



NUTRIÇÃO E ALTERAÇÕES EPIGENÉTICAS NA SÍNDROME MIELODISPLÁSICA

Emília Nobre Barata Roxo Cortesão

Faculdade de Medicina
Universidade de Coimbra
Mestrado em Nutrição Clínica



NUTRIÇÃO
E ALTERAÇÕES EPIGENÉTICAS
NA SÍNDROME MIELODISPLÁSICA

Emília Nobre Barata Roxo Cortesão

Coimbra, 2010

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra para prestação de provas no âmbito do Mestrado em Nutrição Clínica, sob orientação do Professor Doutor José Manuel Nascimento Costa e Professora Doutora Ana Bela Sarmiento Ribeiro.

AGRADECIMENTOS

Uma dissertação reúne contributos de várias pessoas. Desde o início do mestrado, contei com a confiança e o apoio de inúmeras pessoas e instituições. Sem aqueles contributos, esta investigação não teria sido possível. É, por isso, um prazer enunciar cada um deles e proceder ao seu reconhecido agradecimento.

Aos meus orientadores Professor Doutor José Manuel Nascimento Costa e Professora Doutora Ana Bela Sarmiento Ribeiro agradeço o apoio, a partilha do saber e o tempo que generosamente me dedicaram. Acima de tudo, obrigada pela sua crítica construtiva e atempada e por estimularem o meu interesse pelo conhecimento e pela vida académica.

Um sentido agradecimento à Doutora Adriana Teixeira, directora do serviço de Hematologia dos Hospitais da Universidade de Coimbra, pelo incentivo à realização deste trabalho e pela motivação, confiança e amparo durante esta caminhada. Pelos mesmos motivos agradeço também à Doutora Maria Isabel Sousa, presidente do Grupo Português de Síndrome Mielodisplásica.

A todos os meus colegas e, em especial, à Doutora Adriana Teixeira, à Doutora Maria Isabel Sousa, à Doutora Ana Isabel Espadana, à Doutora Emília Magalhães e ao Doutor Luís Rito por terem acreditado neste projecto e terem contribuído activamente no encaminhamento de doentes que permitiram a realização deste trabalho.

À Doutora Rosa Maia e à Doutora Luísa Frazão pela colaboração no estudo dos polimorfismos enzimáticos.

Ao Doutor Carlos Moucho, Doutora Lénia Jorge e Doutora Nélia Jerónimo pela realização dos estudos citogenéticos, imprescindíveis nesta patologia.

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

Ao Professor Doutor Santos Rosa, director da Faculdade de Medicina de Coimbra e director do serviço de Imunologia, pelo apoio e colaboração prestados ao longo deste tempo. Agradeço também à Doutora Vera Alves pelo contributo através dos estudos realizados por citometria de fluxo.

À minha colega e amiga de Mestrado, Doutora Ana Cristina Gonçalves, sem a qual não seria possível realizar o trabalho laboratorial, em particular os estudos moleculares. Um muito, muito obrigada!

À Doutora Amélia Pereira, directora do serviço de Medicina do Hospital Distrital da Figueira da Foz, agradeço o empenho e disponibilidade constante no envio de amostras e dados clínicos dos doentes.

Aos Enfermeiros do Serviço de Hematologia, sempre disponíveis.

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 o término deste projecto.

Aos meus amigos, pela amizade incondicional.

À Doutora Ana Isabel Espadana, colega e amiga, com quem tenho vindo a trabalhar desde que terminei a especialidade de Hematologia e a quem agradeço os preciosos conselhos, as críticas ou os louvores e, sobretudo, a amizade e o carinho que sempre manifestou ao longo destes anos.

À Laura e ao Nuno, pelo amor e alegria, pela compreensão e valiosa assistência nesta caminhada.

Aos meus pais, à minha irmã e à minha avó Luísa, obrigada pelo incentivo recebido ao longo destes anos, pelo tempo e sorriso que me dedicaram, pelo amor e atenção sem reservas.

O meu profundo e sentido agradecimento a todas as pessoas que contribuíram para a concretização desta dissertação, estimulando-me intelectual e emocionalmente.

