilação de nenhum dos genes avaliados. Um terço dos doentes (30 doentes; 29,4%) apresenta metilação de pelo menos 1 gene; enquanto 57 doentes (55,88%) têm 2 ou mais genes metilados. Esta constatação permite inferir que a metilação é um dos eventos relevantes na fisiopatologia da SMD.

A metilação aberrante dos genes *p15*, *p16*, *DAPK*, *DR4*, *DR5*, *DcR1* e *DcR2* foi detetada em 55,88%; 24,51%; 53,85%; 25,64%; 24,36%; 11,54% e 17,95% dos doentes estudados, respetivamente. A metilação do gene *p15* tem sido descrita em uma variedade de neoplasias hematológicas, incluindo a SMD (Baur *et al.*, 1999; Kraguljac Kurtović *et al.*, 2012). Nesta amostra, verificámos a presença de metilação do gene *p15* em cerca de metade dos doentes, o que é superior a outros estudos (Hofmann *et al.*, 2006; Quesnel *et al.*, 1998; Uchida *et al.*, 1997), particularmente nesta população com apenas 12,6% de doentes de alto risco (IPSS). Estes dados estão de acordo com outros estudos, que demonstraram a importância do gene *p15* não só na progressão e evolução para LMA, mas também na patogénese da própria doença (Aggerholm, Holm, Guldborg, Olesen, & Hokland, 2006; Quesnel *et al.*, 1998; Tien *et al.*, 2001).

Embora sem significado estatístico (devido provavelmente ao reduzido número de doentes nos vários subgrupos citogenéticos), observou-se uma

tendência para a associação entre a metilação do gene *p15* e as alterações citogenéticas, em particular com a trissomia 8, del7q e del5q, o que está de acordo com outros estudos (Au *et al.*, 2003).

A coexistência de metilação nos genes *p15* e *p16* em somente 14 doentes (13,72%), sugere um mecanismo independente, principalmente do gene *p15*. No entanto, nenhum destes doentes apresenta um índice de prognóstico, IPSS ou IPSS-R, de alto risco.

A hipermetilação do gene *p16*, na ausência de metilação do gene *p15*, é encontrada principalmente em neoplasias linfóides (LLA, linfoma e mieloma múltiplo), estando mais frequentemente associada ao linfoma não-Hodgkin agressivo (Boulwood & Wainscoat, 2007).

Os genes mais frequentemente metilados nesta amostra foram o *p15* (55,88%), já referido, e o *DAPK* (53,85%), e em cerca de um terço dos casos, a sua metilação ocorre concomitantemente (32,05%). Assim, colocamos a hipótese de estes dois acontecimentos contribuírem para a patogénese de SMD, podendo influenciar o comportamento biológico e clínico do tumor.

O gene *DAPK* é o segundo gene metilado mais frequente nesta população, o que poderá indicar um potencial marcador diagnóstico de SMD e também um marcador de prognóstico, assim como o *p15*. No entanto, esse dado necessita ser confirmado em um grupo maior de doentes.

A *DAPK* é uma serina-treonina cinase pró-apoptótica envolvida em várias vias de apoptose e a sua inativação por hipermetilação do promotor é um evento comum em neoplasias de células B, estando associada a um prognóstico desfavorável (Amara *et al.*, 2008; Katzenellenbogen, Baylin, & Herman, 1999), mas o seu significado prognóstico em SMD não foi ainda investigado.

Nenhum doente apresenta metilação dos genes *p53* e *MGMT*. Na literatura há pouca informação disponível sobre a metilação destes genes em SMD. Como não doseámos os níveis de proteína, não podemos assumir que estes genes não são importantes para a patogénese desta doença.

As mutações do gene *p53* são frequentes em neoplasias humanas; sabe-se que a *p53* mutante não só afeta o processo de tumorigénese, mas também a resposta à terapêutica (Selivanova & Wiman, 2007; Vousden, 2005).

Relativamente à *MGMT*, tem sido estudado o papel da hipermetilação deste gene em gliomas, em particular no prognóstico destes doentes (Caldera *et al.*, n.d.). Contudo, há poucos relatos na literatura que exploram o potencial papel da hipermetilação do gene *MGMT* na leucemogénese.

Os estudos sugerem que a perda da proteína *MGMT* nas células em fase inicial da doença pode gerar um novo fenótipo mutante caracterizado por transições G→A, influenciando a geração e acumulação de mutações pontuais

em vários genes envolvidos na etiologia do cancro, tais como o gene supressor tumoral *p53* e o oncogene *K-RAS* (M Esteller *et al.*, 1999; Manel Esteller & Herman, 2004).

Além da metilação dos genes já referidos avaliámos também a metilação dos genes que codificam os recetores do TRAIL. A metilação aberrante do gene promotor e o conseqüente silenciamento dos recetores do TRAIL foram descritos em uma variedade de neoplasias (Lee *et al.*, 2014; Venza *et al.*, 2013), mas até à data pouco se sabe sobre a relevância dessa modificação epigenética na SMD. Os nossos resultados mostram que há uma relação direta entre a expressão do recetor R4 e o valor de hemoglobina, nos doentes que evoluíram para LMA, podendo justificar o agravamento da anemia neste subgrupo.

A desregulação das vias celulares, tais como a apoptose e o ciclo celular, pode conferir uma vantagem de sobrevivência para a célula afetada e, assim, contribuir para a progressão de uma célula normal em uma célula neoplásica.

A alteração dos padrões de metilação do ADN no cancro não é apenas importante para a nossa compreensão sobre a patogénese molecular da SMD, mas também poderá servir como marcador de diagnóstico e prognóstico, e também previsão de resposta à terapêutica.

Os resultados mostram que a metilação aberrante parece ser um evento comum em doentes com SMD e pode estar relacionada com os subtipos da OMS, o risco citogenético e grupos de risco, o que sugere um importante papel da metilação do ADN na patogénese e prognóstico da SMD.

Assim, a metilação aberrante dos resíduos de citosina nos dinucleótidos CpG do ADN é um fenómeno epigenético precoce na carcinogénese. A extensão da metilação do ADN genómico diminui progressivamente ao longo dos estádios da neoplasia, desde a proliferação benigna ao tumor invasivo. A hipometilação do ADN produz elevadas taxas de mutação devido a deleções relacionadas com a recombinação mitótica ou a perda integral de cromossomas. Adicionalmente, a hipometilação do ADN da célula maligna pode levar à reativação do ADN intragenómico, elementos nucleares ou repetições Alu. Para além da hipometilação global do genoma das células tumorais, existem determinadas áreas no genoma que desenvolvem um aumento da metilação do ADN, enquanto outras se tornam hipometiladas (Jones, 1999).

A interação do epigenoma com o ambiente, incluindo a nutrição, pode alterar o perfil de metilação e, desta forma, o padrão de expressão dos genes (C. Bull & Fenech, 2008; Ulrey, Liu, Andrews, & Tollefsbol, 2005).

Ao longo dos últimos 15 anos tem-se evidenciado o papel do folato no risco de desenvolvimento de vários tumores, incluindo o colórectal, pulmão, pâncreas, esófago, colo uterino e mama, assim como neuroblastoma e

leucemia. Estas observações sugerem uma associação inversa entre o *status* do folato, avaliado por ingestão na dieta ou pelo doseamento dos seus níveis séricos e/ou nos tecidos, e o risco para estas neoplasias. O mecanismo pelo qual a deficiência de folato promove, e a sua suplementação suprime a carcinogénese ainda não está completamente elucidado. No entanto, têm sido propostos e investigados mecanismos relacionados com a desregulação de conhecidas funções bioquímicas do folato.

As alterações na biologia celular que ocorrem com o envelhecimento podem reduzir o folato disponível em determinados tecidos, resultando na desregulação da síntese de nucleótidos e na metilação biológica do ADN (Jang, Mason, & Choi, 2005).

Além disso, vários estudos têm mostrado que os polimorfismos em genes que codificam enzimas envolvendo o ciclo do folato e os envolvidos na metilação do ADN estão associados à neoplasia do cólon (Mokarram *et al.*, 2008). De igual modo, o *pool* de folato pode estar associado à hipermetilação do ADN em tumores colorectais. Outros estudos, associam as alterações do folato e da vitamina B12 a neoplasias do pâncreas (Schernhammer *et al.*, 2007) e da próstata (Johansson *et al.*, 2008).

É evidente que o metabolismo e reparação do ADN são dependentes de uma variedade de fatores dietéticos que atuam como cofactores ou substratos nas vias metabólicas fundamentais (C. Bull & Fenech, 2008). A compreensão das necessidades nutricionais para a manutenção de uma *stem cell* com genoma saudável é essencial neste contexto, mas até à data ainda não foi adequadamente explorada. No nosso trabalho, não identificámos relação entre o perfil de metilação e os doseamentos séricos de ácido fólico.

5.1.2.4. Influência dos polimorfismos da MTHFR no perfil de metilação e prognóstico em doentes com SMD

As SMD são caracterizadas por padrões de metilação alterados, com frequente metilação das ilhas CpG de regiões promotoras de genes supressores tumorais, e hiper e hipometilação em ilhas CpG não incluídos nessas regiões (Figuerola *et al.*, 2009; Issa, 2013).

Nos últimos anos, os agentes hipometilantes mostraram resultados encorajadores traduzidos por respostas completas e parciais, atraso na progressão para leucemia aguda e aumento da sobrevivência global na SMD de alto risco (Fenaux *et al.*, 2010; Lübbert *et al.*, 2012). Curiosamente, não há uma correlação clara entre a hipermetilação das ilhas CpG a nível do promotor e a resposta clínica, nem entre a metilação basal e a resposta aos agentes

hipometilantes, sugerindo um mecanismo de ação mais amplo destes fármacos, uma influência dos polimorfismos e dos padrões de metilação (Khan, Vale, Bhagat, & Verma, 2013).

A hipermetilação aberrante é também uma característica frequente de neoplasias mielóides relacionadas com a terapêutica (NM-t), incluindo SMD-t e LMA-t, uma complicação tardia do tratamento de neoplasias, caracterizadas por mau prognóstico quando tratadas com quimioterapia *standard*, mas melhores taxas de resposta aos agentes hipometilantes (Fianchi *et al.*, 2013).

A MTHFR é uma enzima envolvida no metabolismo do folato intracelular, que catalisa a conversão irreversível de 5,10-metileno a 5 metiltetraidrofolato, a forma predominante de folato sérico. Este produto atua como um cossubstrato da metionina sintetase na remetilação de homocisteína a metionina, conduzindo à produção de S-adenosilmetionina, um dador endógeno de grupos metilo. Estas enzimas participam na reciclagem de grupos metilo, os quais estão envolvidos na síntese de purinas e pirimidinas e na metilação, contribuindo para a regulação da expressão de genes, a integridade e estabilidade do ADN, a modificação cromossômica e o desenvolvimento de mutações (Frosst *et al.*, 1995).

Foram descritos alguns polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) que envolvem o gene MTHFR. A variante do polimorfismo C677T resulta na substituição de alanina por valina no local de ligação do cofactor dinucleótido adenina flavina, produzindo uma enzima mais lábil com atividade reduzida. A variante A1298C resulta na substituição de alanina por glutamato no domínio de regulação S-adenosil-metionina, sendo que a ligação de S-adenosil-metionina inibe a atividade da enzima.

Vários polimorfismos em genes que codificam enzimas do metabolismo do folato têm sido associados a suscetibilidade a neoplasias hematológicas. Assim, um estudo efetuado por Kim H N e colaboradores (H. N. Kim *et al.*, 2009) mostrou que o genótipo 677TT do polimorfismo C677T da enzima MTHFR se associa ao aumento do risco para LLA e que existe uma associação da SMD com o *status* de metilação do ADN e o risco de evolução para LMA. Por outro lado, um estudo efetuado por Christine F Skibola (Skibola *et al.*, 1999) demonstrou que os indivíduos com os genótipos 677TT, 1298AC e 1298CC, da MTHFR, apresentam um risco inferior para desenvolver LLA. Estes resultados sugerem que o folato, em valores inadequados, pode ter um papel no desenvolvimento deste tipo de leucemia.

Um dos objetivos do nosso estudo foi investigar o papel dos polimorfismos da MTHFR, A1298C e C677T, na SMD, tanto como fatores etiológicos, relacionando-os com a metilação e com os níveis séricos de folato e vitamina B12, como também identificar novos fatores de prognóstico.

Estes polimorfismos foram analisados de acordo com a idade, o sexo, o número de blastos e sideroblastos em anel, os parâmetros hematológicos e bioquímicos, as alterações citogenéticas e os índices de prognóstico, utilizando uma análise de regressão logística.

O nosso estudo não demonstrou existir uma associação significativa entre os polimorfismos e os parâmetros hematológicos e bioquímicos, o perfil de metilação dos genes e o risco de evolução para LMA. No entanto, foi encontrada uma associação estatística entre o genótipo A/C do polimorfismo A1298C da MTHFR e a SMD.

A análise ao polimorfismo A1298C da MTHFR mostrou que a maioria dos doentes SMD de todos os subtipos da OMS, com exceção do subtipo AR, apresenta o genótipo AC. E permitiu constatar que a maioria dos doentes (54,9%), sobretudo do subtipo CRDM, é portadora do genótipo AC do polimorfismo A1298C, mostrando existir associação estatística ($p=0,0127$) entre este genótipo e a SMD, nesta população. No entanto, não encontramos nenhuma relação estatisticamente significativa entre a presença deste polimorfismo e o padrão de metilação ou os níveis de folato e de vitamina B12. Contudo, é de salientar que a maior parte dos doentes (45 dos 56 doentes) com a variante polimórfica 1298AC apresentam metilação de pelo menos um gene.

De facto, o papel entre a MTHFR, o metabolismo do folato e a carcinogénese não está bem esclarecido. Alguns estudos relatam um papel protetor dos polimorfismos da MTHFR associados a défices de folato no desenvolvimento do cancro colorretal, mas sugerindo um aumento da frequência de outras neoplasias (mama, endométrio, esôfago e estômago) (Y.-I. Kim, 2005). Skibola *et al.* (Skibola *et al.*, 1999) mostraram uma diminuição significativa do risco de desenvolvimento de LLA em portadores em homocigotia da variante da MTHFR C677T e com o genótipo AC do polimorfismo da MTHFR 1298.

Durante o *follow-up*, verificámos que aproximadamente 10,8% dos doentes com SMD estudados evoluiu para LMA, maioritariamente do subtipo AREB (87,5%). Por outro lado, em metade (54,5%) dos doentes com LMA secundária identificou-se metilação de genes. De salientar que na maioria destes doentes existe um predomínio dos genótipos da MTHFR em heterocigotia: CT para o 677 e AC para o 1298.

Relativamente às neoplasias mielóides (NM-t) relacionadas com a terapêutica, Guillem *et al.* estratificaram os doentes de acordo com o tumor primário, e descobriram que os portadores do genótipo MTHFR 1298 CC ou CA com uma neoplasia hematológica prévia, apresentavam um risco significativo e ligeiramente superior de desenvolver NM-t do que os doentes com a forma *wild type* (Guillem *et al.*, 2007).

Num grupo de doentes com neoplasia da mama, as portadoras do polimorfismo MTHFR 1298 *wild-type* e as portadoras do polimorfismo MTHFR 677T em homocigotia e heterocigotia apresentavam um risco aumentado de desenvolver uma NM-t (Guillem *et al.*, 2007). O genótipo MTHFR 677TT leva a redução da atividade enzimática em indivíduos normais, e consequentemente a um maior nível de 5,10-metilenotetrahidrofolato disponível para a síntese de purinas e pirimidinas, resultando numa reparação do ADN mais eficiente e numa maior estabilidade do ADN. Além disso, a remetilação da homocisteína em metionina é menos eficiente e a reciclagem intracelular de doadores de grupos metilo está diminuída, reduzindo a quantidade de grupos metilo disponível para a metilação das ilhas CpG. Os níveis de metilação do ADN, em portadores do genótipo MTHFR 677TT, encontram-se diminuídos para metade em indivíduos com o *wild-type* (Friso *et al.*, 2002).

Vários grupos têm demonstrado a frequente hipermetilação específica de um gene como uma característica da NM-t (Christiansen, Andersen, & Pedersen-Bjergaard, 2003; Scardocci *et al.*, 2006). A SMD e a LMA-t foram tratadas com sucesso com os agentes hipometilantes, mas até agora nenhum dos marcadores de resposta foi validado em estudos prospetivos. Em particular, não está bem definido o papel da metilação global ou específica de um gene.

No nosso estudo, os polimorfismos 677 e 1298 da MTHFR não apresentaram valor prognóstico relevante.

Na patogénese da SMD foi proposto um modelo complexo, em que a predisposição genética da doença, mediada pela baixa penetrância de polimorfismos em genes de reparação do ADN, poderia cooperar com carcinogénios ambientais (Perera, 1997; Preudhomme *et al.*, 1997). Assim, as variantes das enzimas glutationa S-transferases (GSTs) estão entre os fatores de risco hereditários para SMD mais extensamente estudados. Os genes *GSTT1* e *GSTM1* são candidatos a genes de suscetibilidade ao cancro devido à sua interferência no metabolismo de químicos como os agentes metilantes, pesticidas e solventes industriais. A variedade de funções da enzima GST indica que o seu papel na carcinogénese humana é complexo. Muitos genotóxicos, incluindo o benzeno e fármacos citotóxicos, atuam diretamente *in vivo* nas células hematopoiéticas (Ross, 1996). A proteção da medula para estas agressões depende da viabilidade das vias de destoxificação e de reparação do ADN, de modo a prevenir a mutagénese e a apoptose celular (L. Wang, Groves, Hepburn, & Bowen, 2000). A exposição a tóxicos ambientais, como o benzeno e os materiais pesados, foi implicada na etiologia da SMD. Assim, foi proposto que uma diminuição na produção de *GSTM1* e *GSTT1*, características dos genótipos nulos, poderia estar associada a um aumento de risco de SMD na presença de mutações ambientais e/ou exposição a carcinogénios.

Estes polimorfismos foram investigados como potenciais fatores de risco no desenvolvimento de neoplasias sólidas, tendo sido demonstradas algumas associações para os tumores do pulmão, próstata, colorectal, bexiga, cabeça e pescoço, assim como para o carcinoma hepatocelular (L. M. Bull, White, Bray, Nurgalieva, & El-Serag, 2009; Hashibe *et al.*, 2003; S Raimondi *et al.*, 2006; Sara Raimondi, Botteri, Iodice, Lowenfels, & Maisonneuve, 2009).

A associação entre exposição ambiental a toxinas e o desenvolvimento de SMD sugere fortemente a existência de interações entre genes e ambiente. A SMD e a leucemia aguda constituem um contínuo patogenético e clínico, com efeitos pró-apoptóticos e citopenias por um lado, e aumento da proliferação, bloqueio da diferenciação e elevada contagem de blastos, por outro. Devido à associação significativa entre estas duas patologias e o genótipo nulo da GSTT1, este poderá constituir um potencial fator de risco inicial para SMD e leucemia aguda (Dahabreh, Giannouli, Gota, & Voulgarelis, 2010).

5.1.3. Análise dos doentes que evoluíram para LMA

Quando analisámos a evolução dos 102 doentes com SMD incluídos no estudo, num período de *follow-up* de 54 meses, verificámos que 11 doentes (10,78%) evoluíram para LMA. Como seria expectável a maioria dos doentes pertencia aos subtipos AREB (8 doentes), que traduzem estádios mais avançados da doença. Não identificámos, no entanto, um perfil de metilação diferente dos outros doentes que não progrediram. Mas, como seria de esperar, a elevada percentagem de blastos e os índices de prognóstico de risco intermédio e alto influenciam de forma significativa a evolução para leucemia aguda. O mesmo se verificou para níveis séricos elevados de eritropoietina (*cut-off* 57,45 mUI/ML) com diferença estatística entre este grupo e o grupo dos que não progrediram ($p=0,032$).

A trombocitopenia na SMD pode traduzir um aumento da apoptose ou um aumento da proliferação com bloqueio da diferenciação, com consequente falência medular, pelo que pode estar associada a estádios mais avançados, com maior probabilidade de evolução para LMA. Por outro lado, sabemos pela literatura (Fili *et al.*, 2013; Nakazaki, Nannya, & Kurokawa, 2014; Santini, 2012; Spinelli *et al.*, 2012) que, as SMD com valores mais elevados de eritropoietina apresentam uma pior resposta à administração de eritropoietina, mesmo com doses mais elevadas. Assim, este facto está associado a maior necessidade transfusional, podendo traduzir um maior grau de falência medular, e consequentemente o impacto na sobrevivência evidenciado no nosso estudo ($p=0,0336$).

Além dos parâmetros referidos, observámos que os doentes que possuem maior percentagem de células estaminais mielóides com expressão de IL-6 (CD34+/CD117+/IL-6+) são os evoluíram para LMA, podendo traduzir um papel desta citocina na leucemogénese (Sanchez-Correa *et al.*, 2013). Estes resultados sugerem ainda que a identificação destas células poderá constituir um novo parâmetro de risco de evolução para LMA em doentes com SMD. Além disso, observou-se uma correlação positiva entre os níveis de hemoglobina e a % de células que expressa TRAIL-R4, e entre a % de células com expressão de FAS e a % de sideroblastos em anel, nos doentes que evoluíram para LMA ($p=0,652$ e $p=0,738$, respetivamente). Pelo contrário, existe uma correlação inversa entre % de blastos e sideroblastos em anel, e entre vitamina B12 sérica e % de células com expressão de p53 ($p=-0,650$ e $p=-0,691$, respetivamente), no mesmo grupo de doentes.

5.1.3.1. Identificação de um novo índice de progressão para Leucemia Aguda (IPLA)

Este trabalho permitiu a elaboração de uma proposta de um novo índice de progressão para Leucemia Aguda. Este índice foi construído recorrendo a variáveis hematológicas e bioquímicas, à célula estaminal, ao perfil de metilação e às moléculas de apoptose estudados nos doentes dos vários subtipos de SMD da OMS. A cada um destes parâmetros que se encontrava alterado foi atribuído a pontuação de um ponto. Com este tipo de análise, verificámos que os doentes pertencentes aos subtipos que apresentavam as pontuações mais elevadas foram os que evoluíram para LMA. Desta forma constitui-se um novo índice de prognóstico, que denominamos de Índice de Progressão para Leucemia Aguda (IPLA), o qual pode contribuir para avaliar o risco de progressão para LMA. Por exemplo, o subtipo AREB-2 foi o que somou mais pontuação (19 pontos) e, de facto, 7 dos 8 doentes evoluíram para LMA (Tabela A5).

Em suma, este índice traduz não mais do que a premissa de que a SMD são várias doenças e não uma só, e que a etiologia é multifatorial, pelo que a existência de muitos parâmetros alterados pode não só contribuir para a etiopatogenia da SMD como determinar a sua transformação leucémica.

5.1.4. Análise de sobrevivência

A análise da sobrevivência nos doentes com SMD foi avaliada recorrendo à metodologia de Kaplan-Meier. Esta análise de sobrevivência mostrou que aos

36 meses, 32% dos doentes permanecia em seguimento. Como esperado, e descrito na literatura, os doentes que evoluíram para LMA apresentaram uma sobrevivência inferior aos outros doentes ($p < 0,01$).

Dos parâmetros avaliados no nosso estudo, a LDH e a eritropoietina foram as variáveis que mais influenciaram de forma significativa a sobrevivência global ($p=0,0048$ e $p=0,0336$, respetivamente), sendo que a eritropoietina se tinha destacado como um dos parâmetros mais relevantes na progressão para LMA, já anteriormente discutidos.

Além destes, a anemia foi a única citopenia que mostrou impacto na sobrevivência destes doentes ($p=0,0249$), podendo traduzir um estágio mais avançado com conseqüente falência medular. Por outro lado, a dependência transfusional que estes doentes apresentam pode levar à sobrecarga de ferro, a qual pode contribuir para a diminuição da sobrevivência (Delforge *et al.*, 2014; Merkel & Nagler, 2014; Shenoy, Vallumsetla, Rachmilewitz, Verma, & Ginzburg, 2014; Steensma & Gattermann, 2013; Temraz, Santini, Musallam, & Taher, 2014).

Relativamente à sobrevivência, nenhuma das alterações moleculares avaliadas no nosso estudo parece influenciar a sobrevivência. No entanto, os resultados, apesar de sugestivos da influência do perfil de metilação de genes (0 vs 1 vs ≥ 2) na sobrevivência, não são estatisticamente significativos ($p=0,0889$). Estes resultados podem estar relacionados com o que já havíamos constatado na análise efetuada nestes doentes, ou seja, de que a metilação não é um evento frequente nos estádios mais avançados ou com pontuação mais elevada nos índices de prognóstico, salientando a relevância das alterações epigenéticas como eventos iniciais na etiopatogenia da SMD.

5.2. Estudos efetuados na linha celular de SMD

O atual conhecimento da fisiopatologia da SMD sugere a existência de mecanismos complexos que contribuem para a origem e evolução do clone maligno. A idade avançada dos doentes, tal como a escassez de dador compatível, levam a que as atuais opções de tratamento sejam limitadas e pouco eficazes, com conseqüentes taxas de mortalidade e morbidade elevadas. Surge deste modo o desafio de desenvolver estratégias terapêuticas mais eficazes para esta doença, como o uso de novos fármacos, proporcionando uma ação mais dirigida e um perfil de toxicidade mais tolerável, reduzindo os efeitos secundários associados à terapêutica.

Os resultados obtidos no presente trabalho permitiram a análise de alguns dos mecanismos moleculares envolvidos na fisiopatologia da SMD, assim

como, da potencial eficácia terapêutica e mecanismos moleculares envolvidos na citotoxicidade de novos fármacos anticancerígenos dirigidos a esses alvos específicos.

A linha celular utilizada, as células F-36P, apresenta características morfológicas de SMD, evidenciadas pela coloração por May-Grünwald-Giemsa, nomeadamente, displasia, blastos multinucleados com nucléolos bem visíveis, e células em mitose. As características observadas nesta linha celular estão de acordo com o diagnóstico de SMD do subtipo AREB-t segundo a classificação da OMS 2001, atualmente LMA de acordo com a classificação da OMS 2008. Assim, a visualização de esfregaços por microscopia óptica permitiu avaliar as alterações morfológicas produzidas pelo tratamento das células com os fármacos anticancerígenos utilizados no nosso estudo, comparativamente com as características das células F-36P na ausência de tratamento.

5.2.1. Avaliação da eficácia terapêutica dos fármacos

Uma das principais vias responsáveis pela patogênese da SMD e leucemias é a via de sinalização do gene *RAS*, que envolve além das proteínas *RAS*, os recetores de tirosina cinase como o *FLT3*. A existência de mutações pontuais no gene *RAS* e de duplicações internas em tandem (ITD) no gene *FLT3* (identificadas, respetivamente, em 10 a 15%, e de 3 a 5%, em doentes com SMD), têm sido associadas a pior prognóstico e risco de evolução para LMA. (Niimi *et al.*, 2006; Takahashi *et al.*, 2013).

Para a deteção de mutações nos genes *RAS* e *FLT3*, na linha celular F-36P, foi utilizado ADN extraído e quantificado por meio da utilização de kits, permitindo, através de um processo simples, obter um produto de alta pureza. A deteção das mutações nas 3 isoformas do gene *RAS*, *H-RAS*, *K-RAS* e *N-RAS* por sequenciação automatizada permitiu uma análise sensível, com resolução máxima de 1 pb, e interpretação direta de resultados. Não foram porém detetadas mutações em nenhum dos codões das três isoformas estudadas. Estes resultados sugerem que a ativação da proteína *RAS* nesta linha celular F-36P é independente da existência de mutações pontuais, podendo no entanto, estar relacionada com outros mecanismos pós-tradução ou com a existência de outras proteínas reguladoras, a montante da via de sinalização das MAPK cinases.

De facto, a análise das mutações do gene *FLT3* permitiu identificar mutações internas em tandem (ITD), embora não se tenha verificado a mutação pontual D385V. A existência de uma banda de tamanho superior a 234 pares de bases (pb) significa que ocorreu amplificação de um fragmento de maior tamanho (menor distância de migração), entre 250 a 500 pb, que corresponderá a um

segmento contendo duplicações internas em tandem. Estes resultados sugerem que o recetor de tirosina cinase FLT3 se encontrará constitutivamente ativado nas células F-36P, o que poderá levar à ativação indireta da proteína RAS.

Estão descritos na literatura alguns estudos em que se verifica uma baixa frequência de ativação simultânea dos genes *RAS* e *FLT3* em doentes, o que está de acordo com os nossos resultados (Dicker *et al.*, 2010). Esta correlação negativa sugere que estas mutações possuem um papel redundante, provavelmente devido à alteração de vias de sinalização análogas ou mesmo comuns, consolidando a hipótese da activação da via das cinases MAPK pelo recetor FLT3 (Christiansen, Andersen, Desta, & Pedersen-Bjergaard, 2005; Stirewalt *et al.*, 2001).

Por outro lado, outro dos mecanismos relacionados com a SMD é a alteração da apoptose. Muitas das moléculas envolvidas na desregulação da apoptose e da proliferação celular são degradadas pela via da ubiquitina-proteasoma, pelo que este complexo enzimático pode ser um bom alvo terapêutico na SMD.

Como já referimos, o conhecimento das alterações moleculares no cancro, e em particular na SMD, tem permitido o desenvolvimento de novos fármacos dirigidos a alvos moleculares, nomeadamente inibidores da tirosina cinase, farnesiltransferase e do proteasoma. No entanto, a sua eficácia terapêutica em monoterapia e em associação não está totalmente esclarecida na SMD.

Neste sentido, fomos avaliar o potencial efeito terapêutico de um inibidor tirosina cinase já bem conhecido, o Imatinib; de um inibidor farnesiltransferase, o α -HFPA; e de um inibidor do proteasoma, o MG262 (análogo do Bortezomib).

O estabelecimento de curvas dose-resposta através da análise da viabilidade e densidade celular mostrou-se eficaz na avaliação dos efeitos citotóxico e antiproliferativo induzidos pelos fármacos utilizados no nosso estudo.

5.2.1.1. Avaliação da eficácia terapêutica do inibidor da farnesiltransferase

O α -HFPA (IFT) revelou forte eficácia citotóxica e citostática nas células F-36P, sendo este efeito dependente da dose e do tempo de incubação, apresentando um IC_{50} às 48 horas de 150 μ M. Além disso, a eficácia terapêutica foi mantida durante 72 horas, sugerindo que o fármaco possui uma acção prolongada nestas células. De acordo com o verificado por outros autores, o efeito citotóxico e antiproliferativo mostrou ser independente da existência de mutações nos genes *RAS* (Lancet & Karp, 2003a, 2003b; Reuter, Morgan, & Bergmann, 2000), uma vez que nestas células não foram detectadas mutações neste gene nos codões estudados. Estes resultados sugerem a possibilidade da

existência de outros alvos moleculares terapêuticos para além da farnesilação da proteína RAS, como a proteína RhoB e as proteínas centroméricas CENP-E e CENP-F, as quais poderão ser potencialmente importantes na inibição do estímulo proliferativo e nos mecanismos de citotoxicidade dos IFTs (Bishop, Kirschmeier, & Baum, n.d.).

Para analisar a eficácia da inibição da farnesilação, utilizou-se um marcador fármaco-dinâmico deste processo enzimático, a Lamina A, uma vez que a pré-Lamina A/C necessita de um processo de maturação dependente da farnesilação para a transformação em Lamina A (Bishop *et al.*, n.d.). Assim, a diminuição da Lamina A nas células tratadas com o α -HFPA, tanto em monoterapia como nas restantes associações farmacológicas estudadas, é sugestiva da acção deste fármaco na inibição da farnesiltransferase.

Após avaliarmos o efeito antiproliferativo e citotóxico fomos analisar o tipo de morte celular induzido pelo α -HFPA. Para o efeito, recorreu-se à análise da morfologia celular por microscopia óptica, através da realização de esfregaços corados com May-Grümwald Giemsa, e à citometria de fluxo recorrendo à marcação com Anexina V. A citometria de fluxo, além de identificar e caracterizar cada célula individualmente com base no tamanho e complexidade, permitiu identificar células vivas e mortas, e analisar e quantificar moléculas membranares e citoplasmáticas, com o objectivo de esclarecer alguns dos mecanismos envolvidos na citotoxicidade induzida pelos fármacos anticancerígenos.

Através da análise morfológica verificámos que o α -HFPA induziu morte das células F-36P com características típicas de apoptose, como *blebbing*, contracção celular e fragmentação da cromatina. Estes resultados foram confirmados por citometria de fluxo recorrendo à marcação com Anexina V, tendo-se observado aumento da percentagem de células em apoptose. A Anexina V é uma molécula que se liga à fosfatidilserina, um fosfolípido que ocupa habitualmente o folheto interno das membranas biológicas, e que é exteriorizado para o folheto externo durante o processo apoptótico, permitindo desta forma identificar células em apoptose por citometria de fluxo (Cooper & Hausman, 2007).

O efeito citotóxico observado no tratamento com o α -HFPA poderá estar associado com a diminuição da proteína anti-apoptótica BCL-2 e ligeiro aumento da proteína pró-apoptótica BAD, embora a razão BAD/BCL-2 não tenha sofrido alterações significativas nas condições testadas. Porém, os resultados parecem apontar para um efeito antiproliferativo mais marcado, confirmado não só pela ausência de mitoses nos esfregaços, como pela diminuição de ciclina D1. Estes resultados estão de acordo com estudos efectuados por outros autores, que evidenciam a acumulação de células tratadas com IFTs em G0/G1 ou G2/M, dependendo do tipo celular (Lancet & Karp, 2003a, 2003b).

Como referimos uma das vias activadas na SMD é a via das MAPK que culmina com a activação de genes que codificam proteínas envolvidas na regulação do ciclo celular, como as ciclinas. A ciclina D1 é uma proteína cuja expressão se encontra aumentada durante a fase G1 do ciclo celular, em resposta à activação da sinalização celular mediada por factores de crescimento. Assim, estes resultados sugerem que ocorre inibição da via RAS/MAPK pelo inibidor da farnesiltransferase estudado.

Também outros autores descrevem a indução de alterações na via das MAPK mediante tratamento com IFTs, com diminuição da actividade transcripcional do c-Jun e Elk-1 (Haluska, Dy, & Adjei, 2002; Mazières, Pradines, & Favre, 2003). Por outro lado, reportam que o tratamento com IFTs promove a inibição da actividade do factor de transcrição NF- κ B, e consequente diminuição da expressão de alguns genes, como os que codificam a ciclina D1 e a proteína anti-apoptótica BCL-2 (Takada, Khuri, & Aggarwal, 2004). No nosso estudo também observámos diminuição da proteína BCL-2, além da diminuição da ciclina D1, como mencionado. No entanto, outros mecanismos possíveis poderão contribuir para os efeitos observados, como a diminuição da actividade da proteína AKT, acompanhada pelo aumento da proteína BAD activada, ou outros efectores da via de sinalização PI3K. Vários estudos mostram que esta via de sinalização pode também ser activada pelo FLT3 e mediada pela proteína RAS (Alessandrino *et al.*, 2001; Jabbour, Kantarjian, & Cortes, 2004; Lancet & Karp, 2003a).

Além das características morfológicas já descritas, a presença de diversas células com núcleos mais pequenos, cromatina pouco condensada e citoplasma mais abundante com menor grau de basofilia, indica que estas células tratadas com IFT apresentam características de células com maior grau de maturação, sugerindo que este fármaco poderá ter capacidade indutora de diferenciação celular, além do efeito citotóxico. Como foi referido anteriormente, o processo de diferenciação encontra-se estreitamente associado à perda da capacidade proliferativa e aumento da propensão para a apoptose. Uma vez que foi identificada a mutação FLT3/ITD nas células F-36P, e que este recetor possui um importante papel não só na proliferação como também na diferenciação celular (M Mizuki *et al.*, 2003; Masao Mizuki *et al.*, 2003; Parcels, Ikeda, Simms-Waldrip, Moore, & Sakamoto, 2006), existe a possibilidade da sinalização celular a jusante do recetor se encontrar constitutivamente activada interferindo com a diferenciação celular. Assim sendo, a acção do α -HFPA poderá incidir sobre uma via a jusante do recetor FLT3/ITD, como a via RAS/MAPK, uma vez que foi verificado um decréscimo na ciclina D1. Alguns estudos evidenciam uma associação entre a presença da mutação FLT3/ITD e a inibição de proteínas envolvidas na diferenciação mielóide em células de medula óssea de ratinho (Parcells *et al.*, 2006). De igual modo, os resultados obtidos por Mizuki *et al.*

(2003), utilizando a técnica de *microarrays*, revelaram alteração do perfil de expressão de genes envolvidos na sinalização celular mediada pelo FLT3/ITD *versus* FLT3/WT. Estes autores verificaram ocorrer repressão de vários factores de transcrição envolvidos na regulação da diferenciação mielóide, como o factor de transcrição C/EBP α .

Para além da utilização do IFT em monoterapia, avaliou-se a existência de potenciação do efeito citotóxico e/ou citostático quando este fármaco se administra em associação com outros fármacos. Para o efeito foi avaliado o potencial terapêutico da associação entre o α -HFPa e a Citarabina, Ara-C, um dos fármacos utilizado na terapêutica da SMD de alto risco. Estas combinações farmacológicas podem permitir o uso de doses inferiores dos fármacos, conferindo menor toxicidade terapêutica e, portanto menos efeitos secundários. Deste modo, as células F-36P foram tratadas com os fármacos α -HFPa e Ara-C em associação, ambos em concentrações inferiores ao IC₅₀. Apesar de não se ter verificado potenciação do efeito citotóxico com a administração em simultâneo destes fármacos, detectou-se decréscimo de ciclina D1, sugerindo que o efeito antiproliferativo do IFT se sobrepõe ao efeito citotóxico de Ara-C, o que poderá estar relacionado com o bloqueio das células na fase G1 do ciclo celular. Uma vez que o Ara-C é um antimetabolito específico para a fase S do ciclo celular, a paragem das células em G1 pode ter contribuído para a ineficácia desta associação. De facto, quando os fármacos foram administrados com um intervalo de 4 horas observou-se potenciação farmacológica quer no efeito citotóxico, quer antiproliferativo. A aplicação deste esquema terapêutico no tratamento de doentes com SMD poderá permitir o uso dos mesmos em doses mais baixas, proporcionando uma resposta mais eficaz e com menos toxicidade secundária.

Em estudos pré-clínicos foi demonstrado um efeito sinérgico com o uso de IFT e agentes quimioterapêuticos convencionais como a Cisplatina, Taxanos, o inibidor de tirosina cinase, Imatinib, e ainda com inibidores do proteasoma (Jabbour *et al.*, 2004; Lancet & Karp, 2003b; Mazières *et al.*, 2003; Nencioni, Grünebach, Patrone, Ballestrero, & Brossart, 2007).

5.2.1.2. Avaliação da eficácia terapêutica do inibidor do proteasoma

Muitas das moléculas envolvidas na proliferação, diferenciação e morte celular são degradadas pela via da ubiquitina-proteasoma. Este facto levou ao desenvolvimento de novos fármacos que inibissem a actividade do proteasoma para o tratamento do cancro. Vários estudos experimentais e clínicos, envolvendo inibidores do proteasoma, têm sido amplamente desenvolvidos com especial incidência em neoplasias hematológicas, acrescentando novos mecanismos de

acção e potenciais aplicações terapêuticas desta classe de fármacos. Um destes inibidores, o Bortezomib, já se encontra aprovado pela FDA para o tratamento do Mieloma Múltiplo e Linfoma do Manto. No entanto, a eficácia terapêutica destes fármacos na SMD não está ainda clarificada.

No nosso estudo utilizámos o MG262, um inibidor do proteassoma (IP) derivado do ácido borónico, análogo do Bortezomib. Este fármaco evidenciou eficácia citotóxica e citostática nas células de SMD bastante significativa. A sua acção foi mais notória após 48 horas de incubação, tendo-se verificado redução da viabilidade celular de 50% nas células tratadas com 100 nM (IC_{50}). A inibição do proteassoma induzida pelo MG262 foi confirmada pelo aumento muito significativo dos conjugados de ubiquitina, quer em terapêutica isolada quer em associação com α -HSPA. O aumento destes conjugados indica que as proteínas marcadas para degradação no proteassoma (previamente ubiquitinadas) se acumulam na célula, uma vez que este complexo catalítico se vê impossibilitado de proceder à sua degradação.

Tal como tínhamos observado com o IFT, o MG262 em monoterapia induz morte celular nas células F-36P predominantemente por apoptose, como demonstram os estudos morfológicos e por citometria de fluxo. De facto, foi possível identificar nos esfregaços, a presença de células com *blebbing*, retracção celular, fragmentação nuclear e diversos corpos apoptóticos. Este tipo de morte celular pode ser mediado por caspases, uma vez que se observou aumento significativo da caspase 3. Porém, a modulação de outras moléculas poderá estar envolvida no efeito citotóxico, como o aumento da expressão do recetor FAS, sugerindo um envolvimento da via extrínseca ou membranas da apoptose. No entanto, a diminuição da proteína antiapoptótica BCL-2 e o aumento da razão BAX/BCL-2, indica que a via mitocondrial ou intrínseca também poderá contribuir para a citotoxicidade do IP testado. Estas observações estão de acordo com o aumento da caspase 3 referida anteriormente, uma vez que ambas as vias apoptóticas culminam com a activação desta caspase efectora. Por outro lado, a diminuição da expressão da proteína BCL-2 poderá resultar da estabilização do I κ B citoplasmático pelo IP e consequente inactivação do NF κ B. Deste modo a transcrição de genes como o Bcl-2 fica comprometida, tornando a célula mais susceptível à apoptose (Adams, 2002; Nencioni *et al.*, 2007).

Além do papel do proteassoma na regulação da degradação de pequenos substratos proteicos, este desempenha ainda funções na coordenação de outros eventos celulares mais complexos (Cooper & Hausman, 2007).

No nosso estudo observámos nas células tratadas com MG262 frequentes mitoses anómalas sugerindo desorganização cromossómica e falência na localização equatorial dos cromossomas. O tratamento com o MG262 poderá, assim, induzir um efeito citotóxico relacionado com a falência do ciclo celular.

Na literatura está descrito que o proteassoma possui um papel importante na formação e composição do cinetocoro (local de ligação dos feixes de tubulina do fuso mitótico aos cromossomas), como também na manutenção do fuso mitótico (Gorbsky, Kallio, Daum, & Topper, 1999), envolvendo cinases mitóticas. Os nossos resultados indicam que o MG262 poderá prevenir ou alterar a capacidade de ligação do feixe mitótico aos cromossomas, provocando a ascensão polar desorganizada e ineficaz dos cromossomas. Por outro lado, diversas proteínas intervenientes no ciclo celular, como a WAF1 e p27, são acumuladas no citoplasma quando ocorre a inibição do proteassoma. Estas proteínas inibem as ciclinas, como por exemplo as ciclinas A e B, necessárias para a célula finalizar a fase M do ciclo celular (Delcros, Floc'h, Prigent, & Arlot-Bonnemains, 2003).

Por outro lado, o efeito antiproliferativo induzido pelo MG262 na linha celular F-36P poderá relacionar-se com o decréscimo nos níveis de ciclina D1 verificados. Mais uma vez este resultado pode dever-se à acção reguladora do factor de transcrição NF κ B pelo proteassoma. A inibição deste leva à inactivação do NF- κ B, daqui resultando diminuição da expressão da ciclina D1. A acção inibitória dos IP sobre a via das MAPK, é outro dos mecanismos que pode estar implicado.

A administração combinada dos fármacos MG262 e α -HFPA, em doses inferiores aos respectivos IC₅₀, demonstrou também potenciação do efeito citotóxico e citostático, uma vez que o IC₅₀ após 48 horas de exposição foi atingido com doses inferiores às utilizadas em monoterapia (50 μ M α -HFPA com 25nM MG262). A apoptose foi confirmada pela presença de diversos corpos apoptóticos e de células em diferentes estadios do processo apoptótico. Um dos mecanismos envolvidos no aumento da eficácia terapêutica desta associação farmacológica pode estar relacionado com a diminuição de survivina, uma proteína anti-apoptótica, e portanto maior susceptibilidade das células à apoptose. Além disso, a elevada expressão de BAD e o aumento robusto da razão BAD/BCL-2 e BAX/BCL-2 com diminuição da expressão do recetor FAS, sugerem que o processo apoptótico decorrerá preferencialmente pela via intrínseca da apoptose. Além disso, as alterações na expressão das moléculas da família BCL-2 e a diminuição da survivina podem estar também relacionadas com a inibição da activação do NF- κ B na presença do MG262. O facto da associação destas moléculas em simultâneo produzir um efeito citotóxico sinérgico, sugere que os fármacos poderão actuar de modo complementar, através de um conjunto de mecanismos que propiciam e estimulam a morte celular por apoptose. Para além disso, enquanto que nas células incubadas com MG262 em monoterapia, a expressão de Lamina A/C aumenta relativamente às células não tratadas (controlo), nas células em que a este IP se associou o α -HFPA observou-se um efeito contrário. A diminuição da expressão de Lamina A/C nestas condições

pode indicar uma sobreposição da acção do α -HFGA sobre o IP o que contribui para o efeito antiproliferativo mais acentuado observado.

5.2.1.3. Avaliação da eficácia terapêutica do inibidor da tirosina cinase

Outra das possíveis abordagens terapêuticas na SMD está relacionada com a sinalização celular mediada por recetores com atividade de tirosina cinase, como por exemplo o FLT3. Neste sentido, o uso de inibidores de proteínas tirosinas-cinase constitui uma abordagem terapêutica racional nesta patologia (Mishra, Zhang, Cunnick, Heisterkamp, & Groffen, 2006). Assim, fomos estudar o efeito terapêutico de um inibidor da tirosina cinase, o mesilato de Imatinib, aprovado pela FDA para o tratamento de LMC (Leucemia Mielóide Crónica) e dos GIST, isto é, de tumores do estroma gastro-intestinal (<http://www.cancer.gov>). Esta terapêutica pareceu-nos racional uma vez que as células F-36P possuem a mutação ITD no recetor tirosina-cinase FLT3. No entanto, o Imatinib não evidenciou efeito citotóxico nem antiproliferativo eficaz. Este resultado poderá estar relacionado com o facto do Imatinib ser uma molécula com uma estrutura específica para a proteína de fusão BCR/ABL e C-KIT, presentes na LMC e GIST, respectivamente, não possuindo provavelmente especificidade estrutural dirigida para o recetor FLT3. No entanto, quando ao Imatinib se associou α -HFGA, observámos efeito citotóxico, sobretudo quando os fármacos foram administrados com intervalos de 4 horas. Estes resultados estão de acordo com alguns estudos que evidenciam, nos casos de resistência ao Imatinib, sinergismo farmacológica com outros fármacos (Basso & Doll, 2006; Hoover, Mahon, Melo, & Daley, 2002). O efeito observado poderá ser mediado pelo aumento das proteínas pró-apoptóticas BAX e BAD e diminuição das anti-apoptóticas BCL-2 e survivina. Além disso, verificou-se um aumento mais acentuado da razão BAD/BCL-2 em relação ao aumento da razão BAX/BCL-2. Todos estes mecanismos moleculares poderão contribuir para o efeito citotóxico desta combinação por diminuição da resistência à apoptose, e, desta forma, permitir assim ultrapassar casos de resistência ao Imatinib. Por outro lado, os resultados obtidos evidenciaram o papel da proteína BAD no efeito da combinação farmacológica. Deste modo, os resultados obtidos poderão indicar uma acção do α -HFGA na sinalização celular a jusante dos RTKs, por inibição da via PI3K, com conseqüente diminuição da quantidade da proteína AKT activada. A diminuição desta proteína conduz à diminuição da fosforilação da proteína BAD, a qual fica activa quando desfosforilada, provocando a apoptose.

Também se encontra descrito um efeito de sensibilização induzida pela combinação entre o Imatinib e o IFT Lonafarnib (Basso & Doll, 2006; Hoover *et al.*, 2002), resultando na inibição do crescimento e indução da apoptose

em células que desenvolveram resistência ao Imatinib em monoterapia. Outros autores verificaram ainda, em células de Leucemia Mielóide Crónica, que a combinação destes agentes terapêuticos possui a capacidade de reduzir a resistência de células residuais quiescentes (células que não se encontram em ciclo celular), permitindo ultrapassar a resistência ao tratamento com Imatinib.

5.2.1.4. Avaliação da eficácia terapêutica dos agentes epigenéticos

A metilação do ADN é um dos mecanismos epigenéticos mais estudados, sendo um excelente alvo para terapêuticas anti-neoplásicas. Foram desenvolvidos vários fármacos que interferem na metilação do ADN com o objectivo de aumentar a eficácia, a estabilidade e diminuir a toxicidade. O primeiro fármaco epigenético, a 5-azacitidina, está actualmente aprovado como tratamento de primeira linha para doentes com SMD de alto risco (Fenaux *et al.*, 2010).

A desacetilação/acetilação das histonas é outro dos mecanismos envolvidos no cancro, constituindo outro alvo molecular para o tratamento desta doença. O vorinostat é um inibidor da HDAC aprovado para o tratamento do Linfoma de células T cutâneo.

Neste estudo, avaliou-se o potencial terapêutico de dois moduladores epigenéticos *in vitro*, um agente hipometilante (decitabina) e um inibidor da desacetilase das histonas (tricotatina A), numa linha celular humana obtida a partir de um doente com SMD / LMA (anteriormente AREB-t, agora LMA segundo a classificação da OMS 2008), a linha celular F-36P. Testámos os fármacos em monoterapia e em combinação, usando vários esquemas de administração.

Alguns ensaios demonstram que a metilação do ADN interage com a histona desacetilase, revelando a complexidade da epigenética (Fuks, Burgers, Brehm, Hughes-Davies, & Kouzarides, 2000; Rountree, Bachman, & Baylin, 2000). Assim, é esperado que os HDACi e os DNMTi apresentem sinergismo (Cameron, Bachman, Myöhänen, Herman, & Baylin, 1999; Galm, Herman, & Baylin, 2006), no entanto, os estudos com DEC e TSA A em SMD são escassos.

Os nossos resultados mostram que tanto a DEC como a TSA A, em monoterapia, induzem uma diminuição na viabilidade das células F-36P, dependente do modo de administração e da dose, sendo o efeito mais acentuado após as 48 horas de incubação. No entanto, a TSA A foi mais eficaz em monoterapia que a DEC. Estes resultados estão de acordo com os nossos resultados anteriores em linhas celulares (MOLT-3 e MOLT-4), mostrando que

a incubação com TSA A é mais eficaz na redução da proliferação e viabilidade celular do que a DEC. O facto de existirem resultados semelhantes desta associação em outras linhas celulares enfatiza o potencial uso clínico desta combinação de fármacos epigenéticos.

Além disso, quando as células F-36P foram tratadas com baixas concentrações de TSA A e DEC em administração diária, a redução da proliferação celular foi superior à observada com concentrações mais elevadas em uma única administração. Estas observações aplicadas à prática médica são relevantes, uma vez que a utilização de doses mais baixas permite a redução dos efeitos secundários e a toxicidade.

Por outro lado, quando as células foram incubadas com os dois fármacos em simultâneo e com um intervalo de 3 horas, em concentrações mais baixas do que as utilizadas em monoterapia, observou-se um maior efeito citotóxico. Este resultado foi mais evidente quando as células F-36P foram previamente incubadas com TSA A e posteriormente com DEC, do que com os fármacos administrados em sequência inversa. Estes resultados indicam qual o esquema de administração dos fármacos com melhor eficácia. De facto, a inibição da HDAC permite que a cromatina da maquinaria molecular intracelular fique exposta permitindo atingir segmentos previamente inacessíveis da sequência de ADN e, conseqüentemente, a tradução de genes supressores tumorais previamente silenciados. A TSA A não consegue reverter o silenciamento de genes até que exista algum grau de desmetilação que permita a actuação das acetilases nas regiões promotoras, revertendo o silenciamento (Delcuve, Khan, & Davie, 2012).

Outros estudos têm demonstrado um efeito sinérgico entre os HDACi e DNMTi (Cameron *et al.*, 1999; Galm *et al.*, 2006). Vários ensaios terapêuticos, utilizando a combinação de agentes hipometilantes e inibidores da HDAC, revelaram que esta associação tem propriedades sinérgicas em vários tipos de neoplasias (Chu *et al.*, 2013; Gore, 2005). Estes resultados estão de acordo com outros que demonstraram que ambos os agentes podem exercer os seus efeitos através da inversão da metilação das regiões promotoras (Baylin, 2005). Este facto pode ter conseqüências clínicas, uma vez que a utilização da associação, no esquema apropriado, não só aumenta a eficácia do tratamento, mas também permite o uso de doses mais baixas, induzindo menos efeitos secundários. Além disso, também foi demonstrado que os HDACIs apresentam não só sinergismo com outros fármacos epigenéticos, mas também com outras terapêuticas anti-neoplásicas, como a radiação e os agentes citostáticos como o docetaxel, a doxorubicina, o etoposido, a elipticina e o cisplatino (Tambaro *et al.*, 2010).

A análise da morte celular por citometria de fluxo demonstrou que estes fármacos induzem morte celular preferencialmente por apoptose tardia e / ou necrose, dependente do fármaco, da concentração, do tempo e esquema de administração.

Os nossos resultados estão de acordo com aqueles apresentados por Yang L e colaboradores (Yang *et al.*, 2008) em células SKM-1, uma linha de células LMA secundária a SMD. Estes autores mostraram que a DEC também pode induzir apoptose e/ou diferenciação celular por meio de mecanismos relacionados com a expressão do FAS e da survivina. No mesmo estudo, estes autores mostraram ainda que a DEC tem efeitos sinérgicos com a TSA A.

Além destes mecanismos, e uma vez que a DEC é um agente hipometilante, deverá permitir a re-expressão de genes supressores tumorais, como o regulador do ciclo celular, *p15*, o que explicaria os resultados observados, tal como referido por outros (Yang *et al.*, 2008).

Embora a TSA A seja mais eficaz na redução da viabilidade celular do que a DEC, este mostrou uma maior eficácia na redução do estado de metilação do *p15* (como seria de esperar), efeito este somente superado pela associação da DEC com a TSA A. Na verdade, o efeito sinérgico hipometilante observado nas células tratadas com os dois fármacos é interessante e não se encontra ainda descrito.

A combinação dos moduladores epigenéticos utilizados neste trabalho mostra uma eficácia sinérgica do efeito citotóxico e hipometilante, quando a TSA A é administrada na dose de 10 nM seguida de 5 μ M de DEC com um intervalo de 3 horas, levando à eliminação de todos os alelos *p15* metilados.

5.3. Limitações do estudo e perspetivas futuras

5.3.1. Limitações do estudo

A amostra utilizada neste estudo incluiu 102 doentes com o diagnóstico de SMD de novo. Como se trata de uma neoplasia muito heterogénea, que se traduz pela divisão em vários subtipos de doença (OMS, 2008), a análise da amostra no global não traduz as particularidades inerentes a cada grupo de doentes. De facto, apesar de terem sido incluídos um número relativamente grande de doentes, a subsequente análise por subgrupos conduziu, em alguns parâmetros, à perda do poder estatístico.

Para além do tamanho da amostra, também a ausência de um grupo controlo impossibilitou a análise da relevância de determinados parâmetros

na patogénese da doença, nomeadamente a influência da apoptose e da metilação.

Por outro lado, o intervalo de tempo em que decorreu o estudo e, sobretudo, o *follow-up* dos doentes, não permitiram uma análise mais pormenorizada relativamente à progressão para LMA, uma vez que seis doentes foram incluídos durante o ano de 2014.

Apesar de todos os parâmetros hematológicos e bioquímicos terem sido recolhidos ao diagnóstico, o que é extremamente importante na análise de resultados, o doseamento de ácido fólico, não permitiu uma análise fiável pois parte dos doentes fazia suplementação com ácido fólico.

Outro aspeto que pode ter limitado a análise dos nossos resultados foi o facto de que, por razões técnicas, nem todos os estudos terem sido feitos em todos os doentes da amostra. É o caso do estudo da célula estaminal hematopoiética e o perfil de metilação dos genes *DAPK*, *MGMT* e recetores do *TRAIL*, os quais foram realizados em 77 doentes dos 102 doentes incluídos nesta amostra.

Por fim, o estudo dos polimorfismos da MTHFR, A1298C e C677T, foi realizado nos doentes com SMD, mas também em controlos saudáveis, permitindo uma análise comparativa, não só entre os vários subtipos de doentes, mas também entre doentes e controlos. No entanto, os controlos saudáveis utilizados foram dadores de sangue, pelo que apresentam uma mediana de idades mais baixa que a nossa população de SMD, patologia que afeta tipicamente o idoso. Assim, não poderemos inferir com certeza que determinado polimorfismo constitui fator de risco para SMD, uma vez que um determinado controlo poderá ainda vir a desenvolver esta patologia.

5.3.2. Perspetivas para investigações futuras

Tendo em conta os resultados obtidos neste estudo em doentes com SMD e no sentido de validar alguns dos marcadores moleculares encontrados na análise do diagnóstico, do prognóstico e identificação de novos grupos de risco é necessário:

- A inclusão de mais doentes na nossa amostra; o que será possível através de um estudo multicêntrico, em que o Grupo Português de Mielodisplasia poderia ter um papel importante;
- A inclusão de um grupo controlo para comparação com o grupo de doentes.