ÍNDICE

RESUMO	XI
ABSTRACT	XV
ABREVIATURAS	XIX
1. Introdução	1
1.1. Síndrome Mielodisplásica	1
1.1.1. Definição e breve perspectiva histórica	1
1.1.2. Epidemiologia	2
1.1.3. Etiologia	3
1.1.4. Fisiopatologia	6
1.1.4.1. Susceptibilidade a lesão e/ou instabilidade genómica	9
1.1.4.2. Modificações epigenéticas	10
1.1.4.3. Alteração nas vias de sinalização celular	21
1.1.4.4. Desregulação do sistema imune e ambiente medular	30
1.1.4.5. Alterações genéticas/citogenéticas	31
1.1.5. Características clínicas	38
1.1.6. Características laboratoriais	39
1.1.7. Diagnóstico e classificação	41
1.1.8. Tratamento	43
1.1.9. Prognóstico e Evolução	46
1.2. Nutrição, epigenética e Síndrome Mielodisplásica	47
2. Objectivos	51

3. Materiais e Métodos.....	53
3.1. Reagentes	53
3.2. Estudos realizados em doentes com Síndrome Mielodisplásica e controlos	54
3.2.1. Selecção e caracterização de doentes	54
3.2.2. Doseamento do ácido fólico e da vitamina B12	55
3.2.3. Análise genotípica das variantes polimórficas da enzima metilenotetrahidrofolatoredutase	56
3.3. Estudos realizados na linha celular de Mielodisplasia humana	57
3.3.1. Cultura da linha celular de Mielodisplasia humana	57
3.3.2. Incubação da linha celular de Mielodisplasia humana com decitabina e tricostatina A	58
3.3.3. Análise da densidade e proliferação celular	58
3.3.4. Análise da morte celular por citometria de fluxo	60
3.4. Estudos realizados em doentes com Síndrome Mielodisplásica, controlos não neoplásicos e na linha celular de Mielodisplasia humana	62
3.4.1. Extracção e quantificação de ADN genómico	62
3.4.2. Análise do perfil de metilação dos genes <i>p15</i> e <i>p16</i>	63
3.4.2.1. Modificação de ADN com Bissulfito de Sódio	63
3.4.2.2. <i>Methylation-Specific Polymerase Chain Reaction (MS-PCR)</i> ..	64
3.5. Análise Estatística	65
4. Resultados	67
4.1. Caracterização dos doentes com Síndrome Mielodisplásica e controlos não neoplásicos	67
4.2. Avaliação do perfil de metilação dos genes <i>p15</i> e <i>p16</i> em doentes com Síndrome Mielodisplásica e sua relação com o metabolismo do folato e B12	69
4.2.1. Avaliação do perfil de metilação dos genes <i>p15</i> e <i>p16</i>	69
4.2.2. Análise dos doseamentos séricos do folato e vitamina B12 ...	73
4.2.3. Caracterização genotípica das variantes polimórficas da enzima metilenotetrahidrofolatoredutase	81

4.2.3.1. Frequência dos diferentes genótipos da mutação MTHFR C677T	81
4.2.3.2. Frequência dos diferentes genótipos da mutação MTHFR A1298C	84
4.3. Caracterização dos doentes com Síndrome Mielodisplásica que evoluíram para Leucemia Mieloblástica Aguda.....	88
4.4. Estudos realizados na linha celular de Mielodisplasia humana	88
4.4.1. Caracterização da linha celular de Mielodisplasia humana	89
4.4.2. Efeito dos fármacos decitabina e tricostatina A na proliferação e morte das células F36P da linha celular de Mielodisplasia humana	90
4.4.2.1. Curvas de proliferação celular	90
4.4.2.2. Avaliação da morte celular induzida pela decitabina e tricostatina A por citometria de fluxo	92
5. Discussão	95
5.1. Análise do perfil de metilação e do metabolismo do folato/B12 na Síndrome Mielodisplásica	95
5.2. Análise do potencial terapêutico da decitabina e tricostatina A na Síndrome Mielodisplásica	103
6. Conclusão	107
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	109

R E S U M O

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.

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 e/ou epigenéticas hereditárias ou adquiridas pode também estar presente.