Além disso para completar e melhorar o nosso estudo estamos a iniciar outros estudos, nomeadamente:

- A análise das mutações dos genes *RAS* e *TET2*;
- O doseamento dos níveis de 5-hmC e 5-mC.

Para completar os estudos na linha celular de SMD será útil:

- Os estudos serem feitos, se possível, em mais subtipos de linhas celulares de SMD;
- Analisar o estado de ativação da proteína RAS nestas células, no sentido de confirmar a sua possível ativação pelo FLT3/ITD;
- Analisar as diferentes fases do ciclo celular nas células tratadas, para confirmar o efeito antiproliferativo dos fármacos, e sobretudo para analisar a interferência com o ciclo celular;
- Monitorizar a expressão de outras moléculas como por exemplo outros alvos de farnesilação na célula, como as proteínas CEN-P e RhoB, bem como a capacidade de indução de ROS, de modo a proceder a um estudo mais completo dos mecanismos de ação dos IFT e dos outros fármacos a nível molecular;
- Identificar moléculas envolvidas na via do PI3K/AKT, uma vez que é uma via potencialmente afetada pela mutação do *FLT3* e que está associada à ativação e expressão de diversas moléculas implicadas na sobrevivência da célula, como moduladores da expressão do fator de transcrição NFκB;
- Avaliar a eficácia de outros fármacos, como por exemplo o TRAIL recombinante, inibidores do FLT-3 e/ou outros inibidores de tirosina cinase, quer em monoterapia, quer em esquemas combinados com os fármacos utilizados neste estudo e/ou com a quimioterapia convencional.

No entanto, para validar estes resultados, a abordagem de futuro terá de passar por estudos em culturas primárias e em modelos animais.

6.

Conclusão

Os mecanismos envolvidos na patogênese da Síndrome SMD são múltiplos e complexos afetando a célula pluripotencial em várias etapas, originando alterações na proliferação, diferenciação e apoptose das células do sistema hematopoiético. Estas alterações determinam a evolução e transformação leucêmica da doença, bem como influenciam a resistência às terapêuticas convencionais.

Diversos estudos referem que o desenvolvimento e progressão da SMD são provavelmente mediados por alterações genéticas e/ou epigenéticas que envolvem a desregulação de múltiplos genes, incluindo os envolvidos na regulação do ciclo celular, na apoptose, na angiogénese e na imunomodulação. Por outro lado, o *background* genético pode influenciar o risco individual para SMD.

O presente estudo envolveu a caracterização clínica e molecular dos vários subtipos de SMD e a avaliação do potencial terapêutico de novos fármacos dirigidos a alvos moleculares. Seguidamente, apresentam-se as principais conclusões que foram obtidas a partir da análise do trabalho.

- A amostra de doentes com SMD incluídos no nosso estudo tem um predomínio de subtipos menos agressivos, nomeadamente CRDM e CRDU, o que se reflete em índices de prognóstico de risco baixo e intermédio.

- Analisando os vários subtipos OMS verificou-se diferença estatística para os parâmetros hemoglobina (média mais baixa na Síndrome 5q-), plaquetas (média mais baixa na AREB-2), β 2-microglobulina (média mais baixa na ARSA), eritropoietina (média mais baixa na NR), célula estaminal e caspase 3 (média mais baixa na AREB-2).

- Os doentes com SMD em estádios mais avançados (AREB-2) evidenciam um aumento tendencial da percentagem de células CD34+, bem como de células que coexpressam CD117, CD123 e TNF- α o que pode contribuir para a

evolução destes doentes para LMA. Por outro lado, o aumento da percentagem de células CD34+/CD117+ verificado nos doentes com CRDM pode, após seguimento mais alargado destes doentes, permitir identificar aqueles que tem maior risco de transformação leucémica.

– A análise da célula estaminal hematopoiética permitiu a identificação de dois grupos de células, um com características fenotípicas “normais”, as HSC, e outro com características neoplásicas, as LSC. Estas células expressam diferencialmente as citocinas inflamatórias IL-6 e TNF- α , sendo os resultados mais evidentes nos doentes do subtipo AREB-2 (a IL-6 predomina na HSC e o TNF- α na LSC). Estes resultados sugerem não só a relevância destes dois marcadores na distinção destes dois grupos de células estaminais, como também a importância destas células na evolução da doença, uma vez que neste subtipo se encontra o maior número de doentes que progrediu para LMA.

– O estudo da apoptose mostrou que a média da % de células que expressa caspase 3 é inferior na AREB-2, em relação aos outros subtipos ($p=0,05$). Estes resultados corroboram o envolvimento da apoptose na SMD, em particular a resistência à apoptose nos doentes com estádios mais avançados.

– Os resultados da análise ao perfil de metilação mostram que cerca de 56% dos doentes apresentam dois ou mais genes metilados e que somente 14,7% dos doentes não apresenta metilação de nenhum gene. A metilação do *p15* está presente em 56% dos doentes, enquanto a do gene *DAPK* ocorre em 54% dos doentes e em cerca de um terço dos casos, a metilação destes dois genes ocorre concomitantemente (32,05%), sobretudo no subtipo mais frequente – CRDM, salientando a relevância destes dois genes no comportamento biológico e clínico da SMD. Estes resultados sugerem que a metilação pode constituir um mecanismo precoce na etiopatogenia da SMD, podendo alterar a atual abordagem terapêutica.

– Os doentes que evoluíram para LMA foram os esperados em termos clínicos, mas, ao contrário do que está descrito na literatura, mais de metade não apresenta nenhum gene metilado, sendo que apenas 1 dos 11 doentes apresenta metilação de 2 genes. Os níveis de plaquetas (média mais baixa), de blastos (média mais elevada), de eritropoietina (média mais elevada), a maior percentagem de células estaminais mielóides com expressão de IL-6 (CD34+/CD117+/IL-6+) e os índices de prognóstico (riscos intermédio e alto) são entre todos os parâmetros avaliados os que podem influenciar a evolução para LMA ($p<0,05$). Ainda para os indivíduos com evolução para LMA encontramos as seguintes correlações diretas entre *R4* e hemoglobina; e entre FAS e sideroblastos em anel. E também verificámos uma correlação inversa entre p53 e vitamina B12, todas com significado estatístico.

– Neste sentido, nos doentes que evoluíram para LMA, elaborámos uma proposta de um novo índice de progressão, que denominámos Índice de Progressão para Leucemia Aguda (IPLA). Este índice reflete o somatório das variáveis estudadas, hematológicas, bioquímicas, célula estaminal, metilação e apoptose, que se consideraram alteradas. Com este tipo de análise verificámos que os doentes com os subtipos de SMD que apresentavam as pontuações mais elevadas foram os que evoluíram para LMA. Desta forma, este novo índice de prognóstico, poderá constituir uma nova “ferramenta” para avaliar o risco de progressão para LMA.

– Os doentes que faleceram são os que apresentaram uma concentração de hemoglobina mais baixa, percentagem de blastos e ferritina sérica mais elevadas, índices de prognóstico de riscos intermédio e alto, e maior percentagem de células estaminais mielóides com expressão de IL6 (CD34+/CD117+/IL-6+). Estes resultados sugerem a importância destes parâmetros como fatores de risco nos doentes que evoluíram para LMA.

– Existe uma associação entre a SMD e o genótipo AC do polimorfismo da MTHFR A1298C, nesta população.

– Além do mencionado, a eritropoietina revelou ser o parâmetro mais relevante no risco de evolução para LMA e na sobrevivência global, uma vez que os doentes com valores mais elevados além de serem os que mais evoluíram para LMA são também os que apresentam taxas de sobrevivência inferiores. Também a LDH sérica demonstrou um impacto negativo na análise da sobrevivência, quando elevada.

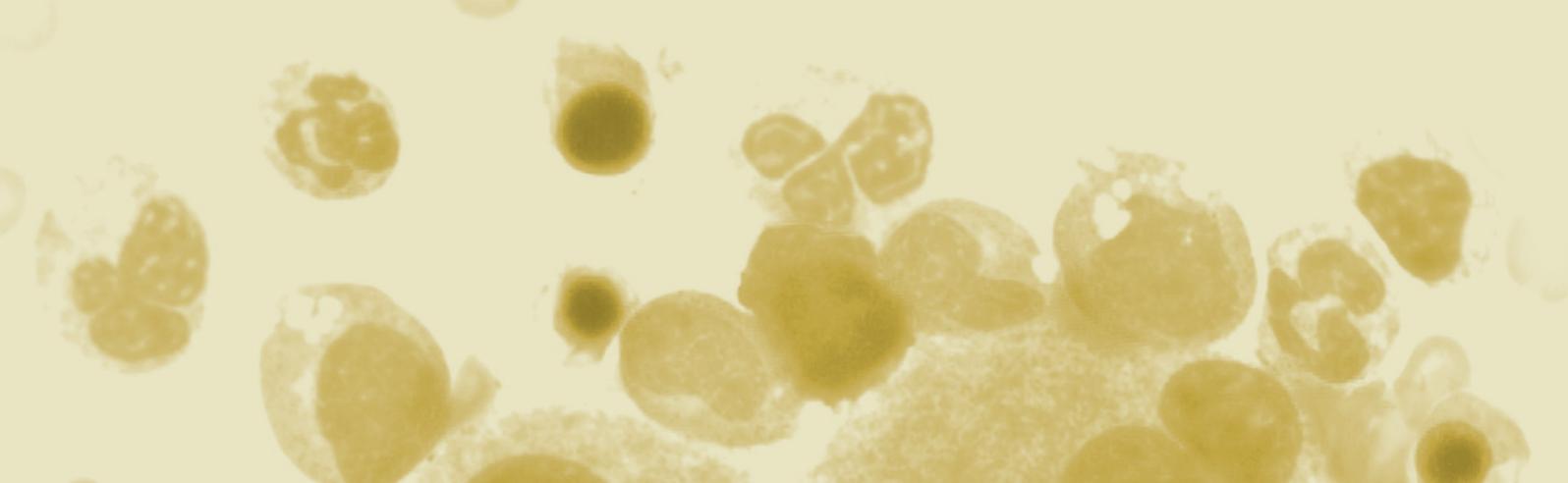
Com o presente estudo foi ainda possível a obtenção de dados experimentais no que se refere ao potencial terapêutico de novos fármacos na SMD, particularmente inibidores da farnesiltransferase (IFT, α -HFPa), de tirosina-cinase (ITK, imatinib), do proteasoma (IP, MG262), das deacetilases das histonas (HDACi, tricostatina) e hipometilantes (Decitabina). Os resultados mostram que:

- O α -HFPa em monoterapia possui um efeito citotóxico, e mais acentuadamente um efeito citostático, além de ser indutor da diferenciação celular. Estes efeitos são dependentes da dose e do tempo de incubação e independentes da presença de mutações nos genes *RAS*.
- Da mesma forma o IP, MG262, em monoterapia, revelou capacidade citostática e citotóxica significativas induzindo morte celular por apoptose. Este tipo de morte celular poderá estar relacionada com o aumento de moléculas pró-apoptóticas, como a BAD e/ou a BAX e o FAS, ou a diminuição de moléculas com potencial antiapoptótico como a BCL-2 e a survivina, o que poderá determinar maior suscetibilidade à

apoptose nas células tratadas com estes fármacos. Ainda de referir que, devido à sua especificidade de ação, os IPs e IFTs permitem o seu uso em baixa dosagem, exibindo nos ensaios clínicos um favorável perfil de toxicidade, o que os torna elegíveis como potenciais fármacos a integrar na terapêutica da SMD em monoterapia.

- Observámos sinergismo de potenciação entre os fármacos utilizados, dos quais se destaca a combinação farmacológica entre o IFT e o IP e/ou Imatinib. A complementaridade entre o efeito citostático induzido pelo α -HFGA, relacionado com a diminuição de ciclina D1, e o efeito citotóxico simultâneo do MG262, relacionado com um estado de “permissão” para apoptose, podem contribuir para o sucesso terapêutico desta associação farmacológica. Por outro lado, a associação entre α -HFGA e Imatinib, em células que exibem a mutação ITD presente no gene *FLT3*, poderá constituir outra alternativa terapêutica, sendo a forma de administração dos fármacos crucial para a sua eficácia terapêutica.
- Os estudos efetuados com os moduladores epigenéticos, hipometilantes e inibidores das deacetilases das histonas (DEC e TSA A) também induzem diminuição da proliferação e viabilidade das células F-36P de modo dependente da concentração, do tempo de exposição, do modo e esquema de administração, induzindo morte celular preferencialmente por apoptose.
- Assim, este estudo sugere que estes fármacos poderão constituir uma nova abordagem terapêutica na SMD, em monoterapia e/ou em esquemas terapêuticos combinados, o que permitirá a diminuição da toxicidade secundária e melhorar a qualidade de vida dos doentes com SMD.

A diversidade genotípica e fenotípica da SMD deixa transparecer uma fisiopatologia complexa. Para uma melhor compreensão desta doença será necessário um conhecimento mais aprofundado das vias de sinalização celulares e das alterações moleculares implicadas no fenótipo do clone maligno. Desta forma, será possível estabelecer um sistema de classificação da doença baseado numa “assinatura de expressão genética/epigenética/proteica”, definir grupos de prognóstico e individualizar a terapêutica dirigida a alvos moleculares. Assim, e com o desenvolvimento de novas opções terapêuticas, que passam pela combinação farmacológica otimizada, será possível atingir um tratamento personalizado, mais eficaz, de menor toxicidade, com menos efeitos secundários, permitindo melhor qualidade de vida e aumento da sobrevivência dos doentes com SMD.

A microscopic image showing various cells, likely from a blood smear or tissue sample, with different shapes and sizes, some containing dark spots. The background is a light, warm yellow color.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abdel-Wahab, O., & Levine, R. (2011). The spliceosome as an indicted conspirator in myeloid malignancies. *Cancer Cell*, 20(4), 420-3. doi:10.1016/j.ccr.2011.10.004
- Abrahamson, G., Boulwood, J., Madden, J., Kelly, S., Oscier, D. G., Rack, K., ... Wainscoat, J. S. (1991). Clonality of cell populations in refractory anaemia using combined approach of gene loss and X-linked restriction fragment length polymorphism-methylation analyses. *British Journal of Haematology*, 79(4), 550-5. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1685326>
- Adams, J. (2002). The proteasome as a novel target for the treatment of breast cancer. *Breast Disease*, 15, 61-70. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15687646>
- 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. doi:10.1111/j.1600-0609.2005.00559.x
- Albitar, M. (2001). Angiogenesis in acute myeloid leukemia and myelodysplastic syndrome. *Acta Haematologica*, 106(4), 170-6. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11815714>
- Alessandrino, E. P., Amadori, S., Cazzola, M., Locatelli, F., Mecucci, C., Morra, E., ... Tura, S. (2001). Myelodysplastic syndromes: recent advances. *Haematologica*, 86(11), 1124-57. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11694400>
- Alexandrakis, M. G., Passam, F. H., Kyriakou, D. S., Dambaki, C., Katrinakis, G., Tsirakis, G., ... Stathopoulos, E. N. (2004). Expression of the proliferation-associated nuclear protein MIB-1 and its relationship with microvascular density in bone marrow biopsies of patients with myelodysplastic syndromes. *Journal of Molecular Histology*, 35(8-9), 857-63. doi:10.1007/s10735-004-2341-0
- Alexandrakis, M. G., Passam, F. H., Pappa, C. A., Damilakis, J., Tsirakis, G., Kandidaki, E., ... Kyriakou, D. S. (n.d.). Serum evaluation of angiogenic cytokine basic fibroblast growth factor, hepatocyte growth factor and TNF-alpha in patients with myelodysplastic syndromes: correlation with bone marrow microvascular density. *International Journal of Immunopathology and Pharmacology*, 18(2), 287-95. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15888251>
- Amara, K., Trimeche, M., Ziadi, S., Laatiri, A., Hachana, M., & Korbi, S. (2008). Prognostic significance of aberrant promoter hypermethylation of CpG islands in patients with diffuse large B-cell lymphomas. *Annals of Oncology: Official Journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO*, 19(10), 1774-86. doi:10.1093/annonc/mdn374

- Asimakopoulos, F. A., White, N. J., Nacheva, E., & Green, A. R. (1994). Molecular analysis of chromosome 20q deletions associated with myeloproliferative disorders and myelodysplastic syndromes. *Blood*, *84*(9), 3086-94. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7949181>
- Attwood, J. T., Yung, R. L., & Richardson, B. C. (2002). DNA methylation and the regulation of gene transcription. *Cellular and Molecular Life Sciences: CMLS*, *59*(2), 241-57. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11915942>
- Au, W. Y., Fung, A., Man, C., Ma, S. K., Wan, T. S., Liang, R., & Kwong, Y. L. (2003). Aberrant p15 gene promoter methylation in therapy-related myelodysplastic syndrome and acute myeloid leukaemia: clinicopathological and karyotypic associations. *British Journal of Haematology*, *120*(6), 1062-5. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12648079>
- Aubry, J. P. *et al.* Annexin V used for measuring apoptosis in the early events of cellular cytotoxicity. *Cytometry* *37*, 197-204 (1999).
- Aul, C., & Germing, U. (1998). [Myelodysplastic syndromes]. *Der Internist*, *39*(11), 1168-80. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9859051>
- Aul, C., Gattermann, N., & Schneider, W. (1992). Age-related incidence and other epidemiological aspects of myelodysplastic syndromes. *British Journal of Haematology*, *82*(2), 358-67. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1419819>
- Aul, C., Giagounidis, A., & Germing, U. (2001). Epidemiological features of myelodysplastic syndromes: results from regional cancer surveys and hospital-based statistics. *International Journal of Hematology*, *73*(4), 405-10. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11503953>
- Ayton, P. M., & Cleary, M. L. (2001). Molecular mechanisms of leukemogenesis mediated by MLL fusion proteins. *Oncogene*, *20*(40), 5695-707. doi:10.1038/sj.onc.1204639
- Bacher, U., Haferlach, T., Kern, W., Haferlach, C., & Schnittger, S. (2007). A comparative study of molecular mutations in 381 patients with myelodysplastic syndrome and in 4130 patients with acute myeloid leukemia. *Haematologica*, *92*(6), 744-52. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17550846>
- Backx, B., Broeders, L., Hoefsloot, L. H., Wognum, B., & Löwenberg, B. (1996). Erythropoiesis in myelodysplastic syndrome: expression of receptors for erythropoietin and kit ligand. *Leukemia*, *10*(3), 466-72. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8642863>
- Badawi, M. A., Vickars, L. M., Chase, J. M., & Leitch, H. A. (2010). Red blood cell transfusion independence following the initiation of iron chelation therapy in myelodysplastic syndrome. *Advances in Hematology*, *2010*, 164045. doi:10.1155/2010/164045
- Badran, A., Yoshida, A., Wano, Y., Mutoh, M., Imamura, S., Yamashita, T., ... Ueda, T. (2003). Expression of the antiapoptotic gene survivin in myelodysplastic syndrome. *International Journal of Oncology*, *22*(1), 59-64. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12469185>
- Barlow, J. L., Drynan, L. F., Hewett, D. R., Holmes, L. R., Lorenzo-Abalde, S., Lane, A. L., ... McKenzie, A. N. J. (2010). A p53-dependent mechanism underlies macrocytic anemia in a mouse model of human 5q- syndrome. *Nature Medicine*, *16*(1), 59-66. doi:10.1038/nm.2063
- Barrett, J. (2000). Myelodysplastic syndrome and aplastic anemia-diagnostic and conceptual uncertainties. *Leukemia Research*, *24*(7), 595-6. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10867134>
- Barrett, J., Sauntharajah, Y., & Molldrem, J. (2000). Myelodysplastic syndrome and aplastic anemia: distinct entities or diseases linked by a common pathophysiology? *Seminars in Hematology*, *37*(1), 15-29. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10676908>
- Bartlett, J. M. S. & White, A. (2003). Extraction of DNA from whole blood. *Methods Mol. Biol.* *226*, 29-32.
- Basso, A. D., & Doll, R. J. (2006). Inhibition of cyclin-dependent kinases - a review of the recent patent literature. *Recent Patents on Anti-Cancer Drug Discovery*, *1*(3), 357-67. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18221046>

- Baur, A. S., Shaw, P., Burri, N., Delacrétaç, F., Bosman, F. T., & Chaubert, P. (1999). Frequent methylation silencing of p15(INK4b) (MTS2) and p16(INK4a) (MTS1) in B-cell and T-cell lymphomas. *Blood*, *94*(5), 1773-81. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10477703>
- Baylin, S. B. (2005). DNA methylation and gene silencing in cancer. *Nature Clinical Practice. Oncology*, *2 Suppl 1*, S4-11. doi:10.1038/ncponc0354
- Baylin, S. B., Belinsky, S. A., & Herman, J. G. (2000). Aberrant methylation of gene promoters in cancer-concepts, misconcepts, and promise. *Journal of the National Cancer Institute*, *92*(18), 1460-1. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10995795>
- Beaupre, D. M., & Kurzrock, R. (1999a). RAS and leukemia: from basic mechanisms to gene-directed therapy. *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*, *17*(3), 1071-9. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10071302>
- Beaupre, D. M., & Kurzrock, R. (1999b). RAS inhibitors in hematologic cancers: biologic considerations and clinical applications. *Investigational New Drugs*, *17*(2), 137-43. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10638484>
- Bejar, R., Stevenson, K. E., Caughey, B., Lindsley, R. C., Mar, B. G., Stojanov, P., ... Ebert, B. L. (2014). Somatic Mutations Predict Poor Outcome in Patients With Myelodysplastic Syndrome After Hematopoietic Stem-Cell Transplantation. *Journal of Clinical Oncology*. doi:10.1200/JCO.2013.52.3381
- Bejar, R., Stevenson, K., Abdel-Wahab, O., Galili, N., Nilsson, B., Garcia-Manero, G., ... Ebert, B. L. (2011). Clinical effect of point mutations in myelodysplastic syndromes. *The New England Journal of Medicine*, *364*(26), 2496-506. doi:10.1056/NEJMoa1013343
- Belinsky, S. A., Palmisano, W. A., Gilliland, F. D., Crooks, L. A., Divine, K. K., Winters, S. A., ... Crowell, R. E. (2002). Aberrant promoter methylation in bronchial epithelium and sputum from current and former smokers. *Cancer Research*, *62*(8), 2370-7. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11956099>
- Bennett, L. B., Schnabel, J. L., Kelchen, J. M., Taylor, K. H., Guo, J., Arthur, G. L., ... Caldwell, C. W. (2009). DNA hypermethylation accompanied by transcriptional repression in follicular lymphoma. *Genes, Chromosomes & Cancer*, *48*(9), 828-41. doi:10.1002/gcc.20687
- Bergamaschi, D., Samuels, Y., Jin, B., Duraisingham, S., Crook, T., & Lu, X. (2004). ASPP1 and ASPP2: common activators of p53 family members. *Molecular and Cellular Biology*, *24*(3), 1341-50. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=321425&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Bernas, T., Grégori, G., Asem, E. K. & Robinson, J. P. (2006). Integrating cytomics and proteomics. *Mol. Cell. Proteomics*, *5*, 2-13.
- Bernasconi, P., Klersy, C., Boni, M., Cavigliano, P. M., Calatroni, S., Giardini, I., ... Bernasconi, C. (2005). Incidence and prognostic significance of karyotype abnormalities in de novo primary myelodysplastic syndromes: a study on 331 patients from a single institution. *Leukemia*, *19*(8), 1424-31. doi:10.1038/sj.leu.2403806
- Bialik, S., & Kimchi, A. (2006). The death-associated protein kinases: structure, function, and beyond. *Annual Review of Biochemistry*, *75*, 189-210. doi:10.1146/annurev.biochem.75.103004.142615
- Bishop, W. R., Kirschmeier, P., & Baum, C. (n.d.). Farnesyl transferase inhibitors: mechanism of action, translational studies and clinical evaluation. *Cancer Biology & Therapy*, *2*(4 Suppl 1), S96-104. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14508086>
- Bleackley, R. C., & Heibein, J. A. (2001). Enzymatic control of apoptosis. *Natural Product Reports*, *18*(4), 431-40. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11548051>
- Block, M., Jacobson, L. O., & Bethard, W. F. (1953). Preleukemic acute human leukemia. *Journal of the American Medical Association*, *152*(11), 1018-28. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/13052490>
- Bogdanović, A. D., Trpinac, D. P., Janković, G. M., Bumbasirević, V. Z., Obradović, M., & Colović, M. D. (1997). Incidence and role of apoptosis in myelodysplastic syndrome: morphological

- and ultrastructural assessment. *Leukemia*, 11(5), 656-9. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9180288>
- Boissinot, M., Garand, R., Hamidou, M., & Hermouet, S. (2006). The JAK2-V617F mutation and essential thrombocythemia features in a subset of patients with refractory anemia with ring sideroblasts (RARS). *Blood*, 108(5), 1781-2. doi:10.1182/blood-2006-03-008227
- Borkhardt, A., Bojesen, S., Haas, O. A., Fuchs, U., Bartelheimer, D., Loncarevic, I. F., ... Lampert, F. (2000). The human GRAF gene is fused to MLL in a unique t(5;11)(q31;q23) and both alleles are disrupted in three cases of myelodysplastic syndrome/acute myeloid leukemia with a deletion 5q. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97(16), 9168-73. doi:10.1073/pnas.150079597
- Boultonwood, J., & Wainscoat, J. S. (2007). Gene silencing by DNA methylation in haematological malignancies. *British Journal of Haematology*, 138(1), 3-11. doi:10.1111/j.1365-2141.2007.06604.x
- Boultonwood, J., Fidler, C., Strickson, A. J., Watkins, F., Gama, S., Kearney, L., ... Wainscoat, J. S. (2002). Narrowing and genomic annotation of the commonly deleted region of the 5q- syndrome. *Blood*, 99(12), 4638-41. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12036901>
- Bouscary, D., De Vos, J., Guesnu, M., Jondeau, K., Viguier, F., Melle, J., ... Fontenay-Roupie, M. (1997). Fas/Apo-1 (CD95) expression and apoptosis in patients with myelodysplastic syndromes. *Leukemia*, 11(6), 839-45. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9177438>
- Brakensiek, K., Länger, F., Kreipe, H., & Lehmann, U. (2005). Absence of p21(CIP 1), p27(KIP 1) and p 57(KIP 2) methylation in MDS and AML. *Leukemia Research*, 29(11), 1357-60. doi:10.1016/j.leukres.2005.04.012
- Brakensiek, K., Länger, F., Schlegelberger, B., Kreipe, H., & Lehmann, U. (2005). Hypermethylation of the suppressor of cytokine signalling-1 (SOCS-1) in myelodysplastic syndrome. *British Journal of Haematology*, 130(2), 209-17. doi:10.1111/j.1365-2141.2005.05590.x
- Breccia, M., Carosino, I., Biondo, F., Mancini, M., Russo, E., Latagliata, R., & Alimena, G. (2006). Usefulness and prognostic impact on survival of WHO reclassification in FAB low risk myelodysplastic syndromes. *Leukemia Research*, 30(2), 178-82. doi:10.1016/j.leukres.2005.06.015
- Bull, C., & Fenech, M. (2008). Genome-health nutrigenomics and nutrigenetics: nutritional requirements or "nutriomes" for chromosomal stability and telomere maintenance at the individual level. *The Proceedings of the Nutrition Society*, 67(2), 146-56. doi:10.1017/S0029665108006988
- Bull, L. M., White, D. L., Bray, M., Nurgalieva, Z., & El-Serag, H. B. (2009). Phase I and II enzyme polymorphisms as risk factors for Barrett's esophagus and esophageal adenocarcinoma: a systematic review and meta-analysis. *Diseases of the Esophagus: Official Journal of the International Society for Diseases of the Esophagus / I.S.D.E*, 22(7), 571-87. doi:10.1111/j.1442-2050.2009.00947.x
- Buonamici, S., Li, D., Chi, Y., Zhao, R., Wang, X., Brace, L., ... Nucifora, G. (2004). EVI1 induces myelodysplastic syndrome in mice. *The Journal of Clinical Investigation*, 114(5), 713-9. doi:10.1172/JCI21716
- Calado, R. T. (2011). Immunologic aspects of hypoplastic myelodysplastic syndrome. *Seminars in Oncology*, 38(5), 667-72. doi:10.1053/j.seminoncol.2011.04.006
- Caldera, V., Mellai, M., Annovazzi, L., Monzeglio, O., Piazzi, A., & Schiffer, D. (n.d.). MGMT hypermethylation and MDR system in glioblastoma cancer stem cells. *Cancer Genomics & Proteomics*, 9(4), 171-8. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22798502>
- Cameron, E. E., Bachman, K. E., Myöhänen, S., Herman, J. G., & Baylin, S. B. (1999). Synergy of demethylation and histone deacetylase inhibition in the re-expression of genes silenced in cancer. *Nature Genetics*, 21(1), 103-107. doi:10.1038/5047