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

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 com o risco de evolução da doença para leucemia mieloblástica aguda (LMA), conferindo mau prognóstico.

Os grupos metilo necessários para as reacções de metilação podem derivar de produtos da dieta. Permanece no entanto controversa a relação entre a ingestão/*status* do folato e a metilação do ácido desoxirribonucleico (ADN). Os polimorfismos funcionais em genes chave, nomeadamente, da enzima metilenotetrahidrofolatoredutase (MTHFR), também podem influenciar a metilação do ADN. São conhecidos dois polimorfismos no gene da MTHFR, C677T e A1298C. Enquanto alguns estudos relacionam o polimorfismo C677T com redução da metilação do dinucleótido CpG 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.

Até à data, a LMA e a SMD constituem desafios terapêuticos porque o único tratamento curativo é o transplante de medula. No entanto, a maioria destes doentes é idosa e, por isso, mais susceptível aos efeitos colaterais da quimioterapia. Estas dificuldades podem ser ultrapassadas por terapêuticas dirigidas a alvos moleculares ou à modulação dos mecanismos epigenéticos envolvidos na patogénese destas neoplasias.

Os objectivos deste trabalho foram avaliar o envolvimento da epigenética e o papel da nutrição, em particular o *status* do folato e da vitamina B12, na Síndrome Mielodisplásica, correlacionando-os com a clínica, incluindo a evolução para LMA, sobrevivência e grupos de risco prognóstico. Além disso, pretendeu-se analisar o potencial terapêutico de fármacos hipometilantes e/ou inibidores das deacetilases das histonas (HDACi), identificando a associação com menor dose e maior eficácia terapêutica.

Para o efeito, estudámos o perfil de metilação dos genes supressores tumorais, *p15* e *p16*, em células da medula óssea de 26 doentes com SMD de novo e de 8 controlos não malignos, utilizando a *Polymerase Chain Reaction* (PCR) específica de metilação (MS-PCR). A determinação das concentrações séricas de folato e B12 foi avaliada por quimioluminescência. Os polimorfismos da MTHFR (C677T e A1298C) foram analisados por *PCR Restriction Fragment Length Polymorphism* (RFLP).

O potencial terapêutico de moduladores epigenéticos em monoterapia e em associação foi avaliado em uma linha celular de SMD em cultura, através de ensaios de proliferação celular recorrendo ao teste de azul de tripano e/ou de Alamar. O tipo de morte celular foi analisado por citometria de fluxo através da dupla marcação com anexina V e iodeto de propídeo.

Os doentes têm idade mediana de 74 anos (33-84), com um ratio Masculino/Feminino de 14/12. Os subtipos de SMD segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS) são: Citopenia Refractária com displasia multilinear (CRDM) (n=9), Anemia Refractária (AR) (n=5), Anemia Refractária com Excesso de Blastos (AREB) -1 (n=3), AREB-2 (n=5), Síndrome 5q- (n=1) e Leucemia Mielomonocítica Crónica (LMMC) (n=3) com o seguinte *International Prognostic Scoring System* (IPSS): baixo (n=7), intermédio-1 (n=13) e intermédio-2 (n=6). Sete dos doentes evoluíram para LMA, com uma mediana de *follow-up* de 28 meses (16-71).

Os resultados preliminares mostram que 50% dos doentes apresentam pelo menos um gene metilado. A metilação do gene *p15* está presente em 38% dos

doentes, enquanto a do gene *p16* ocorre em 35% dos doentes. No entanto, em todos os doentes com AR e Síndrome 5q- observou-se metilação da região promotora do gene *p15*. Por outro lado, a metilação do gene *p16* ocorre em todos os subtipos com excepção dos doentes com AREB-2 e LMMC.

A metilação dos genes *p15* e *p16* varia com os níveis séricos de ácido fólico e vitamina B12, sendo que os doentes com valores mais baixos de B12 apresentam sobretudo metilação do gene *p15*. No entanto, o genótipo da MTHFR parece influenciar a metilação, uma vez que a maioria dos doentes heterozigóticos para o polimorfismo C677T apresentam metilação dos genes *p16* e/ou *p15*. O genótipo CT do polimorfismo C677T da MTHFR parece ser factor de risco para SMD (Odds Ratio - OR 3,982).

Os estudos efectuados na linha celular de SMD mostram que os moduladores epigenéticos, hipometilantes e HDACi (Decitabina - DAC e Tricostatina A - TSA, respectivamente) induzem diminuição da proliferação das células F36P de modo dependente da concentração, do tempo de exposição, do modo e esquema de administração, induzindo morte celular preferencialmente por apoptose.

Em conclusão, este estudo sugere um papel dos genes *p15* e *p16* na SMD. Os níveis séricos de ácido fólico e vitamina B12 poderão estar relacionados com a metilação dos genes *p15* e *p16*, podendo estes ser influenciados pelo genótipo da MTHFR.

Além disso, os hipometilantes e/ou HDACi 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 dos doentes com SMD.

Palavras-chave: síndrome mielodisplásica, epigenética, metilação, folato, B12, polimorfismos MTHFR

A B S T R A C T

Myelodysplastic syndrome (MDS) constitute a heterogeneous group of hematologic disorders characterized by peripheral blood cytopenia(s) in the presence of hypercellular bone marrow with features of ineffective hematopoiesis due to exaggerated apoptosis and abnormal bone marrow blast proliferation. It is associated with a high risk of progression to acute leukaemia with an overall short survival.

The aetiology and pathogenesis of MDS remain poorly characterized. Underlying the marrow failure and peripheral cytopenias common in MDS, clonal proliferation of hematopoietic progenitor cells with inherited or acquired genetic mutation is deranged.

In spite of a multiplicity of endeavours to elucidate the molecular mechanisms of MDS, little is known about the pathogenesis of the first trigger or the early stage of MDS. Several signal transduction pathways are under focus.

Aberrant methylation patterns are other mechanisms common in human oncological disorders, especially in hematopoietic neoplasms. Many genes may be involved, and recently the cyclin-dependent kinase inhibitor (CDKI) gene, namely *p15*, frequently inactivated in MDS by aberrant methylation of 5'CpG islands, has been correlated with the risk of disease progression toward AML and with poor prognosis.

The methyl groups needed for all biological methylation reactions are derived from dietary methyl donors. Large body of data derived from a variety of studies suggests that folate intake/status modulates DNA methylation in humans, but not all studies have found a relationship between folate and methylation. Functional polymorphisms in key genes may also influence DNA methylation namely those related with methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR), C677T e A1298C. It is associated with reduced methylation of CpG DNA in human lymphocytes under conditions of low folate status. Although

less is known about the A1298C polymorphism in the MTHFR gene, most studies have failed to show a relationship between this polymorphism alone and markers of disturbed DNA methylation.

Until now AML and MDS are therapeutic challenges because the only curative treatment is bone marrow transplantation. But, the majority of these patients are of advanced age and, thus, more susceptible to the adverse side effects of cytotoxic chemotherapies. These difficulties may be overcome by therapies which molecularly target signalling pathways or epigenetic phenomena that are involved in the pathogenesis of these malignancies.

The goals of this study were the analysis of epigenetics involvement and nutrition, namely the status of folate and vitamin B12, in Myelodysplastic Syndrome, and its correlation with clinic, evolution to acute leukemia, survival and risk prognostic groups. We also analysed the therapeutic potential of hypomethylants and/or histone desacetylases inhibitors, in order to identify the best therapeutic association.

We have examined the methylation status of the cell cycle regulators *p15/p16* using a methylation specific PCR in CD34 BM cells populations collected at diagnosis from 26 patients with MDS and in 8 controls (ITP). The serum folate/vitamin B12 concentrations were determined by chemoluminescence and the MTHFR polymorphisms (C677T and A1298C) by PCR-RFLP.

The therapeutic potential of epigenetic modulators isolated or in combination was analyzed in cell lines of MDS in culture, using proliferation and viability assays with blue triptan and Alamar. Cell death was analyzed by flow cytometry.

The median age was 74 years (33-84), gender M/F=14/12, WHO subtypes: RCMD (n=9), RA (n=5), RAEB-1 (n=3), RAEB-2 (n=5), 5q- Syndrome (n=1), CMML (n=3) and IPSS: low (n=7), intermediate-1 (n=13) and intermediate-2 (n=6). Seven of the patients progressed to AML, with a median follow-up of 28 months (16-71).