- Campioni, D., Secchiero, P., Corallini, F., Melloni, E., Capitani, S., Lanza, F., & Zauli, G. (2005). Evidence for a role of TNF-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) in the anemia of myelodysplastic syndromes. *The American Journal of Pathology*, *166*(2), 557-63. doi:10.1016/S0002-9440(10)62277-8
- Cao, T.-T., Gao, L., Zhou, M.-H., Guo, Y.-L., Yan, Z., Zhang, S.-S., ... Yu, L. (2012). [Application of multiplex nested RT-PCR to detecting 10 fusion genes related with MLL gene in myelodysplastic syndrome]. *Zhongguo Shi Yan Xue Ye Xue Za Zhi / Zhongguo Bing Li Sheng Li Xue Hui = Journal of Experimental Hematology / Chinese Association of Pathophysiology*, *20*(4), 933-6. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22931658>
- Catenacci, D. V. T., & Schiller, G. J. (2005). Myelodysplastic syndromes: a comprehensive review. *Blood Reviews*, *19*(6), 301-19. doi:10.1016/j.blre.2005.01.004
- Ceesay, M. M., Lea, N. C., Ingram, W., Westwood, N. B., Gäken, J., Mohamedali, A., ... Mufti, G. J. (2006). The JAK2 V617F mutation is rare in RARS but common in RARS-T. *Leukemia*, *20*(11), 2060-1. doi:10.1038/sj.leu.2404373
- Challen, G. A., Sun, D., Jeong, M., Luo, M., Jelinek, J., Berg, J. S., ... Goodell, M. A. (2012). Dnmt3a is essential for hematopoietic stem cell differentiation. *Nature Genetics*, *44*(1), 23-31. doi:10.1038/ng.1009
- Chan, M. W. Y., Chan, L. W., Tang, N. L. S., Tong, J. H. M., Lo, K. W., Lee, T. L., ... To, K. F. (2002). Hypermethylation of multiple genes in tumor tissues and voided urine in urinary bladder cancer patients. *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, *8*(2), 464-70. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11839665>
- Chang, E. H., Furth, M. E., Scolnick, E. M., & Lowy, D. R. (1982). Tumorigenic transformation of mammalian cells induced by a normal human gene homologous to the oncogene of Harvey murine sarcoma virus. *Nature*, *297*(5866), 479-83. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6283358>
- Chang, F., Steelman, L. S., Shelton, J. G., Lee, J. T., Navolanic, P. M., Blalock, W. L., ... McCubrey, J. A. (2003). Regulation of cell cycle progression and apoptosis by the Ras/Raf/MEK/ERK pathway (Review). *International Journal of Oncology*, *22*(3), 469-80. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12579299>
- Chang, H. W., Chan, A., Kwong, D. L. W., Wei, W. I., Sham, J. S. T., & Yuen, A. P. W. (2003). Evaluation of hypermethylated tumor suppressor genes as tumor markers in mouth and throat rinsing fluid, nasopharyngeal swab and peripheral blood of nasopharyngeal carcinoma patient. *International Journal of Cancer. Journal International Du Cancer*, *105*(6), 851-5. doi:10.1002/ijc.11162
- Chaudhary, P. M., Eby, M., Jasmin, A., Bookwalter, A., Murray, J., & Hood, L. (1997). Death receptor 5, a new member of the TNFR family, and DR4 induce FADD-dependent apoptosis and activate the NF-kappaB pathway. *Immunity*, *7*(6), 821-30. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9430227>
- Chen, Y.-Z., Liu, D., Zhao, Y.-X., Wang, H.-T., Gao, Y., & Chen, Y. (2014). Relationships Between p16 Gene Promoter Methylation and Clinicopathologic Features of Colorectal Cancer: A Meta-Analysis of 27 Cohort Studies. *DNA and Cell Biology*. doi:10.1089/dna.2013.2253
- Chen, Z., Pasquini, M., Hong, B., DeHart, S., Heikens, M., & Tsai, S. (2005). The human Penumbra gene is mapped to a region on chromosome 7 frequently deleted in myeloid malignancies. *Cancer Genetics and Cytogenetics*, *162*(2), 95-8. doi:10.1016/j.cancergencyto.2005.03.017
- Chiba, S. *et al.* Establishment and erythroid differentiation of a cytokine-dependent human leukemic cell line F-36: a parental line requiring granulocyte-macrophage colony-stimulating factor or interleukin-3, and a subline requiring erythropoietin. *Blood*, *78*, 2261-8 (1991).
- Chim, C. S., Wong, K. Y., Loong, F., Lam, W. W., & Srivastava, G. (2007). Frequent epigenetic inactivation of Rb1 in addition to p15 and p16 in mantle cell and follicular lymphoma. *Human Pathology*, *38*(12), 1849-57. doi:10.1016/j.humpath.2007.05.009
- Chinnaiyan, A. M., O'Rourke, K., Tewari, M., & Dixit, V. M. (1995). FADD, a novel death domain-containing protein, interacts with the death domain of Fas and initiates apoptosis. *Cell*, *81*(4), 505-12. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7538907>

- 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*(9), 1813-9. doi:10.1038/sj.leu.2403054
- Christiansen, D. H., Andersen, M. K., & Pedersen-Bjergaard, J. (2004). Mutations of AML1 are common in therapy-related myelodysplasia following therapy with alkylating agents and are significantly associated with deletion or loss of chromosome arm 7q and with subsequent leukemic transformation. *Blood*, *104*(5), 1474-81. doi:10.1182/blood-2004-02-0754
- 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*(9), 1813-9. doi:10.1038/sj.leu.2403054
- Christiansen, D. H., Andersen, M. K., Desta, F., & Pedersen-Bjergaard, J. (2005). Mutations of genes in the receptor tyrosine kinase (RTK)/RAS-BRAF signal transduction pathway in therapy-related myelodysplasia and acute myeloid leukemia. *Leukemia*, *19*(12), 2232-40. doi:10.1038/sj.leu.2404009
- Chu, B. F., Karpenko, M. J., Liu, Z., Aimiwu, J., Villalona-Calero, M. A., Chan, K. K., ... Otterson, G. A. (2013). Phase I study of 5-aza-2'-deoxycytidine in combination with valproic acid in non-small-cell lung cancer. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, *71*(1), 115-121. doi:10.1007/s00280-012-1986-8
- Cohen, P. R. (2007). Sweet's syndrome—a comprehensive review of an acute febrile neutrophilic dermatosis. *Orphanet Journal of Rare Diseases*, *2*, 34. doi:10.1186/1750-1172-2-34
- Dahabreh, I. J., Giannouli, S., Gota, V., & Voulgarelis, M. (2010). GSTT1 and GSTM1 polymorphisms and myelodysplastic syndrome risk: a systematic review and meta-analysis. *International Journal of Cancer. Journal International Du Cancer*, *126*(7), 1716-23. doi:10.1002/ijc.24940
- Damm, F., Kosmider, O., Gelsi-Boyer, V., Renneville, A., Carbuccia, N., Hidalgo-Curtis, C., ... Fontenay, M. (2012). Mutations affecting mRNA splicing define distinct clinical phenotypes and correlate with patient outcome in myelodysplastic syndromes. *Blood*, *119*(14), 3211-8. doi:10.1182/blood-2011-12-400994
- Danial, N. N., & Korsmeyer, S. J. (2004). Cell death: critical control points. *Cell*, *116*(2), 205-19. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14744432>
- Daskalakis, M., Nguyen, T. T., Nguyen, C., Guldberg, P., Köhler, G., Wijermans, P., ... Lübbert, M. (2002). Demethylation of a hypermethylated P15/INK4B gene in patients with myelodysplastic syndrome by 5-Aza2'-deoxycytidine (decitabine) treatment. *Blood*, *100*(8), 2957-2964. doi:10.1182/blood.V100.8.2957
- Deb, S. P., Muñoz, R. M., Brown, D. R., Subler, M. A., & Deb, S. (1994). Wild-type human p53 activates the human epidermal growth factor receptor promoter. *Oncogene*, *9*(5), 1341-9. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8152794>
- Deeg, H. J., Jiang, P. Y. Z., Holmberg, L. A., Scott, B., Petersdorf, E. W., & Appelbaum, F. R. (2004). Hematologic responses of patients with MDS to antithymocyte globulin plus etanercept correlate with improved flow scores of marrow cells. *Leukemia Research*, *28*(11), 1177-80. doi:10.1016/j.leukres.2004.03.016
- Del Cañizo, M. f., Amigo, M. f., Hernández, J. M., Sanz, G., Núñez, R., Carreras, E., ... Mataix, R. (2000). Incidence and characterization of secondary myelodysplastic syndromes following autologous transplantation. *Haematologica*, *85*(4), 403-9. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10756367>
- Delcros, J. G., Floc'h, M. B., Prigent, C., & Arlot-Bonnemains, Y. (2003). Proteasome inhibitors as therapeutic agents: current and future strategies. *Current Medicinal Chemistry*, *10*(6), 479-503. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12570694>
- Delcuve, G. P., Khan, D. H., & Davie, J. R. (2012). Roles of histone deacetylases in epigenetic regulation: emerging paradigms from studies with inhibitors. *Clinical Epigenetics*, *4*(1), 5. doi:10.1186/1868-7083-4-5

- Delforge, M. (2003). Understanding the pathogenesis of myelodysplastic syndromes. *The Hematology Journal: The Official Journal of the European Haematology Association / EHA*, 4(5), 303-9. doi:10.1038/sj.thj.6200315
- Delforge, M., Selleslag, D., Beguin, Y., Triffet, A., Mineur, P., Theunissen, K., ... Ravoet, C. (2014). Adequate iron chelation therapy for at least six months improves survival in transfusion-dependent patients with lower risk myelodysplastic syndromes. *Leukemia Research*. doi:10.1016/j.leukres.2014.02.003
- Delhommeau, F., Dupont, S., Della Valle, V., James, C., Trannoy, S., Massé, A., ... Bernard, O. A. (2009). Mutation in TET2 in myeloid cancers. *The New England Journal of Medicine*, 360(22), 2289-301. doi:10.1056/NEJMoa0810069
- Della Porta, M. G., & Malcovati, L. (2011). Myelodysplastic syndromes with bone marrow fibrosis. *Haematologica*, 96(2), 180-3. doi:10.3324/haematol.2010.039875
- Della Porta, M. G., Alessandrino, E. P., Bacigalupo, A., van Lint, M. T., Malcovati, L., Pascutto, C., ... Rambaldi, A. (2014). Predictive factors for the outcome of allogeneic transplantation in patients with MDS stratified according to the revised IPSS-R. *Blood*, 123(15), 2333-42. doi:10.1182/blood-2013-12-542720
- Desagher, S., Osen-Sand, A., Nichols, A., Eskes, R., Montessuit, S., Lauper, S., ... Martinou, J. C. (1999). Bid-induced conformational change of Bax is responsible for mitochondrial cytochrome c release during apoptosis. *The Journal of Cell Biology*, 144(5), 891-901. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2148190&to=ol=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Dicker, F., Haferlach, C., Sundermann, J., Wendland, N., Weiss, T., Kern, W., ... Schnittger, S. (2010). Mutation analysis for RUNX1, MLL-PTD, FLT3-ITD, NPM1 and NRAS in 269 patients with MDS or secondary AML. *Leukemia*, 24(8), 1528-32. doi:10.1038/leu.2010.124
- Ding, L., Ley, T. J., Larson, D. E., Miller, C. A., Koboldt, D. C., Welch, J. S., ... DiPersio, J. F. (2012). Clonal evolution in relapsed acute myeloid leukaemia revealed by whole-genome sequencing. *Nature*, 481(7382), 506-10. doi:10.1038/nature10738
- Dong, W., Qian, Y., & Yang, L. (2014). Telomerase, hTERT and splice variants in patients with myelodysplastic syndromes. *Leukemia Research*. doi:10.1016/j.leukres.2014.04.008
- Droin, N., Guéry, L., Benikhlef, N., & Solary, E. (2013). Targeting apoptosis proteins in hematological malignancies. *Cancer Letters*, 332(2), 325-34. doi:10.1016/j.canlet.2011.06.016
- Du, Y., Fryzek, J., Sekeres, M. A., & Taioli, E. (2010). Smoking and alcohol intake as risk factors for myelodysplastic syndromes (MDS). *Leukemia Research*, 34(1), 1-5. doi:10.1016/j.leukres.2009.08.006
- Dulaimi, E., Hillinck, J., Ibanez de Caceres, I., Al-Saleem, T., & Cairns, P. (2004). Tumor suppressor gene promoter hypermethylation in serum of breast cancer patients. *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, 10(18 Pt 1), 6189-93. doi:10.1158/1078-0432.CCR-04-0597
- Dutt, S., Narla, A., Lin, K., Mullally, A., Abayasekara, N., Megerdichian, C., ... Ebert, B. L. (2011). Haploinsufficiency for ribosomal protein genes causes selective activation of p53 in human erythroid progenitor cells. *Blood*, 117(9), 2567-76. doi:10.1182/blood-2010-07-295238
- Ebert, B. L., Pretz, J., Bosco, J., Chang, C. Y., Tamayo, P., Galili, N., ... Golub, T. R. (2008). Identification of RPS14 as a 5q- syndrome gene by RNA interference screen. *Nature*, 451(7176), 335-9. doi:10.1038/nature06494
- Economopoulou, C., Pappa, V., Kotsiоти, F., Papageorgiou, S., Kapsimali, V., Papasteriadi, C., ... Economopoulos, T. (2008). Analysis of apoptosis regulatory genes expression in the bone marrow (BM) of adult de novo myelodysplastic syndromes (MDS). *Leukemia Research*, 32(1), 61-9. doi:10.1016/j.leukres.2007.04.012
- Egger, G., Liang, G., Aparicio, A., & Jones, P. A. (2004). Epigenetics in human disease and prospects for epigenetic therapy. *Nature*, 429(6990), 457-63. doi:10.1038/nature02625
- Emery, J. G., McDonnell, P., Burke, M. B., Deen, K. C., Lyn, S., Silverman, C., ... Young, P. R. (1998). Osteoprotegerin is a receptor for the cytotoxic ligand TRAIL. *The Journal of*

- Biological Chemistry*, 273(23), 14363-7. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9603945>
- Engelhardt, M., Wäsch, R., & Guo, Y. (2004). Telomeres and telomerase in normal and leukemic hematopoietic cells. *Leukemia Research*, 28(10), 1001-4. doi:10.1016/j.leukres.2004.01.015
- Enright, H., & Miller, W. (1997). Autoimmune phenomena in patients with myelodysplastic syndromes. *Leukemia & Lymphoma*, 24(5-6), 483-9. doi:10.3109/10428199709055585
- Ernst, T., Chase, A. J., Score, J., Hidalgo-Curtis, C. E., Bryant, C., Jones, A. V., ... Cross, N. C. P. (2010). Inactivating mutations of the histone methyltransferase gene EZH2 in myeloid disorders. *Nature Genetics*, 42(8), 722-6. doi:10.1038/ng.621
- Eskes, R., Desagher, S., Antonsson, B., & Martinou, J. C. (2000). Bid induces the oligomerization and insertion of Bax into the outer mitochondrial membrane. *Molecular and Cellular Biology*, 20(3), 929-35. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=85210&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Esteller, M. (2002). CpG island hypermethylation and tumor suppressor genes: a booming present, a brighter future. *Oncogene*, 21(35), 5427-40. doi:10.1038/sj.onc.1205600
- Esteller, M. (2003). Profiling aberrant DNA methylation in hematologic neoplasms: a view from the tip of the iceberg. *Clinical Immunology (Orlando, Fla.)*, 109(1), 80-8. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14585279>
- Esteller, M. (2008). Epigenetics in cancer. *The New England Journal of Medicine*, 358(11), 1148-1159. doi:10.1056/NEJMra072067
- Esteller, M., & Herman, J. G. (2004). Generating mutations but providing chemosensitivity: the role of O6-methylguanine DNA methyltransferase in human cancer. *Oncogene*, 23(1), 1-8. doi:10.1038/sj.onc.1207316
- Esteller, M., Fraga, M. F., Paz, M. F., Campo, E., Colomer, D., Novo, F. J., ... Herman, J. G. (2002). Cancer epigenetics and methylation. *Science (New York, N.Y.)*, 297(5588), 1807-8; discussion 1807-8. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12229925>
- Esteller, M., Gaidano, G., Goodman, S. N., Zagonel, V., Capello, D., Botto, B., ... Herman, J. G. (2002). Hypermethylation of the DNA repair gene O(6)-methylguanine DNA methyltransferase and survival of patients with diffuse large B-cell lymphoma. *Journal of the National Cancer Institute*, 94(1), 26-32. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11773279>
- Esteller, M., Sanchez-Cespedes, M., Rosell, R., Sidransky, D., Baylin, S. B., & Herman, J. G. (1999). Detection of aberrant promoter hypermethylation of tumor suppressor genes in serum DNA from non-small cell lung cancer patients. *Cancer Research*, 59(1), 67-70. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9892187>
- Faderl, S., & Kantarjian, H. M. (2004). Novel therapies for myelodysplastic syndromes. *Cancer*, 101(2), 226-41. doi:10.1002/cncr.20381
- Farmakis, D., Polymeropoulos, E., Polonifi, A., Deftereos, S., Giakoumi, X., Floudas, H., ... Aessopos, A. (2005). Myelodysplastic syndrome associated with multiple autoimmune disorders. *Clinical Rheumatology*, 24(4), 428-30. doi:10.1007/s10067-004-1059-4
- Farquhar, M. J., & Bowen, D. T. (2003). Oxidative stress and the myelodysplastic syndromes. *International Journal of Hematology*, 77(4), 342-50. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12774921>
- Feinberg, A. P. (2004). The epigenetics of cancer etiology. *Seminars in Cancer Biology*, 14(6), 427-32. doi:10.1016/j.semcancer.2004.06.005
- Feinberg, A. P. (2007). Phenotypic plasticity and the epigenetics of human disease. *Nature*, 447(7143), 433-40. doi:10.1038/nature05919
- Felli, N., Fontana, L., Pelosi, E., Botta, R., Bonci, D., Facchiano, F., ... Peschle, C. (2005). MicroRNAs 221 and 222 inhibit normal erythropoiesis and erythroleukemic cell growth via kit receptor down-modulation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(50), 18081-6. doi:10.1073/pnas.0506216102

- Fenaux, P., Bowen, D., Gattermann, N., Hellström-Lindberg, E., Hofmann, W.-K., Pfeilstöcker, M., ... Santini, V. (2010). Practical use of azacitidine in higher-risk myelodysplastic syndromes: an expert panel opinion. *Leukemia Research*, *34*(11), 1410-1416. doi:10.1016/j.leukres.2010.05.021
- Fenaux, P., Mufti, G. J., Hellström-Lindberg, E., Santini, V., Gattermann, N., Germing, U., ... Silverman, L. R. (2010). Azacitidine prolongs overall survival compared with conventional care regimens in elderly patients with low bone marrow blast count acute myeloid leukemia. *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*, *28*(4), 562-9. doi:10.1200/JCO.2009.23.8329
- Fianchi, L., Criscuolo, M., Breccia, M., Maurillo, L., Salvi, F., Musto, P., ... Voso, M. T. (2013). High rate of remissions in chronic myelomonocytic leukemia treated with 5-azacytidine: results of an Italian retrospective study. *Leukemia & Lymphoma*, *54*(3), 658-61. doi:10.3109/10428194.2012.719617
- Figueroa, M. E., Abdel-Wahab, O., Lu, C., Ward, P. S., Patel, J., Shih, A., ... Melnick, A. (2010). Leukemic IDH1 and IDH2 mutations result in a hypermethylation phenotype, disrupt TET2 function, and impair hematopoietic differentiation. *Cancer Cell*, *18*(6), 553-67. doi:10.1016/j.ccr.2010.11.015
- Figueroa, M. E., Skrabanek, L., Li, Y., Jemjit, A., Fandy, T. E., Paietta, E., ... Melnick, A. (2009). MDS and secondary AML display unique patterns and abundance of aberrant DNA methylation. *Blood*, *114*(16), 3448-3458. doi:10.1182/blood-2009-01-200519
- Fili, C., Malagola, M., Follo, M. Y., Finelli, C., Iacobucci, I., Martinelli, G., ... Russo, D. (2013). Prospective phase II Study on 5-days azacitidine for treatment of symptomatic and/or erythropoietin unresponsive patients with low/INT-1-risk myelodysplastic syndromes. *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, *19*(12), 3297-308. doi:10.1158/1078-0432.CCR-12-3540
- Fischle, W., Wang, Y., & Allis, C. D. (2003). Histone and chromatin cross-talk. *Current Opinion in Cell Biology*, *15*(2), 172-83. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12648673>
- Folkman, J. (1995). Angiogenesis inhibitors generated by tumors. *Molecular Medicine* (Cambridge, Mass.), *1*(2), 120-2. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2229937&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Fontenay-Roupie, M., Bouscary, D., Guesnu, M., Picard, F., Melle, J., Lacombe, C., ... Dreyfus, F. (1999). Ineffective erythropoiesis in myelodysplastic syndromes: correlation with Fas expression but not with lack of erythropoietin receptor signal transduction. *British Journal of Haematology*, *106*(2), 464-73. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10460607>
- Friso, S., Choi, S.-W., Girelli, D., Mason, J. B., Dolnikowski, G. G., Bagley, P. J., ... Selhub, J. (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 of the United States of America*, *99*(8), 5606-11. doi:10.1073/pnas.062066299
- Fritsche-Polanz, R., Jordan, J. H., Feix, A., Sperr, W. R., Sunder-Plassmann, G., Valent, P., & Födinger, M. (2001). Mutation analysis of C-KIT in patients with myelodysplastic syndromes without mastocytosis and cases of systemic mastocytosis. *British Journal of Haematology*, *113*(2), 357-64. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11380399>
- Frosst, P., Blom, H. J., Milos, R., Goyette, P., Sheppard, C. A., Matthews, R. G., ... van den Heuvel, L. P. (1995). A candidate genetic risk factor for vascular disease: a common mutation in methylenetetrahydrofolate reductase. *Nature Genetics*, *10*(1), 111-3. doi:10.1038/ng0595-111
- Fu, B., Jaso, J. M., Sargent, R. L., Goswami, M., Verstovsek, S., Medeiros, L. J., & Wang, S. A. (2014). Bone marrow fibrosis in patients with primary myelodysplastic syndromes has prognostic value using current therapies and new risk stratification systems. *Modern Pathology: An Official Journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc*, *27*(5), 681-9. doi:10.1038/modpathol.2013.187

- Fu, T., Min, H., Xu, Y., Chen, J., & Li, G. (2012). Molecular Dynamic Simulation Insights into the Normal State and Restoration of p53 Function. *International Journal of Molecular Sciences*, *13*(8), 9709-40. doi:10.3390/ijms13089709
- Fujiwara, K., Fujimoto, N., Tabata, M., Nishii, K., Matsuo, K., Hotta, K., ... Tanimoto, M. (2005). Identification of epigenetic aberrant promoter methylation in serum DNA is useful for early detection of lung cancer. *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, *11*(3), 1219-25. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15709192>
- Fuks, F., Burgers, W. A., Brehm, A., Hughes-Davies, L., & Kouzarides, T. (2000). DNA methyltransferase Dnmt1 associates with histone deacetylase activity. *Nature Genetics*, *24*(1), 88-91. doi:10.1038/71750
- Fulda, S. (2009). Inhibitor of apoptosis (IAP) proteins: novel insights into the cancer-relevant targets for cell death induction. *ACS Chemical Biology*, *4*(7), 499-501. doi:10.1021/cb900150g
- Galm, O., Herman, J. G., & Baylin, S. B. (2006). The fundamental role of epigenetics in hematopoietic malignancies. *Blood Reviews*, *20*(1), 1-13. doi:10.1016/j.blre.2005.01.006
- Garcia-Manero, G. (2003). Methylation, aging, and pediatric acute lymphocytic leukemia. *Leukemia*, *17*(11), 2063-4. doi:10.1038/sj.leu.2403117
- Garcia-Manero, G. (2003). Prognostic implications of epigenetic silencing of p15INK4B in acute promyelocytic leukemia. *Leukemia*, *17*(5), 839-40. doi:10.1038/sj.leu.2402908
- Garcia-Manero, G., Daniel, J., Smith, T. L., Kornblau, S. M., Lee, M.-S., Kantarjian, H. M., & Issa, J.-P. J. (2002). DNA methylation of multiple promoter-associated CpG islands in adult acute lymphocytic leukemia. *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, *8*(7), 2217-24. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12114423>
- Gattermann, N. (2000). From sideroblastic anemia to the role of mitochondrial DNA mutations in myelodysplastic syndromes. *Leukemia Research*, *24*(2), 141-51. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10654450>
- Gattermann, N., Billiet, J., Kronenwett, R., Zipperer, E., Germing, U., Nollet, F., ... Selleslag, D. (2007). High frequency of the JAK2 V617F mutation in patients with thrombocytosis (platelet count >600x10⁹/L) and ringed sideroblasts more than 15% considered as MDS/MPD, unclassifiable. *Blood*, *109*(3), 1334-5. doi:10.1182/blood-2006-05-022491
- Gatto, S., Ball, G., Onida, F., Kantarjian, H. M., Estey, E. H., & Beran, M. (2003). Contribution of beta-2 microglobulin levels to the prognostic stratification of survival in patients with myelodysplastic syndrome (MDS). *Blood*, *102*(5), 1622-5. doi:10.1182/blood-2002-10-3264
- Gelsi-Boyer, V., Trouplin, V., Adélaïde, J., Bonansea, J., Cervera, N., Carubbia, N., ... Birnbaum, D. (2009). Mutations of polycomb-associated gene ASXL1 in myelodysplastic syndromes and chronic myelomonocytic leukaemia. *British Journal of Haematology*, *145*(6), 788-800. doi:10.1111/j.1365-2141.2009.07697.x
- Georgantas, R. W., Hildreth, R., Morisot, S., Alder, J., Liu, C., Heimfeld, S., ... Civin, C. I. (2007). CD34+ hematopoietic stem-progenitor cell microRNA expression and function: a circuit diagram of differentiation control. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *104*(8), 2750-5. doi:10.1073/pnas.0610983104
- Germing, U., Hildebrandt, B., Pfeilstöcker, M., Nösslinger, T., Valent, P., Fonatsch, C., ... Aul, C. (2005). Refinement of the international prognostic scoring system (IPSS) by including LDH as an additional prognostic variable to improve risk assessment in patients with primary myelodysplastic syndromes (MDS). *Leukemia*, *19*(12), 2223-31. doi:10.1038/sj.leu.2403963
- Germing, U., Strupp, C., Kuendgen, A., Isa, S., Knipp, S., Hildebrandt, B., ... Haas, R. (2006). Prospective validation of the WHO proposals for the classification of myelodysplastic syndromes. *Haematologica*, *91*(12), 1596-604. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17145595>
- Germing, U., Strupp, C., Kündgen, A., Bowen, D., Aul, C., Haas, R., & Gattermann, N. (2004). No increase in age-specific incidence of myelodysplastic syndromes. *Haematologica*, *89*(8), 905-10. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15339672>

- Gerson, S. L. (2002). Clinical relevance of MGMT in the treatment of cancer. *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*, 20(9), 2388-99. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11981013>
- Gersuk, G. M., Beckham, C., Loken, M. R., Kiener, P., Anderson, J. E., Farrand, A., ... Deeg, H. J. (1998). A role for tumour necrosis factor-alpha, Fas and Fas-Ligand in marrow failure associated with myelodysplastic syndrome. *British Journal of Haematology*, 103(1), 176-88. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9792306>
- Giagounidis, A. A. N., Germing, U., Haase, S., Hildebrandt, B., Schlegelberger, B., Schoch, C., ... Aul, C. (2004). Clinical, morphological, cytogenetic, and prognostic features of patients with myelodysplastic syndromes and del(5q) including band q31. *Leukemia*, 18(1), 113-9. doi:10.1038/sj.leu.2403189
- Golub, T. R., Barker, G. F., Lovett, M., & Gilliland, D. G. (1994). Fusion of PDGF receptor beta to a novel ets-like gene, tel, in chronic myelomonocytic leukemia with t(5;12) chromosomal translocation. *Cell*, 77(2), 307-16. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8168137>
- Gonçalves, A. C., Alves, V., Silva, T., Carvalho, C., Oliveira, C. R. de, & Sarmiento-Ribeiro, A. B. (2013). Oxidative stress mediates apoptotic effects of ascorbate and dehydroascorbate in human Myelodysplasia cells in vitro. *Toxicology in Vitro: An International Journal Published in Association with BIBRA*, 27(5), 1542-9. doi:10.1016/j.tiv.2013.03.009
- Gonçalves, A. C., Cortesão, E., Espadana, A. I., Rito, L., Magalhães, E., Lobão, M. J., ... Sarmiento-Ribeiro, A. B. (2010). Mnsod ALA(16)VAL polymorfism as a risk marker for myelodysplastic syndrome? *Haematologica*, 95, 559. Retrieved from <http://www.embase.com/search/results?subaction=viewrecord&from=export&id=L70307567>
[http://www.haematologica.org/cgi/reprint/95/sup/nhttp://elvis.uv.uu.nl:9003/vulink?sid=EMBASE&issn=03906078&id=doi:&title=Mnsod+ALA\(16\)VAL+polymorfism+as+a+risk+marker+for+myelodysplastic+syndrome?&stitle=Haematologica&title=Haematologica&volume=95&issue=&spage=559&epage=&aulast=Gonçalves&aufirst=A.C.&auinit=A.C.&aufull=Gonçalves+A.C.&coden=&isbn=&pages=559-&date=2010&auinit1=A&auinitm=C](http://www.haematologica.org/cgi/reprint/95/sup/nhttp://elvis.uv.uu.nl:9003/vulink?sid=EMBASE&issn=03906078&id=doi:&title=Mnsod+ALA(16)VAL+polymorfism+as+a+risk+marker+for+myelodysplastic+syndrome?&stitle=Haematologica&title=Haematologica&volume=95&issue=&spage=559&epage=&aulast=Gonçalves&aufirst=A.C.&auinit=A.C.&aufull=Gonçalves+A.C.&coden=&isbn=&pages=559-&date=2010&auinit1=A&auinitm=C)
- Gorbsky, G. J., Kallio, M., Daum, J. R., & Topper, L. M. (1999). Protein dynamics at the kinetochore: cell cycle regulation of the metaphase to anaphase transition. *FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 13 Suppl 2, S231-4. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10619133>
- Gore, S. D. (2005). Combination therapy with DNA methyltransferase inhibitors in hematologic malignancies. *Nature Clinical Practice. Oncology*, 2 Suppl 1, S30-5. doi:10.1038/nponc0346
- Gorman, A. M., Samali, A., McGowan, A. J. & Cotter, T. G. (1997). Use of flow cytometry techniques in studying mechanisms of apoptosis in leukemic cells. *Cytometry*, 29, 97-105.
- Goto, T., Mizukami, H., Shirahata, A., Sakata, M., Saito, M., Ishibashi, K., ... Hibi, K. (2009). Aberrant methylation of the p16 gene is frequently detected in advanced colorectal cancer. *Anticancer Research*, 29(1), 275-7. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19331161>
- Greenberg, P. L. (1998). Apoptosis and its role in the myelodysplastic syndromes: implications for disease natural history and treatment. *Leukemia Research*, 22(12), 1123-36. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9922076>
- Greenberg, P. L., Tuechler, H., Schanz, J., Sanz, G., Garcia-Manero, G., Solé, F., ... Haase, D. (2012). Revised international prognostic scoring system for myelodysplastic syndromes. *Blood*, 120(12), 2454-65. doi:10.1182/blood-2012-03-420489
- Greenberg, P., Cox, C., LeBeau, M. M., Fenaux, P., Morel, P., Sanz, G., ... Bennett, J. (1997). International scoring system for evaluating prognosis in myelodysplastic syndromes. *Blood*, 89(6), 2079-88. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9058730>
- Gross, A., McDonnell, J. M., & Korsmeyer, S. J. (1999). BCL-2 family members and the mitochondria in apoptosis. *Genes & Development*, 13(15), 1899-911. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10444588>

- Grossmann, V., Tiacci, E., Holmes, A. B., Kohlmann, A., Martelli, M. P., Kern, W., ... Falini, B. (2011). Whole-exome sequencing identifies somatic mutations of BCOR in acute myeloid leukemia with normal karyotype. *Blood*, *118*(23), 6153-63. doi:10.1182/blood-2011-07-365320
- Grövdal, M., Khan, R., Aggerholm, A., Antunovic, P., Astermark, J., Bernell, P., ... Hellström-Lindberg, E. (2007). Negative effect of DNA hypermethylation on the outcome of intensive chemotherapy in older patients with high-risk myelodysplastic syndromes and acute myeloid leukemia following myelodysplastic syndrome. *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, *13*(23), 7107-12. doi:10.1158/1078-0432.CCR-07-1193
- Guillem, V. M., Collado, M., Terol, M. J., Calasanz, M. J., Esteve, J., Gonzalez, M., ... Tormo, M. (2007). Role of MTHFR (677, 1298) haplotype in the risk of developing secondary leukemia after treatment of breast cancer and hematological malignancies. *Leukemia*, *21*(7), 1413-22. doi:10.1038/sj.leu.2404709
- Guo, J., Burger, M., Nimmrich, I., Maier, S., Becker, E., Genc, B., ... Caldwell, C. W. (2005). Differential DNA methylation of gene promoters in small B-cell lymphomas. *American Journal of Clinical Pathology*, *124*(3), 430-9. doi:10.1309/LCGN-V77J-464L-NFD6
- Gustafson, K. S., Furth, E. E., Heitjan, D. F., Fansler, Z. B., & Clark, D. P. (2004). DNA methylation profiling of cervical squamous intraepithelial lesions using liquid-based cytology specimens: an approach that utilizes receiver-operating characteristic analysis. *Cancer*, *102*(4), 259-68. doi:10.1002/cncr.20425
- Haase, D. (2008). Cytogenetic features in myelodysplastic syndromes. *Annals of Hematology*, *87*(7), 515-26. doi:10.1007/s00277-008-0483-y
- Haase, D., Germing, U., Schanz, J., Pfeilstöcker, M., Nösslinger, T., Hildebrandt, B., ... Steidl, C. (2007). New insights into the prognostic impact of the karyotype in MDS and correlation with subtypes: evidence from a core dataset of 2124 patients. *Blood*, *110*(13), 4385-95. doi:10.1182/blood-2007-03-082404
- Hake, S. B., Xiao, A., & Allis, C. D. (2004). Linking the epigenetic "language" of covalent histone modifications to cancer. *British Journal of Cancer*, *90*(4), 761-9. doi:10.1038/sj.bjc.6601575
- Haluska, P., Dy, G. K., & Adjei, A. A. (2002). Farnesyl transferase inhibitors as anticancer agents. *European Journal of Cancer (Oxford, England: 1990)*, *38*(13), 1685-700. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12175684>
- Harada, H., Harada, Y., Tanaka, H., Kimura, A., & Inaba, T. (2003). Implications of somatic mutations in the AML1 gene in radiation-associated and therapy-related myelodysplastic syndrome/acute myeloid leukemia. *Blood*, *101*(2), 673-80. doi:10.1182/blood-2002-04-1010
- Haroun, R. A.-H., Zakhary, N. I., Mohamed, M. R., Abdelrahman, A. M., Kandil, E. I., & Shalaby, K. A. (2014). Assessment of the prognostic value of methylation status and expression levels of FHIT, GSTP1 and p16 in non-small cell lung cancer in Egyptian patients. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention: APJCP*, *15*(10), 4281-7. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24935385>
- Harris, N. L., Jaffe, E. S., Diebold, J., Flandrin, G., Muller-Hermelink, H. K., Vardiman, J., ... Bloomfield, C. D. (2000). The World Health Organization classification of hematological malignancies report of the Clinical Advisory Committee Meeting, Airlie House, Virginia, November 1997. *Modern Pathology: An Official Journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc*, *13*(2), 193-207. doi:10.1038/modpathol.3880035
- Hashibe, M., Brennan, P., Strange, R. C., Bhisey, R., Cascorbi, I., Lazarus, P., ... Boffetta, P. (2003). Meta- and pooled analyses of GSTM1, GSTT1, GSTP1, and CYP1A1 genotypes and risk of head and neck cancer. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention: A Publication of the American Association for Cancer Research, Cosponsored by the American Society of Preventive Oncology*, *12*(12), 1509-17. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14693745>
- Hatfield, S., & Ruohola-Baker, H. (2008). microRNA and stem cell function. *Cell and Tissue Research*, *331*(1), 57-66. doi:10.1007/s00441-007-0530-3

- Hellström-Lindberg, E. (2008). Myelodysplastic syndromes: an historical perspective. Hematology / the Education Program of the American Society of Hematology. *American Society of Hematology. Education Program*, 42. doi:10.1182/asheducation-2008.1.42
- Hellström-Lindberg, E., Kanter-Lewensohn, L., & Ost, A. (1997). Morphological changes and apoptosis in bone marrow from patients with myelodysplastic syndromes treated with granulocyte-CSF and erythropoietin. *Leukemia Research*, 21(5), 415-25. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9225069>
- Herman, J. G., & Baylin, S. B. (2003). Gene silencing in cancer in association with promoter hypermethylation. *The New England Journal of Medicine*, 349(21), 2042-2054. doi:10.1056/NEJMra023075
- Herman, J. G., Graff, J. R., Myöhänen, S., Nelkin, B. D. & Baylin, S. B. Methylation-specific PCR: a novel PCR assay for methylation status of CpG islands. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 93, 9821-9826 (1996).
- Hinds, M. G., Lackmann, M., Skea, G. L., Harrison, P. J., Huang, D. C. S., & Day, C. L. (2003). The structure of Bcl-w reveals a role for the C-terminal residues in modulating biological activity. *The EMBO Journal*, 22(7), 1497-507. doi:10.1093/emboj/cdg144
- Hirai, H. (2003). Molecular mechanisms of myelodysplastic syndrome. *Japanese Journal of Clinical Oncology*, 33(4), 153-60. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12810828>
- Hoefsloot, L. H., van Amelsvoort, M. P., Broeders, L. C., van der Plas, D. C., van Lom, K., Hoogerbrugge, H., ... Löwenberg, B. (1997). Erythropoietin-induced activation of STAT5 is impaired in the myelodysplastic syndrome. *Blood*, 89(5), 1690-700. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9057652>
- Hofmann, 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(11), 1347-53. doi:10.1016/j.leukres.2006.03.015
- Holler, N., Zaru, R., Micheau, O., Thome, M., Attinger, A., Valitutti, S., ... Tschopp, J. (2000). Fas triggers an alternative, caspase-8-independent cell death pathway using the kinase RIP as effector molecule. *Nature Immunology*, 1(6), 489-95. doi:10.1038/82732
- Hoover, R. R., Mahon, F.-X., Melo, J. V., & Daley, G. Q. (2002). Overcoming STI571 resistance with the farnesyl transferase inhibitor SCH66336. *Blood*, 100(3), 1068-71. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12130526>
- Hopfer, O., Komor, M., Koehler, I. S., Freitag, C., Schulze, M., Hoelzer, D., ... Hofmann, W.-K. (2009). Aberrant promoter methylation in MDS hematopoietic cells during in vitro lineage specific differentiation is differently associated with DNMT isoforms. *Leukemia Research*, 33(3), 434-42. doi:10.1016/j.leukres.2008.08.014
- Horrigan, S. K., Arbieva, Z. H., Xie, H. Y., Kravarusic, J., Fulton, N. C., Naik, H., ... Westbrook, C. A. (2000). Delineation of a minimal interval and identification of 9 candidates for a tumor suppressor gene in malignant myeloid disorders on 5q31. *Blood*, 95(7), 2372-7. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10733509>
- Hsu, Y. T., Wolter, K. G., & Youle, R. J. (1997). Cytosol-to-membrane redistribution of Bax and Bcl-X(L) during apoptosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94(8), 3668-72. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=20498&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Hu, Q., Dey, A. L., Yang, Y., Shen, Y., Jilani, I. B., Estey, E. H., ... Albitar, M. (2004). Soluble vascular endothelial growth factor receptor 1, and not receptor 2, is an independent prognostic factor in acute myeloid leukemia and myelodysplastic syndromes. *Cancer*, 100(9), 1884-91. doi:10.1002/cncr.20187
- Ingram, W., Lea, N. C., Cervera, J., Germing, U., Fenaux, P., Cassinat, B., ... Mufti, G. J. (2006). The JAK2 V617F mutation identifies a subgroup of MDS patients with isolated deletion 5q and a proliferative bone marrow. *Leukemia*, 20(7), 1319-21. doi:10.1038/sj.leu.2404215

- Invernizzi, R., Travaglino, E., Lunghi, M., Klersy, C., Bernasconi, P., Cazzola, M., & Ascari, E. (2004). Survivin expression in acute leukemias and myelodysplastic syndromes. *Leukemia & Lymphoma*, *45*(11), 2229-37. doi:10.1080/10428190412331283251
- Isobe, M., Emanuel, B. S., Givol, D., Oren, M., & Croce, C. M. (n.d.). Localization of gene for human p53 tumour antigen to band 17p13. *Nature*, *320*(6057), 84-5. doi:10.1038/320084a0
- Issa, J.-P. J. (2013). The myelodysplastic syndrome as a prototypical epigenetic disease. *Blood*, *121*(19), 3811-3817. doi:10.1182/blood-2013-02-451757
- Itzykson, R., Kosmider, O., Cluzeau, T., Mansat-De Mas, V., Dreyfus, F., Beyne-Rauzy, O., ... Fontenay, M. (2011). Impact of TET2 mutations on response rate to azacitidine in myelodysplastic syndromes and low blast count acute myeloid leukemias. *Leukemia*, *25*(7), 1147-52. doi:10.1038/leu.2011.71
- Izutsu, K., Kurokawa, M., Imai, Y., Maki, K., Mitani, K., & Hirai, H. (2001). The corepressor CtBP interacts with Evi-1 to repress transforming growth factor beta signaling. *Blood*, *97*(9), 2815-22. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11313276>
- Jabbour, E., Kantarjian, H., & Cortes, J. (2004). Clinical activity of farnesyl transferase inhibitors in hematologic malignancies: possible mechanisms of action. *Leukemia & Lymphoma*, *45*(11), 2187-95. doi:10.1080/10428190412331272677
- Jang, H., Mason, J. B., & Choi, S.-W. (2005). Genetic and epigenetic interactions between folate and aging in carcinogenesis. *The Journal of Nutrition*, *135*(12 Suppl), 2967S-2971S. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16317156>
- Jänicke, R. U., Sohn, D., & Schulze-Osthoff, K. (2008). The dark side of a tumor suppressor: antiapoptotic p53. *Cell Death and Differentiation*, *15*(6), 959-76. doi:10.1038/cdd.2008.33
- Jawad, M., Seedhouse, C. H., Russell, N., & Plumb, M. (2006). Polymorphisms in human homeobox HLX1 and DNA repair RAD51 genes increase the risk of therapy-related acute myeloid leukemia. *Blood*, *108*(12), 3916-8. doi:10.1182/blood-2006-05-022921
- Jiang, Y., Dunbar, A., Gondek, L. P., Mohan, S., Rataul, M., O'Keefe, C., ... Maciejewski, J. P. (2009). Aberrant DNA methylation is a dominant mechanism in MDS progression to AML. *Blood*, *113*(6), 1315-25. doi:10.1182/blood-2008-06-163246
- Johansson, M., Appleby, P. N., Allen, N. E., Travis, R. C., Roddam, A. W., Egevad, L., ... Key, T. J. (2008). Circulating concentrations of folate and vitamin B12 in relation to prostate cancer risk: results from the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition study. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention: A Publication of the American Association for Cancer Research, Cosponsored by the American Society of Preventive Oncology*, *17*(2), 279-85. doi:10.1158/1055-9965.EPI-07-0657
- Johnson, E. J., Scherer, S. W., Osborne, L., Tsui, L. C., Oscier, D., Mould, S., & Cotter, F. E. (1996). Molecular definition of a narrow interval at 7q22.1 associated with myelodysplasia. *Blood*, *87*(9), 3579-86. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8611680>
- Jonášová, A., Neuwirtová, R., Cermák, J., Vozobulová, V., Mociková, K., Sisková, M., & Hochová, I. (1998). Cyclosporin A therapy in hypoplastic MDS patients and certain refractory anaemias without hypoplastic bone marrow. *British Journal of Haematology*, *100*(2), 304-9. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9488617>
- Jones, L. K., & Saha, V. (2002). Chromatin modification, leukaemia and implications for therapy. *British Journal of Haematology*, *118*(3), 714-727. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12181038>
- Jones, P. A. (1999). The DNA methylation paradox. *Trends in Genetics: TIG*, *15*(1), 34-7. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10087932>
- Jones, P. A. (2002). DNA methylation and cancer. *Oncogene*, *21*(35), 5358-60. doi:10.1038/sj.onc.1205597
- Jones, P. A., & Baylin, S. B. (2002). The fundamental role of epigenetic events in cancer. *Nature Reviews: Genetics*, *3*(6), 415-28. doi:10.1038/nrg816
- Jones, P. A., & Laird, P. W. (1999). Cancer epigenetics comes of age. *Nature Genetics*, *21*(2), 163-7. doi:10.1038/5947

- Jordan, C. T., Upchurch, D., Szilvassy, S. J., Guzman, M. L., Howard, D. S., Pettigrew, A. L., ... Phillips, G. L. (2000). The interleukin-3 receptor alpha chain is a unique marker for human acute myelogenous leukemia stem cells. *Leukemia*, *14*(10), 1777-84. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11021753>
- Joslin, J. M., Fernald, A. A., Tennant, T. R., Davis, E. M., Kogan, S. C., Anastasi, J., ... Le Beau, M. M. (2007). Haploinsufficiency of EGR1, a candidate gene in the del(5q), leads to the development of myeloid disorders. *Blood*, *110*(2), 719-26. doi:10.1182/blood-2007-01-068809
- Jotterand Bellomo, M., Parlier, V., Mühlematter, D., Grob, J. P., & Beris, P. (1992). Three new cases of chromosome 3 rearrangement in bands q21 and q26 with abnormal thrombopoiesis bring further evidence to the existence of a 3q21q26 syndrome. *Cancer Genetics and Cytogenetics*, *59*(2), 138-60. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1581880>
- Kanchan, K., & Loughran, T. P. (2003). Antigen-driven clonal T cell expansion in disorders of hematopoiesis. *Leukemia Research*, *27*(4), 291-2. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12531218>
- Katzenellenbogen, R. A., Baylin, S. B., & Herman, J. G. (1999). Hypermethylation of the DAP-kinase CpG island is a common alteration in B-cell malignancies. *Blood*, *93*(12), 4347-53. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10361133>
- Kawakita, M., Yonemura, Y., Miyake, H., Ohkubo, T., Asou, N., Hayakawa, K., ... Takatsuki, K. (1995). Soluble c-kit molecule in serum from healthy individuals and patients with haemopoietic disorders. *British Journal of Haematology*, *91*(1), 23-9. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7577639>
- Kawankar, N., & Vundinti, B. R. (2011). Cytogenetic abnormalities in myelodysplastic syndrome: an overview. *Hematology (Amsterdam, Netherlands)*, *16*(3), 131-8. doi:10.1179/102453311X12940641877966
- Kerbaui, D. B., & Deeg, H. J. (2007). Apoptosis and antiapoptotic mechanisms in the progression of myelodysplastic syndrome. *Experimental Hematology*, *35*(11), 1739-46. doi:10.1016/j.exphem.2007.09.007
- Kerbaui, D. M. B., Lesnikov, V., Abbasi, N., Seal, S., Scott, B., & Deeg, H. J. (2005). NF-kappaB and FLIP in arsenic trioxide (ATO)-induced apoptosis in myelodysplastic syndromes (MDSs). *Blood*, *106*(12), 3917-25. doi:10.1182/blood-2005-04-1424
- 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. doi:10.1053/j.seminhematol.2013.01.001
- Killick, S. B., Mufti, G., Cavenagh, J. D., Mijovic, A., Peacock, J. L., Gordon-Smith, E. C., ... Marsh, J. C. W. (2003). A pilot study of antithymocyte globulin (ATG) in the treatment of patients with "low-risk" myelodysplasia. *British Journal of Haematology*, *120*(4), 679-84. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12588356>
- Kim, H. N., Kim, Y.-K., Lee, I.-K., Yang, D.-H., Lee, J.-J., Shin, M.-H., ... Kim, H.-J. (2009). Association between polymorphisms of folate-metabolizing enzymes and hematological malignancies. *Leukemia Research*, *33*(1), 82-7. doi:10.1016/j.leukres.2008.07.026
- Kim, Y.-I. (2005). 5,10-Methylenetetrahydrofolate reductase polymorphisms and pharmacogenetics: a new role of single nucleotide polymorphisms in the folate metabolic pathway in human health and disease. *Nutrition Reviews*, *63*(11), 398-407. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16370225>
- Kitagawa, M., Yamaguchi, S., Takahashi, M., Tanizawa, T., Hirokawa, K., & Kamiyama, R. (1998). Localization of Fas and Fas ligand in bone marrow cells demonstrating myelodysplasia. *Leukemia*, *12*(4), 486-92. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9557605>
- Ko, M., Huang, Y., Jankowska, A. M., Pape, U. J., Tahiliani, M., Bandukwala, H. S., ... Rao, A. (2010). Impaired hydroxylation of 5-methylcytosine in myeloid cancers with mutant TET2. *Nature*, *468*(7325), 839-43. doi:10.1038/nature09586

- Kochenderfer, J. N., Kobayashi, S., Wieder, E. D., Su, C., & Molldrem, J. J. (2002). Loss of T-lymphocyte clonal dominance in patients with myelodysplastic syndrome responsive to immunosuppression. *Blood*, *100*(10), 3639-45. doi:10.1182/blood-2002-01-0155
- Kosmider, O., Gelsi-Boyer, V., Cheok, M., Grabar, S., Della-Valle, V., Picard, F., ... Fontenay, M. (2009). TET2 mutation is an independent favorable prognostic factor in myelodysplastic syndromes (MDSs). *Blood*, *114*(15), 3285-91. doi:10.1182/blood-2009-04-215814
- Kraemer, D., Wozniak, R. W., Blobel, G., & Radu, A. (1994). The human CAN protein, a putative oncogene product associated with myeloid leukemogenesis, is a nuclear pore complex protein that faces the cytoplasm. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *91*(4), 1519-23. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=43191&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Kraguljac Kurtović, N., Krajnović, M., Bogdanović, A., Suvajdžić, N., Jovanović, J., Dimitrijević, B., ... Krtolica, K. (2012). Concomitant aberrant methylation of p15 and MGMT genes in acute myeloid leukemia: association with a particular immunophenotype of blast cells. *Medical Oncology (Northwood, London, England)*, *29*(5), 3547-3556. doi:10.1007/s12032-012-0289-6
- Krajnović, M., Radojković, M., Davidović, R., Dimitrijević, B., & Krtolica, K. (2013). Prognostic significance of epigenetic inactivation of p16, p15, MGMT and DAPK genes in follicular lymphoma. *Medical Oncology (Northwood, London, England)*, *30*(1), 441. doi:10.1007/s12032-012-0441-3
- Kreuziger, L. M. B., Porcher, J. C., Ketterling, R. P., & Steensma, D. P. (2007). An MLL-SEPT9 fusion and t(11;17)(q23;q25) associated with de novo myelodysplastic syndrome. *Leukemia Research*, *31*(8), 1145-8. doi:10.1016/j.leukres.2006.12.006
- Kristinsson, S. Y., Björkholm, M., Hultcrantz, M., Derolf, Å. R., Landgren, O., & Goldin, L. R. (2011). Chronic immune stimulation might act as a trigger for the development of acute myeloid leukemia or myelodysplastic syndromes. *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*, *29*(21), 2897-903. doi:10.1200/JCO.2011.34.8540
- Lai, J. L., Preudhomme, C., Zandecki, M., Flactif, M., Vanrumbeke, M., Lepelley, P., ... Fenaux, P. (1995). Myelodysplastic syndromes and acute myeloid leukemia with 17p deletion. An entity characterized by specific dysgranulopoiesis and a high incidence of P53 mutations. *Leukemia*, *9*(3), 370-81. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7885035>
- Lancet, J. E., & Karp, J. E. (2003a). Farnesyl transferase inhibitors in myeloid malignancies. *Blood Reviews*, *17*(3), 123-9. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12818222>
- Lancet, J. E., & Karp, J. E. (2003b). Farnesyltransferase inhibitors in hematologic malignancies: new horizons in therapy. *Blood*, *102*(12), 3880-9. doi:10.1182/blood-2003-02-0633
- Langemeijer, S. M. C., Kuiper, R. P., Berends, M., Knops, R., Aslanyan, M. G., Massop, M., ... Jansen, J. H. (2009). Acquired mutations in TET2 are common in myelodysplastic syndromes. *Nature Genetics*, *41*(7), 838-42. doi:10.1038/ng.391
- Lee, J. C., Lee, W. H., Min, Y. J., Cha, H. J., Han, M. W., Chang, H. W., ... Kim, S. Y. (2014). Development of TRAIL resistance by radiation-induced hypermethylation of DR4 CpG island in recurrent laryngeal squamous cell carcinoma. *International Journal of Radiation Oncology, Biology, Physics*, *88*(5), 1203-11. doi:10.1016/j.ijrobp.2013.12.016
- Lehmann, U., Brakensiek, K., & Kreipe, H. (2004). Role of epigenetic changes in hematological malignancies. *Annals of Hematology*, *83*(3), 137-52. doi:10.1007/s00277-003-0798-7
- Lehmann, U., Celikkaya, G., Hasemeier, B., Länger, F., & Kreipe, H. (2002). Promoter hypermethylation of the death-associated protein kinase gene in breast cancer is associated with the invasive lobular subtype. *Cancer Research*, *62*(22), 6634-8. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12438260>
- Lepelley, P., Campergue, L., Gardel, N., Preudhomme, C., Cosson, A., & Fenaux, P. (1996). Is apoptosis a massive process in myelodysplastic syndromes? *British Journal of Haematology*, *95*(2), 368-71. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8904894>

- Ley, T. J., Ding, L., Walter, M. J., McLellan, M. D., Lamprecht, T., Larson, D. E., ... Wilson, R. K. (2010). DNMT3A mutations in acute myeloid leukemia. *The New England Journal of Medicine*, *363*(25), 2424-33. doi:10.1056/NEJMoa1005143
- Li, B., Xu, Z., Gale, R. P., Qin, T., Zhang, Y., & Xiao, Z. (2013). Serum ferritin is an independent prognostic factor in Chinese with myelodysplastic syndromes classified as IPSS Intermediate-1. *Acta Haematologica*, *129*(4), 243-50. doi:10.1159/000345428
- Li, X., Bryant, C. E., & Deeg, H. J. (2004). Simultaneous demonstration of clonal chromosome abnormalities and apoptosis in individual marrow cells in myelodysplastic syndrome. *International Journal of Hematology*, *80*(2), 140-5. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15481442>
- Liang, H., Fairman, J., Claxton, D. F., Nowell, P. C., Green, E. D., & Nagarajan, L. (1998). Molecular anatomy of chromosome 7q deletions in myeloid neoplasms: evidence for multiple critical loci. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *95*(7), 3781-5. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=19914&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Liesveld, J. L., Jordan, C. T. & Phillips, G. L. (2004). The hematopoietic stem cell in myelodysplasia. *Stem Cells*, *22*, 590-9.
- Lin, J., Yao, D., Qian, J., Wang, Y., Han, L., Jiang, Y., ... Chen, Z. (2008). Methylation status of fragile histidine triad (FHIT) gene and its clinical impact on prognosis of patients with myelodysplastic syndrome. *Leukemia Research*, *32*(10), 1541-5. doi:10.1016/j.leukres.2008.02.008
- Lin, Y., Hupp, T. R., & Stevens, C. (2010). Death-associated protein kinase (DAPK) and signal transduction: additional roles beyond cell death. *The FEBS Journal*, *277*(1), 48-57. doi:10.1111/j.1742-4658.2009.07411.x
- Liu, T. X., Becker, M. W., Jelinek, J., Wu, W.-S., Deng, M., Mikhalkevich, N., ... Look, A. T. (2007). Chromosome 5q deletion and epigenetic suppression of the gene encoding alpha-catenin (CTNNA1) in myeloid cell transformation. *Nature Medicine*, *13*(1), 78-83. doi:10.1038/nm1512
- Liu, X., Kim, C. N., Yang, J., Jemmerson, R., & Wang, X. (1996). Induction of apoptotic program in cell-free extracts: requirement for dATP and cytochrome c. *Cell*, *86*(1), 147-57. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8689682>
- Lodish, H. F., Hilton, D. J., Klingmüller, U., Watowich, S. S., & Wu, H. (1995). The erythropoietin receptor: biogenesis, dimerization, and intracellular signal transduction. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, *60*, 93-104. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8824381>
- Lübbert, M., Rüter, B. H., Claus, R., Schmoor, C., Schmid, M., Germing, U., ... Döhner, H. (2012). A multicenter phase II trial of decitabine as first-line treatment for older patients with acute myeloid leukemia judged unfit for induction chemotherapy. *Haematologica*, *97*(3), 393-401. doi:10.3324/haematol.2011.048231
- Lund, A. H., & van Lohuizen, M. (2004). Epigenetics and cancer. *Genes & Development*, *18*(19), 2315-35. doi:10.1101/gad.1232504
- Ma, W., Kantarjian, H., Zhang, K., Zhang, X., Wang, X., Chen, C., ... Albitar, M. (2010). Significant association between polymorphism of the erythropoietin gene promoter and myelodysplastic syndrome. *BMC Medical Genetics*, *11*, 163. doi:10.1186/1471-2350-11-163
- Ma, X. (2012). Epidemiology of myelodysplastic syndromes. *The American Journal of Medicine*, *125*(7 Suppl), S2-5. doi:10.1016/j.amjmed.2012.04.014
- Ma, X., Does, M., Raza, A., & Mayne, S. T. (2007). Myelodysplastic syndromes: incidence and survival in the United States. *Cancer*, *109*(8), 1536-42. doi:10.1002/cncr.22570
- Ma, X., Selvin, S., Raza, A., Foti, K., & Mayne, S. T. (2007). Clustering in the incidence of myelodysplastic syndromes. *Leukemia Research*, *31*(12), 1683-6. doi:10.1016/j.leukres.2007.03.032