Our preliminary results show that 50% of cases had at least one methylated gene promoter: *p15* methylation occurred in 38%, while *p16* methylation occurred in 35% of MDS patients. *p15* methylation was present in all the RA and 5q- Syndrome patients. *p16* methylation was observed in all subtypes except RAEB-2 and CMML patients.

The methylation of *p15* and *p16* genes varies with folate and B12 levels, patients with lower B12 levels present mainly *p15* methylation. On the other hand, the MTHFR genotype seems to influence methylation, since most CT

patients present *p15* ou *p16* methylation. This genotype seems to be a risk factor for MDS (OR 3,982).

Cell line studies show that epigenetic modulators, DAC and TSA, induce lower proliferation and cellular viability of F36P cells, dependent of concentration, time of exposure, administration schedule and promoting cell death mainly by apoptosis.

In conclusion, *p15* and *p16* seem to be an event in the MDS development and concentrations of serum folate/vitamin B12 might be associated with the risk of promoter methylation in tumor-specific genes. MTHFR genotypes may influence theses reactions. Hipomethylants and HDACi could be a therapeutic approach in MDS, isolated or in combination, with a consequent reduction of toxicity and better quality of life for our patients.

Key words: myelodysplastic syndrome, epigenetics, methylation, folate, B12, MTHFR polymorphisms

ABREVIATURAS

- ADN** – ácido desoxirribonucleico
- ALIPs** – precursores imaturos em localização anormal
- AML1** – *acute myeloid leukemia 1*
- APAF-1** – *apoptotic protease-activating factor-1*
- AR** – Anemia Refractária
- ARDM** – Anemia Refractária com displasia multilinear
- AREB** – Anemia Refractária com Excesso de Blastos
- AREB-t** – Anemia Refractária com Excesso de Blastos em transformação
- ARNm** – ácido ribonucleico mensageiro
- ARSA** – Anemia Refractária com Sideroblastos em Anel
- ATG** – globulina antitimócito
- CDC** – *Cell-Division Control*
- c-FLIP** – *FADD-like interleukin-1 beta-converting enzyme* (FLICE) celular
- CRDM** – Citopenia Refractária com displasia multilinear
- DAC** – decitabina
- dATP** – desoxiadenosina trifosfato
- DISC** – complexo sinalizador de indução de morte
- DNMT** – ADN metiltransferases
- ECACC** – *European Collection of Cell Cultures*
- EPO** – eritropoietina
- EPO-R** – receptor da eritropoietina
- ERK** – *Extracellular Signal-Regulated Kinase*
- ETS** – *E-twenty six*
- EVI-1** – *Ecotropic viral integration site 1*
- 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 – factores de transcrição
G-CSF – factor estimulador de colónias de granulócitos
GDP – guanosina difosfato
GM-CSF – factor 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
IAP – proteínas inibidoras da apoptose
ICE – enzima de conversão da interleucina-1 α
IL-3 – interleucina 3
IL-6 – interleucina 6
IP – iodeto de propídeo
IPSS – *International Prognostic Scoring System*
IRF-1 – factor 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
MAPK – *Mitogen-Activated Protein Kinases*
MBP – *Methyl Binding Proteins*
M-CSF – factor estimulador das colónias de monócitos
MEK – *MAP Kinase/ERK Kinase*
MLL – *myeloid/lymphoid ou mixed lineage leukemia*
MN1 – meningioma 1
MS-PCR – *Methylation-Specific Polymerase Chain Reaction*
MTHFR – metilenotetrahidrofolatoredutase
MTRR – 5-metiltetrahidrofolato homocisteína metiltransferase
NADH – nicotinamida adenina dinucleotídeo
NADPH – fosfato de nicotinamida adenina dinucleotídeo