- MacFarlane, M., Ahmad, M., Srinivasula, S. M., Fernandes-Alnemri, T., Cohen, G. M., & Alnemri, E. S. (1997). Identification and molecular cloning of two novel receptors for the cytotoxic ligand TRAIL. *The Journal of Biological Chemistry*, 272(41), 25417-20. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9325248>
- Makishima, H., Visconte, V., Sakaguchi, H., Jankowska, A. M., Abu Kar, S., Jerez, A., ... Maciejewski, J. P. (2012). Mutations in the spliceosome machinery, a novel and ubiquitous pathway in leukemogenesis. *Blood*, 119(14), 3203-10. doi:10.1182/blood-2011-12-399774
- Malcovati, L. Impact of transfusion dependency and secondary iron overload on the survival of patients with myelodysplastic syndromes. *Leuk. Res.*, 31, Suppl 3, S2-6 (2007).
- Malcovati, L., Della Porta, M. G., Pietra, D., Boveri, E., Pellagatti, A., Galli, A., ... Cazzola, M. (2009). Molecular and clinical features of refractory anemia with ringed sideroblasts associated with marked thrombocytosis. *Blood*, 114(17), 3538-45. doi:10.1182/blood-2009-05-222331
- Malcovati, L., Germing, U., Kuendgen, A., Della Porta, M. G., Pascutto, C., Invernizzi, R., ... Cazzola, M. (2007). Time-dependent prognostic scoring system for predicting survival and leukemic evolution in myelodysplastic syndromes. *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*, 25(23), 3503-10. doi:10.1200/JCO.2006.08.5696
- Malcovati, L., Porta, M. G. Della, Pascutto, C., Invernizzi, R., Boni, M., Travaglini, E., ... Cazzola, M. (2005). Prognostic factors and life expectancy in myelodysplastic syndromes classified according to WHO criteria: a basis for clinical decision making. *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*, 23(30), 7594-603. doi:10.1200/JCO.2005.01.7038
- Margison, G. P., Povey, A. C., Kaina, B., & Santibáñez Koref, M. F. (2003). Variability and regulation of O6-alkylguanine-DNA alkyltransferase. *Carcinogenesis*, 24(4), 625-35. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12727789>
- Marsters, S. A., Sheridan, J. P., Pitti, R. M., Huang, A., Skubatch, M., Baldwin, D., ... Ashkenazi, A. (1997). A novel receptor for Apo2L/TRAIL contains a truncated death domain. *Current Biology: CB*, 7(12), 1003-6. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9382840>
- Martin, G. A., Viskochil, D., Bollag, G., McCabe, P. C., Crosier, W. J., Haubruck, H., ... Cawthon, R. M. (1990). The GAP-related domain of the neurofibromatosis type 1 gene product interacts with ras p21. *Cell*, 63(4), 843-9. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2121370>
- Matsuda, A., Yagasaki, F., Jinnai, I., Kusumoto, S., Murohashi, I., Bessho, M., & Hirashima, K. (1998). Trisomy 8 may not be related to the pathogenesis of myelodysplastic syndromes: disappearance of trisomy 8 in a patient with refractory anaemia without haematological improvement. *European Journal of Haematology*, 60(4), 260-1. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9579880>
- Mazières, J., Pradines, A., & Favre, G. (2003). [Farnesyl transferase inhibitors: one target may be found in another]. *Médecine Sciences: M/S*, 19(2), 211-6. doi:10.1051/medsci/2003192211
- McCabe, D. C., & Caudill, M. A. (2005). DNA methylation, genomic silencing, and links to nutrition and cancer. *Nutrition Reviews*, 63(6 Pt 1), 183-95. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16028562>
- McCubrey, J. A., & Demidenko, Z. N. (2012). Recent discoveries in the cycling, growing and aging of the p53 field. *Aging*, 4(12), 887-93. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3615156&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Merkel, D. G., & Nagler, A. (2014). Toward resolving the unsettled role of iron chelation therapy in myelodysplastic syndromes. *Expert Review of Anticancer Therapy*, 14(7), 817-29. doi:10.1586/14737140.2014.896208
- Mewawalla, P., & Dasanu, C. A. (2011). Immune alterations in untreated and treated myelodysplastic syndrome. *Expert Opinion on Drug Safety*, 10(3), 351-61. doi:10.1517/14740338.2011.534456

- Mezosi, E., Wang, S. H., Utsugi, S., Bajnok, L., Bretz, J. D., Gauger, P. G., ... Baker, J. R. (2004). Interleukin-1beta and tumor necrosis factor (TNF)-alpha sensitize human thyroid epithelial cells to TNF-related apoptosis-inducing ligand-induced apoptosis through increases in procaspase-7 and bid, and the down-regulation of p44/42 mitogen-activated prot. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 89(1), 250-7. doi:10.1210/jc.2003-030697
- Mhaweche, P., & Saleem, A. (2001). Myelodysplastic syndrome: review of the cytogenetic and molecular data. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, 40(3), 229-38. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11738946>
- Mihara, K., Takihara, Y., & Kimura, A. (2007). Genetic and epigenetic alterations in myelodysplastic syndrome. *Cytogenetic and Genome Research*, 118(2-4), 297-303. doi:10.1159/000108313
- Mishra, S., Zhang, B., Cunnick, J. M., Heisterkamp, N., & Groffen, J. (2006). Resistance to imatinib of bcr/abl p190 lymphoblastic leukemia cells. *Cancer Research*, 66(10), 5387-93. doi:10.1158/0008-5472.CAN-05-3058
- Miyazaki, T., & Reed, J. C. (2001). A GTP-binding adapter protein couples TRAIL receptors to apoptosis-inducing proteins. *Nature Immunology*, 2(6), 493-500. doi:10.1038/88684
- Mizuki, M., Schwable, J., Steur, C., Choudhary, C., Agrawal, S., Sargin, B., ... Serve, H. (2003). Suppression of myeloid transcription factors and induction of STAT response genes by AML-specific Flt3 mutations. *Blood*, 101(8), 3164-73. doi:10.1182/blood-2002-06-1677
- Mizuki, M., Ueda, S., Matsumura, I., Ishiko, J., Schwäble, J., Serve, H., & Kanakura, Y. (2003). Oncogenic receptor tyrosine kinase in leukemia. *Cellular and Molecular Biology (Noisy-Le-Grand, France)*, 49(6), 907-22. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14656048>
- Mochizuki, N., Shimizu, S., Nagasawa, T., Tanaka, H., Taniwaki, M., Yokota, J., & Morishita, K. (2000). A novel gene, MEL1, mapped to 1p36.3 is highly homologous to the MDS1/EVI1 gene and is transcriptionally activated in t(1;3)(p36;q21)-positive leukemia cells. *Blood*, 96(9), 3209-14. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11050005>
- Mokarram, P., Naghibalhossaini, F., Saberi Firoozi, M., Hosseini, S. V., Izadpanah, A., Salahi, H., ... Mojallal, M. (2008). Methylenetetrahydrofolate reductase C677T genotype affects promoter methylation of tumor-specific genes in sporadic colorectal cancer through an interaction with folate/vitamin B12 status. *World Journal of Gastroenterology: WJG*, 14(23), 3662-71. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2719229&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Molldrem, J. J., Leifer, E., Bahceci, E., Sauntharajah, Y., Rivera, M., Dunbar, C., ... Barrett, A. J. (2002). Antithymocyte globulin for treatment of the bone marrow failure associated with myelodysplastic syndromes. *Annals of Internal Medicine*, 137(3), 156-63. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12160363>
- Molnár, L., Berki, T., Hussain, A., Németh, P., & Losonczy, H. (2000). [The role of TNF-alpha in myelodysplastic syndrome: immunoserologic and immunohistochemical studies]. *Orvosi Hetilap*, 141(33), 1807-11. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10979309>
- Moon, J. H., Kim, S. N., Kang, B. W., Chae, Y. S., Kim, J. G., Baek, J. H., ... Sohn, S. K. (2010). Predictive value of pretreatment risk group and baseline LDH levels in MDS patients receiving azacitidine treatment. *Annals of Hematology*, 89(7), 681-9. doi:10.1007/s00277-010-0921-5
- Morgan, H. D., Dean, W., Coker, H. A., Reik, W., & Petersen-Mahrt, S. K. (2004). Activation-induced cytidine deaminase deaminates 5-methylcytosine in DNA and is expressed in pluripotent tissues: implications for epigenetic reprogramming. *The Journal of Biological Chemistry*, 279(50), 52353-60. doi:10.1074/jbc.M407695200
- Mrózek, K. (2008). Cytogenetic, molecular genetic, and clinical characteristics of acute myeloid leukemia with a complex karyotype. *Seminars in Oncology*, 35(4), 365-77. doi:10.1053/j.seminoncol.2008.04.007
- Mufti, G. J. (2004). Pathobiology, classification, and diagnosis of myelodysplastic syndrome. Best Practice & Research. *Clinical Haematology*, 17(4), 543-57. doi:10.1016/j.beha.2004.08.007

- Mulero-Navarro, S., & Esteller, M. (2008). Epigenetic biomarkers for human cancer: the time is now. *Critical Reviews in Oncology/hematology*, 68(1), 1-11. doi:10.1016/j.critrevonc.2008.03.001
- Nakayama, M., Wada, M., Harada, T., Nagayama, J., Kusaba, H., Ohshima, K., ... Kuwano, M. (1998). Hypomethylation status of CpG sites at the promoter region and overexpression of the human MDR1 gene in acute myeloid leukemias. *Blood*, 92(11), 4296-307. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9834236>
- Nakazaki, K., Nannya, Y., & Kurokawa, M. (2014). Distribution of serum erythropoietin levels in lower risk myelodysplastic syndrome cases with anemia. *International Journal of Hematology*, 99(1), 53-6. doi:10.1007/s12185-013-1485-7
- Nencioni, A., Grünebach, F., Patrone, F., Ballestrero, A., & Brossart, P. (2007). Proteasome inhibitors: antitumor effects and beyond. *Leukemia*, 21(1), 30-6. doi:10.1038/sj.leu.2404444
- Neumann, F., Gattermann, N., Barthelmes, H.-U., Haas, R., & Germing, U. (2009). Levels of beta 2 microglobulin have a prognostic relevance for patients with myelodysplastic syndrome with regard to survival and the risk of transformation into acute myelogenous leukemia. *Leukemia Research*, 33(2), 232-236. doi:10.1016/j.leukres.2008.06.003
- Nieda, M., Nicol, A., Koezuka, Y., Kikuchi, A., Lapteva, N., Tanaka, Y., ... Juji, T. (2001). TRAIL expression by activated human CD4(+)V alpha 24NKT cells induces in vitro and in vivo apoptosis of human acute myeloid leukemia cells. *Blood*, 97(7), 2067-74. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11264173>
- Niemeyer, C. M. (2002). Nanotechnology. Tools for the biomolecular engineer. *Science (New York, N.Y.)*, 297(5578), 62-3. doi:10.1126/science.1073843
- Niimi, H., Harada, H., Harada, Y., Ding, Y., Imagawa, J., Inaba, T., ... Kimura, A. (2006). Hyperactivation of the RAS signaling pathway in myelodysplastic syndrome with AML1/RUNX1 point mutations. *Leukemia*, 20(4), 635-44. doi:10.1038/sj.leu.2404136
- Nikoloski, G., Langemeijer, S. M. C., Kuiper, R. P., Knops, R., Massop, M., Tönnissen, E. R. L. T. M., ... Jansen, J. H. (2010). Somatic mutations of the histone methyltransferase gene EZH2 in myelodysplastic syndromes. *Nature Genetics*, 42(8), 665-7. doi:10.1038/ng.620
- Nilsson, L., Astrand-Grundström, I., Anderson, K., Arvidsson, I., Hokland, P., Bryder, D., ... Jacobsen, S. E. W. (2002). Involvement and functional impairment of the CD34(+)/CD38(-) Thy-1(+) hematopoietic stem cell pool in myelodysplastic syndromes with trisomy 8. *Blood*, 100(1), 259-67. doi:10.1182/blood-2001-12-0188
- Nimer, S. D. (2008a). MDS: a stem cell disorder-but what exactly is wrong with the primitive hematopoietic cells in this disease? Hematology / the Education Program of the American Society of Hematology. *American Society of Hematology. Education Program*, 43-51. doi:10.1182/asheducation-2008.1.43
- Nimer, S. D. (2008b). Myelodysplastic syndromes. *Blood*, 111(10), 4841-51. doi:10.1182/blood-2007-08-078139
- Nishino, H. T., & Chang, C.-C. (2005). Myelodysplastic syndromes: clinicopathologic features, pathobiology, and molecular pathogenesis. *Archives of Pathology & Laboratory Medicine*, 129(10), 1299-310. doi:10.1043/1543-2165(2005)129[1299:MSCFPA]2.0.CO;2
- Obaya, A. J., & Sedivy, J. M. (2002). Regulation of cyclin-Cdk activity in mammalian cells. *Cellular and Molecular Life Sciences: CMLS*, 59(1), 126-42. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11846025>
- Oh, S. T., & Gotlib, J. (2008). Antiangiogenic therapy in myelodysplastic syndromes: is there a role? *Current Hematologic Malignancy Reports*, 3(1), 10-8. doi:10.1007/s11899-008-0003-0
- Ohshima, K., Karube, K., Shimazaki, K., Kamma, H., Suzumiya, J., Hamasaki, M., & Kikuchi, M. (2003). Imbalance between apoptosis and telomerase activity in myelodysplastic syndromes: possible role in ineffective hemopoiesis. *Leukemia & Lymphoma*, 44(8), 1339-46. doi:10.1080/1042819031000083037
- Ohyashiki, J. H., Ohyashiki, K., Fujimura, T., Kawakubo, K., Shimamoto, T., Iwabuchi, A., & Toyama, K. (1994). Telomere shortening associated with disease evolution patterns in

- myelodysplastic syndromes. *Cancer Research*, 54(13), 3557-60. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8012981>
- Olnes, M. J., & Sloand, E. M. (2011). Targeting immune dysregulation in myelodysplastic syndromes. *JAMA: The Journal of the American Medical Association*, 305(8), 814-9. doi:10.1001/jama.2011.194
- Olsen, R. J., Dunphy, C. H., O'Malley, D. P., Rice, L., Ewton, A. A., & Chang, C.-C. (2008). The implication of identifying JAK2 (V617F) in myeloproliferative neoplasms and myelodysplastic syndromes with bone marrow fibrosis. *Journal of Hematopathology*, 1(2), 111-7. doi:10.1007/s12308-008-0014-8
- Oltvai, Z. N., Millman, C. L., & Korsmeyer, S. J. (1993). Bcl-2 heterodimerizes in vivo with a conserved homolog, Bax, that accelerates programmed cell death. *Cell*, 74(4), 609-19. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8358790>
- Ortega, J., & List, A. (2007). Immunomodulatory drugs in the treatment of myelodysplastic syndromes. *Current Opinion in Oncology*, 19(6), 656-9. doi:10.1097/CCO.0b013e3282f0e12b
- Owen-Schaub, L. B., Zhang, W., Cusack, J. C., Angelo, L. S., Santee, S. M., Fujiwara, T., ... Kruzel, E. (1995). Wild-type human p53 and a temperature-sensitive mutant induce Fas/APO-1 expression. *Molecular and Cellular Biology*, 15(6), 3032-40. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=230534&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Padró, T., Ruiz, S., Bieker, R., Bürger, H., Steins, M., Kienast, J., ... Mesters, R. M. (2000). Increased angiogenesis in the bone marrow of patients with acute myeloid leukemia. *Blood*, 95(8), 2637-44. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10753845>
- Padua, R. A., Guinn, B. A., Al-Sabah, A. I., Smith, M., Taylor, C., Pettersson, T., ... West, R. (1998). RAS, FMS and p53 mutations and poor clinical outcome in myelodysplasias: a 10-year follow-up. *Leukemia*, 12(6), 887-92. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9639416>
- Paiva, R. M. A., & Calado, R. T. (2014). Telomere dysfunction and hematologic disorders. *Progress in Molecular Biology and Translational Science*, 125, 133-57. doi:10.1016/B978-0-12-397898-1.00006-2
- Papaemmanuil, E., Cazzola, M., Boultonwood, J., Malcovati, L., Vyas, P., Bowen, D., ... Campbell, P. J. (2011). Somatic SF3B1 mutation in myelodysplasia with ring sideroblasts. *The New England Journal of Medicine*, 365(15), 1384-95. doi:10.1056/NEJMoa1103283
- Paquette, R. L., Landaw, E. M., Pierre, R. V., Kahan, J., Lübbert, M., Lazcano, O., ... Koeffler, H. P. (1993). N-ras mutations are associated with poor prognosis and increased risk of leukemia in myelodysplastic syndrome. *Blood*, 82(2), 590-9. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8329714>
- Parcells, B. W., Ikeda, A. K., Simms-Waldrip, T., Moore, T. B., & Sakamoto, K. M. (2006). FMS-like tyrosine kinase 3 in normal hematopoiesis and acute myeloid leukemia. *Stem Cells (Dayton, Ohio)*, 24(5), 1174-84. doi:10.1634/stemcells.2005-0519
- Park, U.-H., Yoon, S. K., Park, T., Kim, E.-J., & Um, S.-J. (2011). Additional sex comb-like (ASXL) proteins 1 and 2 play opposite roles in adipogenesis via reciprocal regulation of peroxisome proliferator-activated receptor γ . *The Journal of Biological Chemistry*, 286(2), 1354-63. doi:10.1074/jbc.M110.177816
- Parker, J. E., & Mufti, G. J. (2000). Excessive apoptosis in low risk myelodysplastic syndromes (MDS). *Leukemia & Lymphoma*, 40(1-2), 1-24. doi:10.3109/10428190009054877
- Parker, J. E., & Mufti, G. J. (2004). The myelodysplastic syndromes: a matter of life or death. *Ata Haematologica*, 111(1-2), 78-99. doi:10.1159/000074488
- Patel, J. P., Gönen, M., Figueroa, M. E., Fernandez, H., Sun, Z., Racevskis, J., ... Levine, R. L. (2012). Prognostic relevance of integrated genetic profiling in acute myeloid leukemia. *The New England Journal of Medicine*, 366(12), 1079-89. doi:10.1056/NEJMoa1112304
- Paulsson, K., Säll, T., Fioretos, T., Mitelman, F., & Johansson, B. (2001). The incidence of trisomy 8 as a sole chromosomal aberration in myeloid malignancies varies in relation to gender, age, prior iatrogenic genotoxic exposure, and morphology. *Cancer Genetics and Cytogenetics*, 130(2), 160-5. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11675138>

- Pellagatti, A., Jädersten, M., Forsblom, A.-M., Cattan, H., Christensson, B., Emanuelsson, E. K., ... Hellström-Lindberg, E. (2007). Lenalidomide inhibits the malignant clone and up-regulates the SPARC gene mapping to the commonly deleted region in 5q- syndrome patients. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *104*(27), 11406-11. doi:10.1073/pnas.0610477104
- Perera, F. P. (1997). Environment and cancer: who are susceptible? *Science (New York, N.Y.)*, *278*(5340), 1068-73. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9353182>
- Pfeilstöcker, M., Karlic, H., Nösslinger, T., Sperr, W., Stauder, R., Krieger, O., & Valent, P. (2007). Myelodysplastic syndromes, aging, and age: correlations, common mechanisms, and clinical implications. *Leukemia & Lymphoma*, *48*(10), 1900-9. doi:10.1080/10428190701534382
- Pisani, F. D., & Rainaldi, A. (2001). Management of high-risk myelodysplastic syndromes. *Critical Reviews in Oncology/hematology*, *40*(3), 215-28. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11738945>
- Poloni, A., Serrani, F., Berardinelli, E., Maurizi, G., Mariani, M., Costantini, B., ... Leoni, P. (2013). Telomere length, c-myc and mad-1 expression could represent prognosis markers of myelodysplastic syndrome. *Leukemia Research*, *37*(11), 1538-44. doi:10.1016/j.leukres.2013.07.022
- Preisler, H. D., Li, B., Chen, H., Fisher, L., Nayini, J., Raza, A., ... Venugopal, P. (2001). P15INK4B gene methylation and expression in normal, myelodysplastic, and acute myelogenous leukemia cells and in the marrow cells of cured lymphoma patients. *Leukemia*, *15*(10), 1589-95. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11587217>
- Preudhomme, C., Nisse, C., Hebbbar, M., Vanrumbeke, M., Brizard, A., Lai, J. L., & Fenaux, P. (1997). Glutathione S transferase theta 1 gene defects in myelodysplastic syndromes and their correlation with karyotype and exposure to potential carcinogens. *Leukemia*, *11*(9), 1580-2. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9305616>
- Quesnel, B., Guillermin, G., Vereecque, R., Wattel, E., Preudhomme, C., Bauters, F., ... Fenaux, P. (1998). Methylation of the p15(INK4b) gene in myelodysplastic syndromes is frequent and acquired during disease progression. *Blood*, *91*(8), 2985-90. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9531610>
- Quina, A. S., Buschbeck, M., & Di Croce, L. (2006). Chromatin structure and epigenetics. *Biochemical Pharmacology*, *72*(11), 1563-9. doi:10.1016/j.bcp.2006.06.016
- Raimondi, S., Botteri, E., Iodice, S., Lowenfels, A. B., & Maisonneuve, P. (2009). Gene-smoking interaction on colorectal adenoma and cancer risk: review and meta-analysis. *Mutation Research*, *670*(1-2), 6-14. doi:10.1016/j.mrfmmm.2009.06.013
- Raimondi, S., Paracchini, V., Autrup, H., Barros-Dios, J. M., Benhamou, S., Boffetta, P., ... Taioli, E. (2006). Meta- and pooled analysis of GSTT1 and lung cancer: a HuGE-GSEC review. *American Journal of Epidemiology*, *164*(11), 1027-42. doi:10.1093/aje/kwj321
- Raj, K., John, A., Ho, A., Chronis, C., Khan, S., Samuel, J., ... Mufti, G. J. (2007). CDKN2B methylation status and isolated chromosome 7 abnormalities predict responses to treatment with 5-azacytidine. *Leukemia*, *21*(9), 1937-44. doi:10.1038/sj.leu.2404796
- Rajapaksa, R., Ginzton, N., Rott, L. S., & Greenberg, P. L. (1996). Altered oncoprotein expression and apoptosis in myelodysplastic syndrome marrow cells. *Blood*, *88*(11), 4275-87. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8943864>
- Ramadan, S. M., Fouad, T. M., Summa, V., Hasan, S. K., & Lo-Coco, F. (2012). Acute myeloid leukemia developing in patients with autoimmune diseases. *Haematologica*, *97*(6), 805-17. doi:10.3324/haematol.2011.056283
- Rausch, T., Jones, D. T. W., Zapatka, M., Stütz, A. M., Zichner, T., Weischenfeldt, J., ... Korbel, J. O. (2012). Genome sequencing of pediatric medulloblastoma links catastrophic DNA rearrangements with TP53 mutations. *Cell*, *148*(1-2), 59-71. doi:10.1016/j.cell.2011.12.013
- Rauw, J., Wells, R. A., Chesney, A., Reis, M., Zhang, L., & Buckstein, R. (2011). Validation of a scoring system to establish the probability of myelodysplastic syndrome in patients with unexplained cytopenias or macrocytosis. *Leukemia Research*, *35*(10), 1335-8. doi:10.1016/j.leukres.2011.05.001

- Raval, A., Tanner, S. M., Byrd, J. C., Angerman, E. B., Perko, J. D., Chen, S.-S., ... Plass, C. (2007). Downregulation of death-associated protein kinase 1 (DAPK1) in chronic lymphocytic leukemia. *Cell*, 129(5), 879-90. doi:10.1016/j.cell.2007.03.043
- Raya, J. M., Arenillas, L., Domingo, A., Bellosillo, B., Gutiérrez, G., Luño, E., ... Florensa, L. (2008). Refractory anemia with ringed sideroblasts associated with thrombocytosis: comparative analysis of marked with non-marked thrombocytosis, and relationship with JAK2 V617F mutational status. *International Journal of Hematology*, 88(4), 387-95. doi:10.1007/s12185-008-0169-1
- Raza, A., Gezer, S., Mundle, S., Gao, X. Z., Alvi, S., Borok, R., ... Parcharidou, A. (1995). Apoptosis in bone marrow biopsy samples involving stromal and hematopoietic cells in 50 patients with myelodysplastic syndromes. *Blood*, 86(1), 268-76. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7795232>
- Recommendations for a morphologic, immunologic, and cytogenetic (MIC) working classification of the primary and therapy-related myelodysplastic disorders. Report of the workshop held in Scottsdale, Arizona, USA, on February 23-25, 1987. Third MIC Cooperat. (1988). *Cancer Genetics and Cytogenetics*, 32(1), 1-10. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3355991>
- Reesink-Peters, N., Wisman, G. B. A., Jérónimo, C., Tokumaru, C. Y., Cohen, Y., Dong, S. M., ... van der Zee, A. G. J. (2004). Detecting cervical cancer by quantitative promoter hypermethylation assay on cervical scrapings: a feasibility study. *Molecular Cancer Research: MCR*, 2(5), 289-95. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15192122>
- Reizenstein, P., & Dabrowski, L. (n.d.). Increasing prevalence of the myelodysplastic syndrome. An international Delphi study. *Anticancer Research*, 11(3), 1069-70. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1888140>
- Remacha, A. F., Nomdedéu, J. F., Puget, G., Estivill, C., Sarda, M. P., Canals, C., & Aventin, A. (2006). Occurrence of the JAK2 V617F mutation in the WHO provisional entity: myelodysplastic/myeloproliferative disease, unclassifiable-refractory anemia with ringed sideroblasts associated with marked thrombocytosis. *Haematologica*, 91(5), 719-20. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16670082>
- Renneville, A., Quesnel, B., Charpentier, A., Terriou, L., Crinquette, A., Lai, J.-L., ... Preudhomme, C. (2006). High occurrence of JAK2 V617 mutation in refractory anemia with ringed sideroblasts associated with marked thrombocytosis. *Leukemia*, 20(11), 2067-70. doi:10.1038/sj.leu.2404405
- Reuter, C. W., Morgan, M. A., & Bergmann, L. (2000). Targeting the Ras signaling pathway: a rational, mechanism-based treatment for hematologic malignancies? *Blood*, 96(5), 1655-69. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10961860>
- Reuveni, H., Klein, S., & Levitzki, A. (2003). The inhibition of Ras farnesylation leads to an increase in p27Kip1 and G1 cell cycle arrest. *European Journal of Biochemistry / FEBS*, 270(13), 2759-72. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12823546>
- Robles, A. I., Bemmels, N. A., Foraker, A. B., & Harris, C. C. (2001). APAF-1 is a transcriptional target of p53 in DNA damage-induced apoptosis. *Cancer Research*, 61(18), 6660-4. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11559530>
- Rodriguez-Viciano, P., Sabatier, C., & McCormick, F. (2004). Signaling specificity by Ras family GTPases is determined by the full spectrum of effectors they regulate. *Molecular and Cellular Biology*, 24(11), 4943-54. doi:10.1128/MCB.24.11.4943-4954.2004
- Roman, J., Castillejo, J. A., Jimenez, A., Bornstein, R., Gonzalez, M. G., del Carmen Rodriguez, M., ... Torres, A. (2001). Hypermethylation of the calcitonin gene in acute lymphoblastic leukaemia is associated with unfavourable clinical outcome. *British Journal of Haematology*, 113(2), 329-38. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11380396>
- Rosas, S. L., Koch, W., da Costa Carvalho, M. G., Wu, L., Califano, J., Westra, W., ... Sidransky, D. (2001). Promoter hypermethylation patterns of p16, O6-methylguanine-DNA-methyltransferase, and death-associated protein kinase in tumors and saliva of head and neck cancer patients. *Cancer Research*, 61(3), 939-42. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11221887>

- Rosenfeld, C., & Bedell, C. (2002). Pilot study of recombinant human soluble tumor necrosis factor receptor (TNFR:Fc) in patients with low risk myelodysplastic syndrome. *Leukemia Research*, 26(8), 721-4. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12191566>
- Ross, D. (1996). Metabolic basis of benzene toxicity. *European Journal of Haematology. Supplementum*, 60, 111-8. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8987252>
- Rothman, N., Smith, M. T., Hayes, R. B., Traver, R. D., Hoener, B., Campleman, S., ... Ross, D. (1997). Benzene poisoning, a risk factor for hematological malignancy, is associated with the NQO1 609C-->T mutation and rapid fractional excretion of chlorzoxazone. *Cancer Research*, 57(14), 2839-42. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9230185>
- Rountree, M. R., Bachman, K. E., & Baylin, S. B. (2000). DNMT1 binds HDAC2 and a new co-repressor, DMAP1, to form a complex at replication foci. *Nature Genetics*, 25(3), 269-277. doi:10.1038/77023
- Saif, M. W., Hopkins, J. L., & Gore, S. D. (2002). Autoimmune phenomena in patients with myelodysplastic syndromes and chronic myelomonocytic leukemia. *Leukemia & Lymphoma*, 43(11), 2083-92. doi:10.1080/1042819021000016186
- Sakashita, K., Koike, K., Kinoshita, T., Shiohara, M., Kamijo, T., Taniguchi, S., & Kubota, T. (2001). Dynamic DNA methylation change in the CpG island region of p15 during human myeloid development. *The Journal of Clinical Investigation*, 108(8), 1195-204. doi:10.1172/JCI13030
- Salomon-Nguyen, F., Della-Valle, V., Mauchauffe, M., Busson-Le Coniat, M., Ghysdael, J., Berger, R., & Bernard, O. A. (2000). The t(1;12)(q21;p13) translocation of human acute myeloblastic leukemia results in a TEL-ARNT fusion. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97(12), 6757-62. doi:10.1073/pnas.120162297
- Sanchez-Correa, B., Bergua, J. M., Campos, C., Gayoso, I., Arcos, M. J., Bañas, H., ... Tarazona, R. (2013). Cytokine profiles in acute myeloid leukemia patients at diagnosis: survival is inversely correlated with IL-6 and directly correlated with IL-10 levels. *Cytokine*, 61(3), 885-91. doi:10.1016/j.cyto.2012.12.023
- Santini, V. (2012). The quest for the perfect MDS scoring system. *Leukemia Research*, 36(2), 125-6. doi:10.1016/j.leukres.2011.10.026
- Santos-Rosa, H., & Caldas, C. (2005). Chromatin modifier enzymes, the histone code and cancer. *European Journal of Cancer (Oxford, England: 1990)*, 41(16), 2381-402. doi:10.1016/j.ejca.2005.08.010
- Sarmiento-Ribeiro, A. B., Proença, M. T., Sousa, I., Pereira, A., Guedes, F., Teixeira, A., & Oliveira, C. R. (2012). A possible role for oxidation stress in lymphoid leukaemias and therapeutic failure. *Leukemia Research*, 36(8), 1041-8. doi:10.1016/j.leukres.2012.03.015
- Sauntharajah, Y., Nakamura, R., Nam, J.-M., Robyn, J., Loberiza, F., Maciejewski, J. P., ... Barrett, A. J. (2002). HLA-DR15 (DR2) is overrepresented in myelodysplastic syndrome and aplastic anemia and predicts a response to immunosuppression in myelodysplastic syndrome. *Blood*, 100(5), 1570-4. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12176872>
- Scaffidi, C., Fulda, S., Srinivasan, A., Friesen, C., Li, F., Tomaselli, K. J., ... Peter, M. E. (1998). Two CD95 (APO-1/Fas) signaling pathways. *The EMBO Journal*, 17(6), 1675-87. doi:10.1093/emboj/17.6.1675
- Scardocci, A., Guidi, F., D'Alo', F., Gumiero, D., Fabiani, E., Diruscio, A., ... Voso, M. T. (2006). Reduced BRCA1 expression due to promoter hypermethylation in therapy-related acute myeloid leukaemia. *British Journal of Cancer*, 95(8), 1108-13. doi:10.1038/sj.bjc.6603392
- Schendel, S. L., Xie, Z., Montal, M. O., Matsuyama, S., Montal, M., & Reed, J. C. (1997). Channel formation by antiapoptotic protein Bcl-2. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94(10), 5113-8. Retrieved from <http://www.pubmed-central.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=24640&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Schernhammer, E., Wolpin, B., Rifai, N., Cochrane, B., Manson, J. A., Ma, J., ... Fuchs, C. (2007). Plasma folate, vitamin B6, vitamin B12, and homocysteine and pancreatic cancer risk in four large cohorts. *Cancer Research*, 67(11), 5553-60. doi:10.1158/0008-5472.CAN-06-4463

- Schmitt-Graeff, A. H., Teo, S.-S., Olschewski, M., Schaub, F., Haxelmans, S., Kirn, A., ... Skoda, R. C. (2008). JAK2V617F mutation status identifies subtypes of refractory anemia with ringed sideroblasts associated with marked thrombocytosis. *Haematologica*, *93*(1), 34-40. doi:10.3324/haematol.11581
- Schneider, P., Bodmer, J. L., Thome, M., Hofmann, K., Holler, N., & Tschopp, J. (1997). Characterization of two receptors for TRAIL. *FEBS Letters*, *416*(3), 329-34. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9373179>
- Schnittger, S., Bacher, U., Haferlach, C., Dengler, R., Kröber, A., Kern, W., & Haferlach, T. (2008). Detection of an MPLW515 mutation in a case with features of both essential thrombocythemia and refractory anemia with ringed sideroblasts and thrombocytosis. *Leukemia*, *22*(2), 453-5. doi:10.1038/sj.leu.2404909
- Scholl, F. A., McLoughlin, P., Ehler, E., de Giovanni, C., & Schäfer, B. W. (2000). DRAL is a p53-responsive gene whose four and a half LIM domain protein product induces apoptosis. *The Journal of Cell Biology*, *151*(3), 495-506. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2185594&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Sekeres, M. A. (2009). Treatment of MDS: something old, something new, something borrowed... Hematology / the Education Program of the American Society of Hematology. *American Society of Hematology. Education Program*, 656-63. doi:10.1182/asheducation-2009.1.656
- Selivanova, G., & Wiman, K. G. (2007). Reactivation of mutant p53: molecular mechanisms and therapeutic potential. *Oncogene*, *26*(15), 2243-54. doi:10.1038/sj.onc.1210295
- Sgonc, R. & Gruber, J. (1998). Apoptosis detection: an overview. *Exp. Gerontol.*, *33*, 525-33.
- Shannon, K. M., O'Connell, P., Martin, G. A., Paderanga, D., Olson, K., Dinndorf, P., & McCormick, F. (1994). Loss of the normal NF1 allele from the bone marrow of children with type 1 neurofibromatosis and malignant myeloid disorders. *The New England Journal of Medicine*, *330*(9), 597-601. doi:10.1056/NEJM199403033300903
- Shcherbata, H. R., Hatfield, S., Ward, E. J., Reynolds, S., Fischer, K. A., & Ruohola-Baker, H. (2006). The MicroRNA pathway plays a regulatory role in stem cell division. *Cell Cycle* (Georgetown, Tex.), *5*(2), 172-5. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16357538>
- Shenoy, N., Vallumsetla, N., Rachmilewitz, E., Verma, A., & Ginzburg, Y. (2014). Impact of iron overload and potential benefit from iron chelation in low-risk myelodysplastic syndrome. *Blood*, *124*(6), 873-881. doi:10.1182/blood-2014-03-563221
- Siew-Gek Lee, A., Rudduck-Sivaswaren, C., Khun-Hong Lie, D., Li-Ming Chua, C., Tien, S.-L., Morsberger, L., & Griffin, C. A. (2004). Overlapping deletion regions at 11q23 in myelodysplastic syndrome and chronic lymphocytic leukemia, characterized by a novel BAC probe set. *Cancer Genetics and Cytogenetics*, *153*(2), 151-7. doi:10.1016/j.cancergencyto.2004.01.007
- Silverman, L. R., Demakos, E. P., Peterson, B. L., Kornblith, A. B., Holland, J. C., Odchimar-Reissig, R., ... Holland, J. F. (2002). Randomized controlled trial of azacitidine in patients with the myelodysplastic syndrome: a study of the cancer and leukemia group B. *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*, *20*(10), 2429-2440. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12011120>
- Singal, R., & Ginder, G. D. (1999). DNA methylation. *Blood*, *93*(12), 4059-70. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10361102>
- Skibola, C. F., Smith, M. T., Kane, E., Roman, E., Rollinson, S., Cartwright, R. A., & Morgan, G. (1999). Polymorphisms in the methylenetetrahydrofolate reductase gene are associated with susceptibility to acute leukemia in adults. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *96*(22), 12810-5. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=23109&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Small, D. (2006). FLT3 mutations: biology and treatment. Hematology / the Education Program of the American Society of Hematology. *American Society of Hematology. Education Program*, 178-84. doi:10.1182/asheducation-2006.1.178
- Smith, M. T. (2001). Chromosome damage from biological reactive intermediates of benzene and 1,3-butadiene in leukemia. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, *500*, 279-87. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11764955>

- Smith, M. T., & Rothman, N. (2000). Biomarkers in the molecular epidemiology of benzene-exposed workers. *Journal of Toxicology and Environmental Health. Part A*, 61(5-6), 439-45. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11086950>
- Smith, M. T., Wang, Y., Kane, E., Rollinson, S., Wiemels, J. L., Roman, E., ... Morgan, G. (2001). Low NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1 activity is associated with increased risk of acute leukemia in adults. *Blood*, 97(5), 1422-6. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11222389>
- Smith, S. M., Le Beau, M. M., Huo, D., Karrison, T., Sobecks, R. M., Anastasi, J., ... Larson, R. A. (2003). Clinical-cytogenetic associations in 306 patients with therapy-related myelodysplasia and myeloid leukemia: the University of Chicago series. *Blood*, 102(1), 43-52. doi:10.1182/blood-2002-11-3343
- Sokol, L., Caceres, G., Rocha, K., Stockero, K. J., Dewald, D. W., & List, A. F. (2010). JAK2(V617F) mutation in myelodysplastic syndrome (MDS) with del(5q) arises in genetically discordant clones. *Leukemia Research*, 34(6), 821-3. doi:10.1016/j.leukres.2009.09.016
- Spinelli, E., Caporale, R., Buchi, F., Masala, E., Gozzini, A., Sanna, A., ... Santini, V. (2012). Distinct signal transduction abnormalities and erythropoietin response in bone marrow hematopoietic cell subpopulations of myelodysplastic syndrome patients. *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, 18(11), 3079-3089. doi:10.1158/1078-0432.CCR-11-0686
- Srivastava, A., Boswell, H. S., Heerema, N. A., Nahreini, P., Lauer, R. C., Antony, A. C., ... Tricot, G. J. (1988). KRAS2 oncogene overexpression in myelodysplastic syndrome with translocation 5;12. *Cancer Genetics and Cytogenetics*, 35(1), 61-71. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3180012>
- Steensma, D. P., & Gattermann, N. (2013). When is iron overload deleterious, and when and how should iron chelation therapy be administered in myelodysplastic syndromes? *Best Practice & Research. Clinical Haematology*, 26(4), 431-44. doi:10.1016/j.beha.2013.09.009
- Stephenson, J., Lizhen, H., & Mufti, G. J. (1995). Possible coexistence of RAS activation and monosomy 7 in the leukaemic transformation of myelodysplastic syndromes. *Leukemia Research*, 19(10), 741-8. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7500652>
- Stirewalt, D. L., Kopecky, K. J., Meshinchi, S., Appelbaum, F. R., Slovak, M. L., Willman, C. L., & Radich, J. P. (2001). FLT3, RAS, and TP53 mutations in elderly patients with acute myeloid leukemia. *Blood*, 97(11), 3589-95. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11369655>
- Strom, S. S., Gu, Y., Gruschkus, S. K., Pierce, S. A., & Estey, E. H. (2005). Risk factors of myelodysplastic syndromes: a case-control study. *Leukemia*, 19(11), 1912-8. doi:10.1038/sj.leu.2403945
- Strom, S. S., Vélez-Bravo, V., & Estey, E. H. (2008). Epidemiology of myelodysplastic syndromes. *Seminars in Hematology*, 45(1), 8-13. doi:10.1053/j.seminhematol.2007.10.003
- Szpurka, H., Tiu, R., Murugesan, G., Aboudola, S., Hsi, E. D., Theil, K. S., ... Maciejewski, J. P. (2006). Refractory anemia with ringed sideroblasts associated with marked thrombocytosis (RARS-T), another myeloproliferative condition characterized by JAK2 V617F mutation. *Blood*, 108(7), 2173-81. doi:10.1182/blood-2006-02-005751
- Tahiliani, M., Koh, K. P., Shen, Y., Pastor, W. A., Bandukwala, H., Brudno, Y., ... Rao, A. (2009). Conversion of 5-methylcytosine to 5-hydroxymethylcytosine in mammalian DNA by MLL partner TET1. *Science (New York, N.Y.)*, 324(5929), 930-5. doi:10.1126/science.1170116
- Takada, Y., Khuri, F. R., & Aggarwal, B. B. (2004). Protein farnesyltransferase inhibitor (SCH 66336) abolishes NF-kappaB activation induced by various carcinogens and inflammatory stimuli leading to suppression of NF-kappaB-regulated gene expression and up-regulation of apoptosis. *The Journal of Biological Chemistry*, 279(25), 26287-99. doi:10.1074/jbc.M400963200
- Takahashi, K., Jabbour, E., Wang, X., Luthra, R., Bueso-Ramos, C., Patel, K., ... Garcia-Manero, G. (2013). Dynamic acquisition of FLT3 or RAS alterations drive a subset of patients with lower risk MDS to secondary AML. *Leukemia*, 27(10), 2081-3. doi:10.1038/leu.2013.165

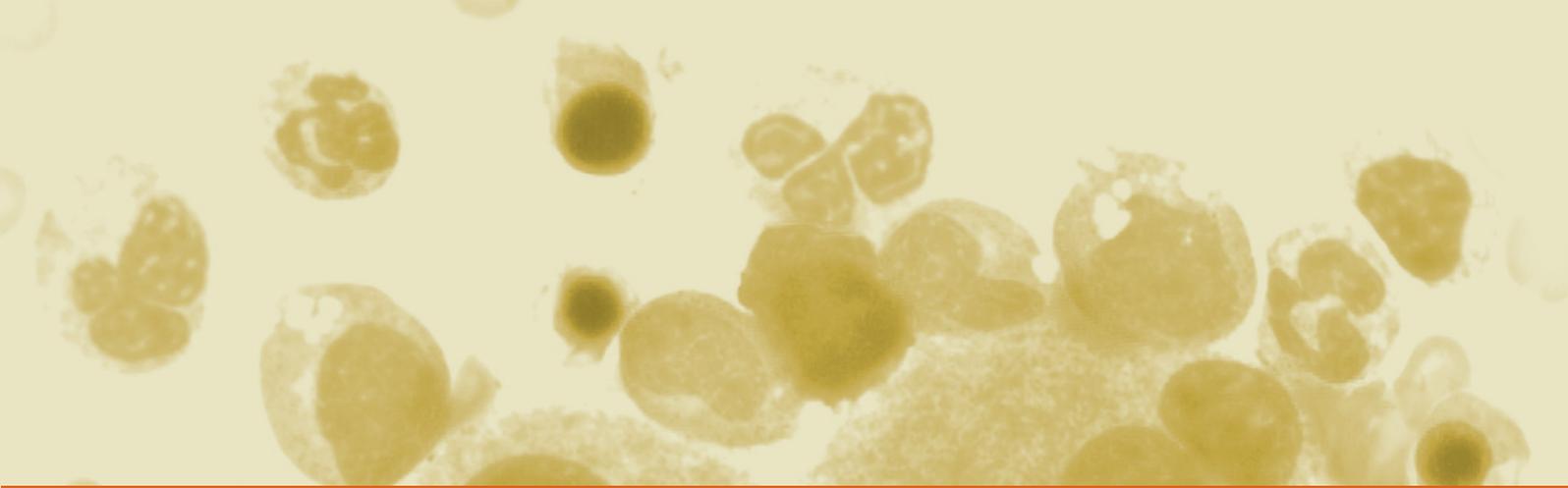
- Takeda, K., Hayakawa, Y., Smyth, M. J., Kayagaki, N., Yamaguchi, N., Kakuta, S., ... Okumura, K. (2001). Involvement of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand in surveillance of tumor metastasis by liver natural killer cells. *Nature Medicine*, 7(1), 94-100. doi:10.1038/83416
- Takimoto, R., & El-Deiry, W. S. (2000). Wild-type p53 transactivates the KILLER/DR5 gene through an intronic sequence-specific DNA-binding site. *Oncogene*, 19(14), 1735-43. doi:10.1038/sj.onc.1203489
- Tambaro, F. P., Dell'aversana, C., Carafa, V., Nebbioso, A., Radic, B., Ferrara, F., & Altucci, L. (2010). Histone deacetylase inhibitors: clinical implications for hematological malignancies. *Clinical Epigenetics*, 1(1-2), 25-44. doi:10.1007/s13148-010-0006-2
- Tavil, B., Cetin, M., & Tuncer, M. (2006). CD34/CD117 positivity in assessment of prognosis in children with myelodysplastic syndrome. *Leukemia Research*, 30(2), 222-4. doi:10.1016/j.leukres.2005.06.019
- Tefferi, A., & Vardiman, J. W. (2009). Myelodysplastic syndromes. *The New England Journal of Medicine*, 361(19), 1872-85. doi:10.1056/NEJMra0902908
- Temraz, S., Santini, V., Musallam, K., & Taher, A. (2014). Iron overload and chelation therapy in myelodysplastic syndromes. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, 91(1), 64-73. doi:10.1016/j.critrevonc.2014.01.006
- Teofili, L., Martini, M., Di Mario, A., Rutella, S., Urbano, R., Luongo, M., ... Larocca, L. M. (2001). Expression of p15(ink4b) gene during megakaryocytic differentiation of normal and myelodysplastic hematopoietic progenitors. *Blood*, 98(2), 495-7. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11435325>
- Tessema, M., Länger, F., Dingemann, J., Ganser, A., Kreipe, H., & Lehmann, U. (2003). Aberrant methylation and impaired expression of the p15(INK4b) cell cycle regulatory gene in chronic myelomonocytic leukemia (CMML). *Leukemia*, 17(5), 910-8. doi:10.1038/sj.leu.2402891
- Thol, F., Damm, F., Wagner, K., Göhring, G., Schlegelberger, B., Hoelzer, D., ... Ganser, A. (2010). Prognostic impact of IDH2 mutations in cytogenetically normal acute myeloid leukemia. *Blood*, 116(4), 614-6. doi:10.1182/blood-2010-03-272146
- Thol, F., Kade, S., Schlarman, C., Löffeld, P., Morgan, M., Krauter, J., ... Heuser, M. (2012). Frequency and prognostic impact of mutations in SRSF2, U2AF1, and ZRSR2 in patients with myelodysplastic syndromes. *Blood*, 119(15), 3578-84. doi:10.1182/blood-2011-12-399337
- Tien, H. F., Tang, J. H., Tsay, W., Liu, M. C., Lee, F. Y., Wang, C. H., ... Shen, M. C. (2001). Methylation of the p15(INK4B) gene in myelodysplastic syndrome: it can be detected early at diagnosis or during disease progression and is highly associated with leukaemic transformation. *British Journal of Haematology*, 112(1), 148-54. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11167795>
- Toyokuni, S., Okamoto, K., Yodoi, J., & Hiai, H. (1995). Persistent oxidative stress in cancer. *FEBS Letters*, 358(1), 1-3. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7821417>
- Toyota, M., & Issa, J.-P. J. (2005). Epigenetic changes in solid and hematopoietic tumors. *Seminars in Oncology*, 32(5), 521-30. doi:10.1053/j.seminoncol.2005.07.003
- Tsimberidou, A.-M., Kantarjian, H. M., Wen, S., O'Brien, S., Cortes, J., Wierda, W. G., ... Estey, E. H. (2008). The prognostic significance of serum beta2 microglobulin levels in acute myeloid leukemia and prognostic scores predicting survival: analysis of 1,180 patients. *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, 14(3), 721-30. doi:10.1158/1078-0432.CCR-07-2063
- Tsoplou, P., Kouraklis-Symeonidis, A., Thanopoulou, E., Zikos, P., Orphanos, V., & Zoumbos, N. C. (1999). Apoptosis in patients with myelodysplastic syndromes: differential involvement of marrow cells in "good" versus "poor" prognosis patients and correlation with apoptosis-related genes. *Leukemia*, 13(10), 1554-63. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10516757>
- Tsukamoto, N., Morita, K., Karasawa, M., & Omine, M. (1992). Methylation status of c-myc oncogene in leukemic cells: hypomethylation in acute leukemia derived from

- myelodysplastic syndromes. *Experimental Hematology*, 20(9), 1061-4. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1468540>
- Tyson, J. J., Csikasz-Nagy, A., & Novak, B. (2002). The dynamics of cell cycle regulation. *BioEssays: News and Reviews in Molecular, Cellular and Developmental Biology*, 24(12), 1095-109. doi:10.1002/bies.10191
- Uchida, T., Kinoshita, T., Nagai, H., Nakahara, Y., Saito, H., Hotta, T., & Murate, T. (1997). Hypermethylation of the p15INK4B gene in myelodysplastic syndromes. *Blood*, 90(4), 1403-9. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9269757>
- Uchida, T., Kinoshita, T., Nagai, H., Nakahara, Y., Saito, H., Hotta, T., & Murate, T. (1997). Hypermethylation of the p15INK4B gene in myelodysplastic syndromes. *Blood*, 90(4), 1403-9. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9269757>
- Ulrey, C. L., Liu, L., Andrews, L. G., & Tollefsbol, T. O. (2005). The impact of metabolism on DNA methylation. *Human Molecular Genetics*, 14 Spec No, R139-47. doi:10.1093/hmg/ddi100
- Valent, P., Horny, H.-P., Bennett, J. M., Fonatsch, C., Germing, U., Greenberg, P., ... Wells, D. A. (2007). Definitions and standards in the diagnosis and treatment of the myelodysplastic syndromes: Consensus statements and report from a working conference. *Leukemia Research*, 31(6), 727-36. doi:10.1016/j.leukres.2006.11.009
- Valko, M., Leibfritz, D., Moncol, J., Cronin, M. T. D., Mazur, M., & Telser, J. (2007). Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 39(1), 44-84. doi:10.1016/j.biocel.2006.07.001
- Vallian, S., Sedaghat, M., Nassiri, I., & Frazmand, A. (2009). Methylation status of p16 INK4A tumor suppressor gene in Iranian patients with sporadic breast cancer. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*, 135(8), 991-6. doi:10.1007/s00432-008-0534-8
- Van Noesel, M. M. et al. Tumor-specific down-regulation of the tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand decoy receptors DcR1 and DcR2 is associated with dense promoter hypermethylation. *Cancer Res.*, 62, 2157-61 (2002).
- Venza, M., Visalli, M., Catalano, T., Fortunato, C., Oteri, R., Teti, D., & Venza, I. (2013). Impact of DNA methyltransferases on the epigenetic regulation of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) receptor expression in malignant melanoma. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 441(4), 743-750. doi:10.1016/j.bbrc.2013.10.114
- Vignon-Pennamen, M.-D., Juillard, C., Rybojad, M., Wallach, D., Daniel, M.-T., Morel, P., ... Janin, A. (2006). Chronic recurrent lymphocytic Sweet syndrome as a predictive marker of myelodysplasia: a report of 9 cases. *Archives of Dermatology*, 142(9), 1170-6. doi:10.1001/archderm.142.9.1170
- Visconte, V., Makishima, H., Maciejewski, J. P., & Tiu, R. V. (2012). Emerging roles of the spliceosomal machinery in myelodysplastic syndromes and other hematological disorders. *Leukemia*, 26(12), 2447-54. doi:10.1038/leu.2012.130
- Vogelstein, B., Lane, D., & Levine, A. J. (2000). Surfing the p53 network. *Nature*, 408(6810), 307-10. doi:10.1038/35042675
- Voulgarelis, M., Giannouli, S., Ritis, K., & Tzioufas, A. G. (2004). Myelodysplasia-associated autoimmunity: clinical and pathophysiologic concepts. *European Journal of Clinical Investigation*, 34(10), 690-700. doi:10.1111/j.1365-2362.2004.01417.x
- Vousden, K. H. (2005). Apoptosis. p53 and PUMA: a deadly duo. *Science (New York, N.Y.)*, 309(5741), 1685-6. doi:10.1126/science.1118232
- Vousden, K. H., & Ryan, K. M. (2009). p53 and metabolism. *Nature Reviews. Cancer*, 9(10), 691-700. doi:10.1038/nrc2715
- Waddington, C. H. (1939). Preliminary Notes on the Development of the Wings in Normal and Mutant Strains of *Drosophila*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 25(7), 299-307. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1077909&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>

- Walczak, H., Degli-Esposti, M. A., Johnson, R. S., Smolak, P. J., Waugh, J. Y., Boiani, N., ... Rauch, C. T. (1997). TRAIL-R2: a novel apoptosis-mediating receptor for TRAIL. *The EMBO Journal*, *16*(17), 5386-97. doi:10.1093/emboj/16.17.5386
- Walker, N. I., Harmon, B. V., Gobé, G. C., & Kerr, J. F. (1988). Patterns of cell death. *Methods and Achievements in Experimental Pathology*, *13*, 18-54. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3045494>
- Walter, M. J., Ding, L., Shen, D., Shao, J., Grillot, M., McLellan, M., ... Graubert, T. A. (2011). Recurrent DNMT3A mutations in patients with myelodysplastic syndromes. *Leukemia*, *25*(7), 1153-8. doi:10.1038/leu.2011.44
- Wang, L., Groves, M. J., Hepburn, M. D., & Bowen, D. T. (2000). Glutathione S-transferase enzyme expression in hematopoietic cell lines implies a differential protective role for T1 and A1 isoenzymes in erythroid and for M1 in lymphoid lineages. *Haematologica*, *85*(6), 573-9. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10870112>
- Wang, S. A., Hasserjian, R. P., Loew, J. M., Sechman, E. V., Jones, D., Hao, S., ... Raza, A. (2006). Refractory anemia with ringed sideroblasts associated with marked thrombocytosis harbors JAK2 mutation and shows overlapping myeloproliferative and myelodysplastic features. *Leukemia*, *20*(9), 1641-4. doi:10.1038/sj.leu.2404316
- Wang, X., Zhu, Y.-B., Cui, H.-P., & Yu, T.-T. (2014). Aberrant promoter methylation of p15 (INK4b) and p16 (INK4a) genes may contribute to the pathogenesis of multiple myeloma: a meta-analysis. *Tumour Biology: The Journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine*. doi:10.1007/s13277-014-2054-2
- Weber, M., Hellmann, I., Stadler, M. B., Ramos, L., Pääbo, S., Rebhan, M., & Schübeler, D. (2007). Distribution, silencing potential and evolutionary impact of promoter DNA methylation in the human genome. *Nature Genetics*, *39*(4), 457-66. doi:10.1038/ng1990
- Weissmann, S., Alpermann, T., Grossmann, V., Kowarsch, A., Nadarajah, N., Eder, C., ... Kohlmann, A. (2012). Landscape of TET2 mutations in acute myeloid leukemia. *Leukemia*, *26*(5), 934-42. doi:10.1038/leu.2011.326
- West, A. H., Godley, L. A., & Churpek, J. E. (2014). Familial myelodysplastic syndrome/acute leukemia syndromes: a review and utility for translational investigations. *Annals of the New York Academy of Sciences*, *1310*, 111-8. doi:10.1111/nyas.12346
- West, R. R., Stafford, D. A., White, A. D., Bowen, D. T., & Padua, R. A. (2000). Cytogenetic abnormalities in the myelodysplastic syndromes and occupational or environmental exposure. *Blood*, *95*(6), 2093-7. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10706879>
- Wijermans, P., Lübbert, M., Verhoef, G., Bosly, A., Ravoet, C., Andre, M., & Ferrant, A. (2000). Low-dose 5-aza-2'-deoxycytidine, a DNA hypomethylating agent, for the treatment of high-risk myelodysplastic syndrome: a multicenter phase II study in elderly patients. *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*, *18*(5), 956-62. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10694544>
- Wiley, S. R., Schooley, K., Smolak, P. J., Din, W. S., Huang, C. P., Nicholl, J. K., ... Smith, C. A. (1995). Identification and characterization of a new member of the TNF family that induces apoptosis. *Immunity*, *3*(6), 673-82. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8777713>
- Williamson, P. J., Kruger, A. R., Reynolds, P. J., Hamblin, T. J., & Oscier, D. G. (1994). Establishing the incidence of myelodysplastic syndrome. *British Journal of Haematology*, *87*(4), 743-5. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7986716>
- Wong, T.-S., Kwong, D. L.-W., Sham, J. S.-T., Wei, W. I., Kwong, Y.-L., & Yuen, A. P.-W. (2004). Quantitative plasma hypermethylated DNA markers of undifferentiated nasopharyngeal carcinoma. *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, *10*(7), 2401-6. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15073117>
- Woods, D. B., & Vousden, K. H. (2001). Regulation of p53 function. *Experimental Cell Research*, *264*(1), 56-66. doi:10.1006/excr.2000.5141

- Wu, S.-J., Yao, M., Chou, W.-C., Tang, J.-L., Chen, C.-Y., Ko, B.-S., ... Tien, H.-F. (2006). Clinical implications of SOCS1 methylation in myelodysplastic syndrome. *British Journal of Haematology*, 135(3), 317-23. doi:10.1111/j.1365-2141.2006.06293.x
- Wyllie, A. H., Kerr, J. F., & Currie, A. R. (1980). Cell death: the significance of apoptosis. *International Review of Cytology*, 68, 251-306. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7014501>
- Xie, W., Wang, X., Du, W., Liu, W., Qin, X., & Huang, S. (2010). Detection of molecular targets on the surface of CD34+CD38- bone marrow cells in myelodysplastic syndromes. *Cytometry. Part A: The Journal of the International Society for Analytical Cytology*, 77(9), 840-8. doi:10.1002/cyto.a.20929
- Yamaguchi, S., Asao, T., Nakamura, J., Ide, M., & Kuwano, H. (2003). High frequency of DAP-kinase gene promoter methylation in colorectal cancer specimens and its identification in serum. *Cancer Letters*, 194(1), 99-105. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12706863>
- Yamamoto, K., Abe, S., Nakagawa, Y., Suzuki, K., Hasegawa, M., Inoue, M., ... Kitagawa, M. (2004). Expression of IAP family proteins in myelodysplastic syndromes transforming to overt leukemia. *Leukemia Research*, 28(11), 1203-11. doi:10.1016/j.leukres.2004.03.020
- Yan, X.-J., Xu, J., Gu, Z.-H., Pan, C.-M., Lu, G., Shen, Y., ... Chen, S.-J. (2011). Exome sequencing identifies somatic mutations of DNA methyltransferase gene DNMT3A in acute monocytic leukemia. *Nature Genetics*, 43(4), 309-15. doi:10.1038/ng.788
- Yang, L., Xu, R.-R., Song, G.-Q., Hang, H.-M., Liu, H., Jiang, S.-H., ... Ding, X.-S. (2008). [Effect of decitabine combined with Trichostatin A on MDS cell line SKM-1 in vitro]. *Zhongguo Shi Yan Xue Ye Xue Za Zhi / Zhongguo Bing Li Sheng Li Xue Hui = Journal of Experimental Hematology / Chinese Association of Pathophysiology*, 16(4), 819-823. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18718068>
- Yeh, K.-T. *et al.* Epigenetic changes of tumor suppressor genes, P15, P16, VHL and P53 in oral cancer. *Oncol. Rep.*, 10, 659-63
- Yoneda-Kato, N., Look, A. T., Kirstein, M. N., Valentine, M. B., Raimondi, S. C., Cohen, K. J., ... Morris, S. W. (1996). The t(3;5)(q25.1;q34) of myelodysplastic syndrome and acute myeloid leukemia produces a novel fusion gene, NPM-MLF1. *Oncogene*, 12(2), 265-75. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8570204>
- Yoo, C. B., & Jones, P. A. (2006). Epigenetic therapy of cancer: past, present and future. *Nature Reviews. Drug Discovery*, 5(1), 37-50. doi:10.1038/nrd1930
- Yoshida, K., Sanada, M., Shiraishi, Y., Nowak, D., Nagata, Y., Yamamoto, R., ... Ogawa, S. (2011). Frequent pathway mutations of splicing machinery in myelodysplasia. *Nature*, 478(7367), 64-9. doi:10.1038/nature10496
- Yuregir, O. O., Yurtcu, E., Kizilkilic, E., Kocer, N. E., Ozdogu, H., & Sahin, F. I. (2010). Detecting methylation patterns of p16, MGMT, DAPK and E-cadherin genes in multiple myeloma patients. *International Journal of Laboratory Hematology*, 32(2), 142-149. doi:10.1111/j.1751-553X.2009.01146.x
- 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(10), 3058-65. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11698291>
- Zervas, J., Geary, C. G., & Oleesky, S. (1974). Sideroblastic anemia treated with immunosuppressive therapy. *Blood*, 44(1), 117-23. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4600293>
- Zha, H., Aimé-Sempé, C., Sato, T., & Reed, J. C. (1996). Proapoptotic protein Bax heterodimerizes with Bcl-2 and homodimerizes with Bax via a novel domain (BH3) distinct from BH1 and BH2. *The Journal of Biological Chemistry*, 271(13), 7440-4. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8631771>

- Zhang, J., Ding, L., Holmfeldt, L., Wu, G., Heatley, S. L., Payne-Turner, D., ... Mullighan, C. G. (2012). The genetic basis of early T-cell precursor acute lymphoblastic leukaemia. *Nature*, *481*(7380), 157-63. doi:10.1038/nature10725
- Ziemann, C., Bürkle, A., Kahl, G. F., & Hirsch-Ernst, K. I. (1999). Reactive oxygen species participate in mdr1b mRNA and P-glycoprotein overexpression in primary rat hepatocyte cultures. *Carcinogenesis*, *20*(3), 407-14. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10190554>
- Zöchbauer-Müller, S., Fong, K. M., Maitra, A., Lam, S., Geradts, J., Ashfaq, R., ... Minna, J. D. (2001). 5' CpG island methylation of the FHIT gene is correlated with loss of gene expression in lung and breast cancer. *Cancer Research*, *61*(9), 3581-5. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11325823>



ANEXOS

Tabela A1 Índices de prognóstico, parâmetros hematológicos e bioquímicos dos doentes com SMD, de acordo com os vários subtipos da OMS 2008. (M=missing, M=média, Md=mediana e SD=desvio padrão)

	5Q- (n=4)			AR (n=6)			AREB-1 (n=8)			AREB-2 (n=8)			ARSA (n=6)			CRDM (n=52)			LMMC (n=12)			NR (n=4)			TR (n=2)					
	M	Me	SD	M	Me	SD	M	Me	SD	M	Me	SD	M	Me	SD	M	Me	SD	M	Me	SD	M	Me	SD	M	Me	SD			
IPSS	0	0,0	0,00	0	0,0	0,00	2	,67	1,0	,516	,577	0	,17	0,0	,408	8	,30	0,0	,632	2	,30	0,0	,675	2	0,0	0,00	0	0,0	0,00	
IPSS-R	0	2,0	,816	0	2,0	,894	2	4,8	4,5	,983	1,46	0	1,8	1,5	1,16	8	2,7	3,0	1,236	2	2,5	2,0	1,43	2	1,5	1,5	,707	0	1,0	1,41
WPSS	0	2,5	0,0	0	,33	0,0	2	2,3	2,0	,516	1	3,4	3,0	0,0	,816	8	1,5	1,0	,757	1				2	0,0	0,0	0,00	0	0,0	0,00
Leucócitos (4-10G/L)	0	4,0	4,0	0	4,8	5,0	0	2,8	2,5	1,88	0	4,1	3,5	4,0	1,03	0	3,6	3,0	2,119	0	8,0	8,0	3,14	0	3,7	3,5	,957	0	5,0	5,0
Neutrófilos (2-7G/L)	0	2,5	2,0	0	3,0	,894	0	1,2	1,0	1,03	0	1,8	1,5	2,0	,753	0	1,9	2,0	1,514	0	3,5	3,0	2,57	0	1,5	1,5	,577	0	2,5	2,12
Hg (M–e H–g/dl)	0	9,0	9,0	0	10,0	10,0	0	10,0	10,0	2,72	0	9,6	10,0	10,0	1,03	0	10,0	10,0	2,192	0	11,0	11,0	2,57	0	14,0	14,0	1,00	0	13,0	13,0
Plaquetas (150-400 G/L)	0	251	264	0	232	250	0	80,0	56,0	75,0	0	43,0	39,0	198	22,9	0	103,0	83,0	77,37	0	156,0	133,0	138,0	0	184,0	168,0	56,9	0	76,0	76,0
Ác.F–f–lico	0	19,0	23,0	0	11,0	10,0	2	9,5	8,0	5,39	0	15,0	9,5	14,0	7,50	0	13,0	12,0	6,678	1	9,6	6,0	7,72	0	7,2	7,0	1,25	0	15,0	15,0
VitB12	0	584	512	0	573	517	1	709	487	608,0	0	835	590	825	336,0	0	965	594	1644,0	2	987	630	789,0	0	511	414	202,0	0	831	831
LDH	1	177	167	0	179	178	0	172	170	0,00	1	240	240	186	0,00	6	221	209	,455	1	188	196	0,00	1	220	206	,577	0	188	188
Ferritina	0	183	167	0	416	247	0	269	273	164,0	0	550	445	488	301	0	402	231	451,0	0	395	295	285,0	0	128	131	65,1	0	297	297
EPO	1	136	164	0	22,0	16,0	2	52,0	37,0	52,5	1	56,0	60,0	34,0	4,32	4	128	29,0	332,0	4	81,0	34,0	109,0	0	9,7	9,0	6,29	0	10,0	10,0
B2M	1	4,0	5,0	0	3,5	3,0	4	5,5	5,5	0,00	4	2,7	2,5	2,0	0,00	6	3,1	2,0	,498	4	3,1	3,0	,354	0	2,0	2,0	,500	0	2,5	2,5

Tabela A2 Subtipos por metilação de genes polimorfismos da MTHFR, células (CD34) e moléculas da apoptose

		5Q- (n=4)		AR (n=6)		AREB-1 (n=8)		AREB-2 (n=8)		ARSA (n=6)		CRDM (n=52)		LMMC (n=12)		NR (n=4)		TR (n=2)	
		Mean	Count	Mean	Count	Mean	Count	Mean	Count	Mean	Count	Mean	Count	Mean	Count	Mean	Count	Mean	Count
Idade		79,25		79,17		73,38		70,38		77,17		72,27		74,67		68,50		61,50	
Gênero	1		4		4		4		3		4		32		3		3		1
	2		0		2		4		5		2		20		9		1		1
p15		,75		,67		,25		,13		,33		,69		,58		,25		,50	
p16		,50		,33		,25		,25		,17		,25		,08		,25		,50	
DAPK		,50		,33		,83		0,00		,83		,48		,70		,67		0,00	
R4		0,00		,33		,17		0,00		,33		,20		,10		0,00		0,00	
R1		,50		0,00		0,00		0,00		,33		,32		0,00		,67		,50	
R3		0,00		0,00		,17		0,00		,33		,11		,10		0,00		0,00	
R2		0,00		0,00		,50		0,00		,17		,27		,10		,67		0,00	
MTHFR A1298C	A/A		2		5		1		2		4		16		4		1		1
	A/C		2		0		7		4		1		32		8		3		1
	C/C		0		1		0		2		1		4		0		0		0
MTHFR677 T	Ala/Ala		1		2		5		3		4		28		4		2		2
	Ala/Val		3		4		2		4		2		22		6		1		0
	Val/Val		0		0		1		1		0		2		2		1		0
CD34_P		4,81		2,27		3,18		8,62		1,73		2,27		1,81		1,76		1,22	
CD34/CD117_P		27,50		39,00		30,71		42,50		27,33		40,45		21,37		13,00		18,00	
CD34/CD123_P		65,20		61,20		75,52		84,10		61,27		60,50		37,02		82,57		63,50	
CD34/GlicoP_P		20,05		27,70		22,00		34,50		34,22		38,88		21,02		33,27		22,95	
CD34/IL6_P		46,80		29,47		37,63		71,30		25,92		41,98		28,61		36,20		60,70	
CD34/TNF-a_P		26,45		12,50		15,49		24,80		17,22		17,36		14,34		13,20		9,95	
CD34/CD117/CD123		19,80		7,40		22,62		10,00		29,72		22,16		12,22		11,73		16,90	
CD34/CD117/GlicoP		4,95		8,33		17,24		36,30		15,12		16,96		8,24		10,57		13,65	
CD34/CD117/IL6		4,65		8,70		10,47		40,85		7,43		11,41		12,67		10,13		12,60	
CD34/CD117/TNF-a		6,60		5,63		4,74		5,95		4,53		4,83		9,93		4,53		3,10	
CD34/CD117/CD123/GlicoP		7,10		5,35		13,25		8,10		26,13		10,97		8,90		10,27		11,25	
CD34/CD117/CD123/IL6		1,65		11,60		9,20		6,90		6,52		2,96		5,61		9,50		12,50	
CD34/CD117/CD123/TNF-a		1,00		5,80		4,07		7,30		3,93		1,84		5,23		4,87		2,40	
CD34/CD45+/-/CD33+		67,35		90,40		80,85		92,05		74,48		79,79		83,09		87,80		91,45	
CD34/CD45+/-/CD33-		32,65		9,60		19,32		7,95		25,53		20,27		16,91		12,20		8,55	
BCL2_P		28,35		6,87		12,96		10,94		18,15		22,56		36,70		4,18		10,20	
BAX_P		35,03		23,93		40,91		75,16		32,65		46,13		47,14		17,90		28,80	
TRAIL lig_P		22,43		21,32		26,58		37,06		28,38		35,15		20,44		28,95		19,55	
R1_P		33,00		24,65		33,48		17,79		20,95		32,37		20,19		32,80		20,85	
R2_P		6,20		30,23		11,95		8,14		20,20		15,40		11,13		31,30		24,00	
R3_P		13,13		25,55		26,79		7,55		24,07		29,25		17,43		29,68		19,65	
R4_P		12,63		33,47		27,88		18,87		23,45		29,96		28,94		36,28		23,70	
FAS lig_P		23,08		40,93		43,73		46,34		45,02		45,66		41,74		45,83		50,10	
Survivina_P		12,68		2,65		6,25		17,63		6,75		12,59		2,86		2,93		3,15	
Caspase 3_P		2,20		16,43		5,20		2,90		5,45		8,40				20,77		18,70	
Citocromo C_P		2,68		4,05		3,27		2,74		6,23		7,84		2,49		2,95		2,50	
GlicoP citopl_P		9,37		4,53		16,94		82,10		8,75		13,38		6,33		3,90		5,50	
p53_P		4,80		4,98		7,36		17,11		8,92		9,42		5,43		5,15		2,40	

Tabela A3 Subtipos por metilação de genes polimorfismos da MTHFR, células (CD34) e moléculas da apoptose para indivíduos com evolução LMA

		AREB-1 (n=8) LMA=1		AREB-2 (n=8) LMA=7		CRDM (n=52) LMA=2		LMMC (n=12) LMA=1	
		Mean	Count	Mean	Count	Mean	Count	Mean	Count
Idade		70.00		69.14		53.50		76.00	
Género	1		0		2		1		0
	2		1		5		1		1
p15		.00		.00		.00		1.00	
p16		.00		.29		.00		.00	
DAPK		1.00		.00		.00		1.00	
R4		.00		.00		.00		.00	
R1		.00		.00		1.00		.00	
R3		.00		.00		.00		.00	
R2		.00		.00		.00		.00	
MTHFR A1298C	1		0		1		1		0
	2		1		4		1		1
	3		0		2		0		0
MTHFR C677T	1		1		2		1		0
	2		0		4		1		1
	3		0		1		0		0
CD34_P		1.67		9.07		2.93		1.01	
CD34/CD117_P		16.00		47.00		88.00		25.00	
CD34/CD123_P		86.40		.		.		18.80	
CD34/GlicoP_P		19.10		19.00		18.00		25.30	
CD34/IL6_P		12.70		100.00		100.00		13.40	
CD34/TNF-a_P		7.80		28.30		1.60		8.70	
CD34/CD117/CD123		13.90		.		.		6.90	
CD34/CD117/GlicoP		11.80		34.90		11.20		3.90	
CD34/CD117/IL6		8.50		46.10		88.00		15.50	
CD34/CD117/TNF-a		2.60		5.80		1.48		11.30	
CD34/CD117/CD123/GlicoP		11.50		.		.		2.50	
CD34/CD117/CD123/IL6		10.60		.		.		5.70	
CD34/CD117/CD123/TNF-a		3.60		.		.		5.10	
CD34/CD45+/-/CD33+		62.30		93.60		.		91.00	
CD34/CD45+/-/CD33-		37.70		6.40		.		9.00	
BCL2_P		5.10		10.90		28.15		32.90	
BAX_P		23.40		74.33		84.05		30.00	
TRAIL lig_P		11.30		35.77		40.50		8.90	
R1_P		12.70		17.63		28.55		37.50	
R2_P		6.10		8.83		7.55		30.40	
R3_P		42.60		7.89		21.75		18.90	
R4_P		22.90		19.53		23.30		12.60	
FAS lig_P		39.40		45.19		49.20		45.50	
Survivina_P		3.00		19.93		53.95		2.40	
Caspase 3_P		.		2.70		59.30		.	
Citocromo C_P		.00		2.95		50.40		3.50	
GlicoP citopl_P		1.50		83.30		84.00		4.30	
p53_P		2.30		19.13		39.20		5.90	

Tabela A4 Subtipos por índices de prognóstico e parâmetros hematológicos e bioquímicos (M=missings, Me=média, Md=mediana e SD=desvio padrão) com evolução LMA

	AREB-1 (n=8) LMA=1			AREB-2 (n=8) LMA=7				CRDM (n=52) LMA=2				LMMC (n=12) LMA=1			Total LMA =11				Not LMA =91			
	Mi	Mean	Md	Mi	Mean	Md	SD	Mi	Mean	Md	SD	Mi	Mean	Md	Mi	Mean	Md	SD	Mi	Mean	Md	SD
IPSS	1			1	1,83	2,00	,408	0	0,00	0,00	0,000	0	1,00	1,00	2	1,33	2,00	,866	13	,29	0,00	,647
IPSS-R	1			1	5,67	5,50	,816	0	2,00	2,00	1,414	0	4,00	4,00	2	4,67	5,00	1,803	13	2,73	2,50	1,551
WPSS	1			1	3,17	3,00	,408	0	1,00	1,00	0,000	1			3	2,63	3,00	1,061	22	1,33	1,00	1,066
Leucócitos (4-10G/L)	0	1,00	1,00	0	4,43	4,00	2,149	0	5,50	5,50	4,950	0	5,00	5,00	0	4,36	4,00	2,580	0	4,32	4,00	2,512
Neutrófilos (2-7G/L)	0	1,00	1,00	0	2,14	2,00	1,464	0	2,50	2,50	2,121	0	1,00	1,00	0	2,00	1,00	1,414	0	2,18	2,00	1,657
Hg (M>12 e H>13g/dL)	0	13,00	13,00	0	9,71	10,00	1,380	0	10,00	10,00	0,000	0	8,00	8,00	0	9,91	10,00	1,578	0	10,62	10,00	2,393
Plaquetas (150-400 G/L)	0	107,00	107,00	0	45,71	49,00	22,933	0	84,50	84,50	78,489	0	161,00	161,00	0	68,82	61,00	48,476	0	131,68	107,00	98,981
Blastos	0	1,00	1,00	0	1,00	1,00	0,000	0	0,00	0,00	0,000	0	1,00	1,00	0	,82	1,00	,405	0	,11	0,00	,314
Sideroblastos	0	0,00	0,00	0	0,00	0,00	0,000	0	,50	,50	,707	0	0,00	0,00	0	,09	0,00	,302	0	,11	0,00	,314
Citogenética	0	3,00	3,00	0	,43	0,00	1,134	0	0,00	0,00	0,000	0	0,00	0,00	0	,55	0,00	1,214	4	,60	0,00	1,005
Ác.Fólico	0	19,00	19,00	0	16,43	10,00	15,490	0	14,50	14,50	6,364	0	18,00	18,00	0	16,45	12,00	12,234	3	12,60	9,50	6,921
VitB12	0	840,00	840,00	0	687,86	586,00	383,189	0	647,00	647,00	315,370	0	535,00	535,00	0	680,36	586,00	320,889	3	895,75	589,50	1313,539
LDH (<248U/L)	0	131,00	131,00	1	226,50	227,50	53,369	0	207,50	207,50	101,116	0	200,00	200,00	1	210,50	207,50	60,047	12	208,32	199,00	60,031
LDH	0	0,00	0,00	1	,33	0,00	,516	0	,50	,50	,707	0	0,00	0,00	1	,30	0,00	,483	12	,18	0,00	,384
Ferritina	0	67,00	67,00	0	578,29	533,00	480,864	0	150,50	150,50	13,435	0	590,00	590,00	0	455,09	358,00	429,903	1	380,23	238,00	394,926
EPO	0	5,00	5,00	1	62,33	62,50	46,116	0	90,00	90,00	41,012	0	332,00	332,00	1	89,10	63,00	95,852	12	93,86	24,00	263,016
B2M	0	1,00	1,00	4	,67	1,00	,577	0	,50	,50	,707	0	1,00	1,00	4	,71	1,00	,488	15	,58	1,00	,497

Tabela A5 Índice de progressão para Leucemia Aguda (IPLA)

	5q-	AR	AREB-1	AREB-2	ARSA	CRDM	LMMC	NR	TR
	Média								
LEUCÓCITOS	4	4,83	2,88	4,13	4,33	3,69	8,08	3,75	5
ANC	2,5	3	1,25	1,88	2,17	1,94	3,5	1,5	2,5
HG	9	10	10,63	9,63	9,67	10,31	11,58	14,5	13
PLAQUETAS	252	233	80	44	204	103	156	184	76
BLASTOS	1,75	0,83	5,5	12,38	1	1,58	2,83	1,75	1
SA	0	3,83	0	0	34,33	4,92	1,58	0	0,5
ÁCIDO FÓLICO	19,25	11,17	9,5	15,25	14,67	13,73	9,64	7,25	15
B12	584,5	573,2	709,9	835,9	848,0	965,5	987,2	511,8	831,5
LDH	177,3	179,0	172,6	239,9	188,7	221,4	188,5	220,0	188,5
FERRITINA	183,5	416,5	269,9	550,0	488,0	402,5	395,0	128,0	297,5
EPO	136,0	22,6	52,7	56,3	34,7	128,3	81,4	9,8	10,5
B2M	4	3,5	5,5	2,75	2	3,17	3,13	2	2,5
CD34_P	4,81	2,27	3,18	8,62	1,73	2,27	1,81	1,76	1,22
CD34/CD117_P	27,5	39	30,71	42,5	27,33	40,45	21,37	13	18
CD34/CD123_P	65,2	61,2	75,52	84,1	61,27	60,5	37,02	82,57	63,5
CD34/CD117/CD123	19,8	7,4	22,62	10	29,72	22,16	12,22	11,73	16,9
CD34/CD117/GlicoP	4,95	8,33	17,24	36,3	15,12	16,96	8,24	10,57	13,65
CD34/CD117/IL6	4,65	8,7	10,47	40,85	7,43	11,41	12,67	10,13	12,6
CD34/CD117/TNF α	6,6	5,63	4,74	5,95	4,53	4,83	9,93	4,53	3,1
CD34/117/123/GlicoP	7,1	5,35	13,25	8,1	26,13	10,97	8,9	10,27	11,25
CD34/117/123/IL6	1,65	11,6	9,2	6,9	6,52	2,96	5,61	9,5	12,5
CD34/117/123/TN α	1	5,8	4,07	7,3	3,93	1,84	5,23	4,87	2,4
BCL-2	28,35	6,87	12,96	10,94	18,15	22,56	36,7	4,18	10,2
BAX	35,03	23,93	40,91	75,16	32,65	46,13	47,14	17,9	28,8
TRAIL	22,43	21,32	26,58	37,06	28,38	35,15	20,44	28,95	19,55
R1	33	24,65	33,48	17,79	20,95	32,37	20,19	32,8	20,85
R2	6,2	30,23	11,95	8,14	20,2	15,4	11,13	31,3	24
R3	13,13	25,55	26,79	7,55	24,07	29,25	17,43	29,68	19,65
R4	12,63	33,47	27,88	18,87	23,49	29,96	28,94	36,28	23,7
FAS	23,08	40,93	43,73	46,34	45,02	45,66	41,74	45,83	50,1
SURVIVINA	12,68	2,65	6,25	17,63	6,75	12,59	2,86	2,93	3,15
CASPASE 3	2,2	16,43	5,2	2,9	5,45	8,4	-	20,77	18,7
CITOCROMO C	2,68	4,05	3,27	2,74	6,23	7,84	2,49	2,95	2,5
GLICOP CITOPL	8,37	4,53	16,94	82,1	8,75	13,38	6,33	3,9	3,5
P53	4,8	4,98	7,36	17,11	8,92	9,42	5,43	5,15	2,4
	Porcentagem de metilação do gene								
P15	75	67	25	13	33	69	58	25	50
P16	50	33	25	25	17	25	8	25	50
DAPK	50	33	83	0	83	48	70	67	0
R1	50	0	0	0	33	32	0	67	50
R2	0	0	50	0	17	27	10	67	0
R3	0	0	17	0	33	11	10	0	0
R4	0	33	17	0	33	20	10	0	0
	5q-	AR	AREB-1	AREB-2	ARSA	CRDM	LMMC	NR	TR
RISCO	5	5	10	19	6	11	7	7	5

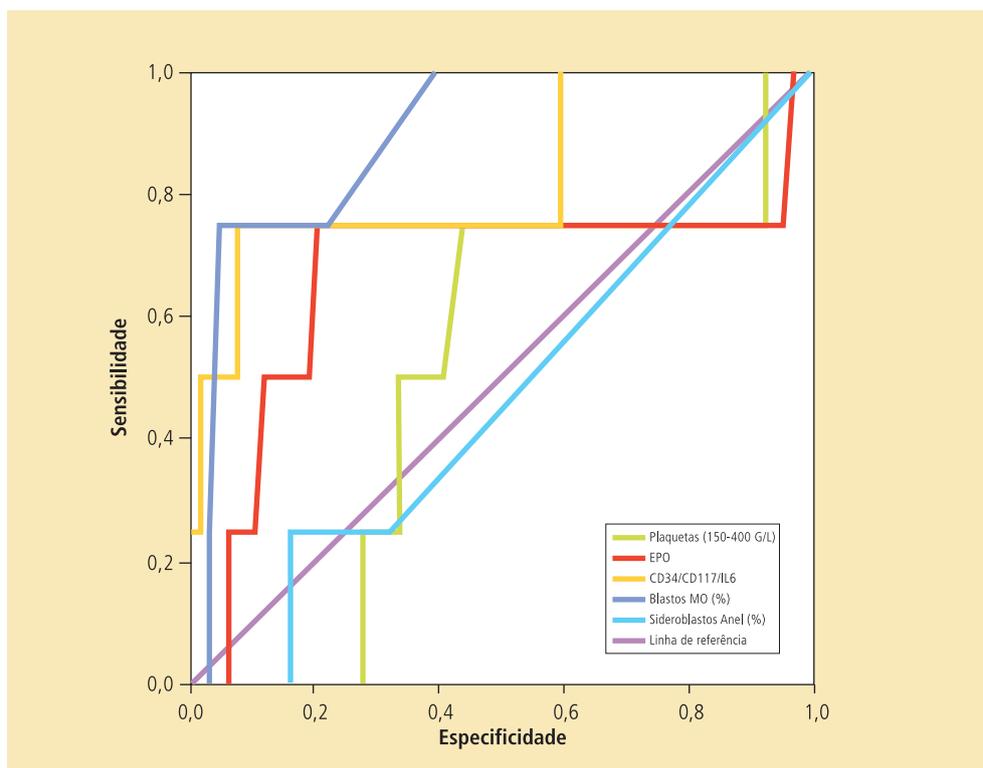


Figura A1 Curvas ROC para a evolução de LMA relativas às variáveis significantes.

Tabela A6 Áreas de baixo das curvas ROC para a evolução de LMA relativas às variáveis significantes

Variáveis	Área
Plaquetas (150-400 G/L)	0,511
EPO	0,668
CD34/CD117/IL6	0,83
Blastos MO (%)	0,899
Sideroblastos Anel (%)	0,466