NF1 – neurofibromatose 1
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 – factor 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 – receptor da tirosina cinase
SAH – s-adenosilhomocisteína
SAM – adenosilmetionina
SMD – Síndrome Mielodisplásica
SOD – superóxido dismutase
SPSS – *Statistical Package for Social Sciences*
SRC – Sarcoma de Rous
SSC – *side scatter*
STATs – *Signal Transducers and Activators of Transcription*
TEL – *ETS variant gene 6*
TGF- β – factor de crescimento tumoral β
TNF- α – factor de necrose tumoral α
TPO – trombopoietina
TRAIL – ligando indutor da apoptose relacionado com o TNF
TRAIL-R – receptor do ligando indutor da apoptose relacionado com o TNF
TSA – tricostatina A
VEFG – factor de crescimento do endotélio vascular



Introdução

1.1. Síndrome Mielodisplásica

1.1.1. Definição e breve perspectiva histórica

As Síndromes Mielodisplásicas (SMD) são um grupo heterogêneo de doenças clonais da célula estaminal hematopoiética caracterizadas por medula hipercelular e displásica, com hematopoiese activa, mas ineficaz, que conduz à insuficiente produção de células sanguíneas periféricas (citopenias). A denominação errônea 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 classificação das SMD evoluíram ao longo dos anos à medida que o conhecimento sobre a patologia foi aumentando. A primeira descrição de SMD foi efectuada 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 (Hellström-Lindberg E., 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 (Hellström-Lindberg E., 2008).

Mais tarde, em 1953, Block e a sua equipa expandiram o conceito de modo a incluir neste tipo de entidades nosológicas as citopenias atingindo todas as linhas celulares. 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, mas contrariamente, faleciam devido às complicações infecciosas secundárias às citopenias. Deste modo, a terminologia *pré-leucemia* caiu em desuso e o termo *síndrome mielodisplásica* tornou-se reconhecido há mais de 50 anos (Nimer S. D., 2008).

Numa conferência sobre leucemias não classificadas, em 1975, Marcel Bessis e Jean Bernard 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 heterogéneo de doenças por Síndromes Mielodisplásicas (Nimer S. D., 2008).

1.1.2. Epidemiologia

As SMD são as neoplasias hematológicas mais frequentes nos idosos (idade mediana 70 anos), provavelmente reflectindo a intervenção prolongada de múltiplos agentes leucemogénios para o desenvolvimento da doença (Hellstrom-Lindberg E., 2008). De facto, excepto nas SMD secundárias à radiação ou quimioterapia administrada por outra neoplasia, este tipo de patologias é rara antes dos 50 anos (Smith M. T., 2002). 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 maior parte dos casos diagnosticados na infância estão relacionados 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, ao contrário das anomalias do cromossoma 7 que são frequentes nas crianças. De facto, em cerca de 30% dos casos de SMD em crianças são detectadas anomalias do cromossoma 7, enquanto nos adultos estas só se observam em 10% dos doentes (Niemeyer C. M., 2002).

A verdadeira incidência de SMD é difícil estabelecer, devido a diversos factores, 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 3-5/100000 indivíduos/ano na população em geral, aumentando para 20-50/100000 indivíduos/ano após os 70 anos de idade (Germing U., 2004; Williamson P. J., 1994; Aul C., 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 C., 2001).

No entanto, a incidência da doença tem-se mantido estável; o aumento inicial verificado reflecte provavelmente um diagnóstico precoce e melhorado, e a tendência crescente em investigar doentes idosos citopénicos (Aul C., 1998; Reizenstein P., 1991).

A SMD tem maior incidência no sexo masculino, sendo o ratio masculino: feminino de 1.4:1 (Ma X., 2007).

1.1.3. 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 patologia. Além disso, o stresse 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 membro tem o diagnóstico de SMD, não existe evidência de que esta patologia tenha uma base hereditária (Strom S. S., 2005).

Numa minoria de casos (15%), a exposição prévia a determinados elementos, como solventes e pesticidas, quimioterapia, radiação ionizante ou benzeno, está identificada como factor de risco, designando-se SMD secundária. 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 anomalias cromossómicas, embora qualitativamente semelhantes às SMD *de novo*, estão presentes em

diferentes proporções, 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, respectivamente.

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
	Factores 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)

A radiação ionizante é um agente leucemogénico bem conhecido, cujos efeitos são dependentes da dose e duração de exposição. Os mecanismos incluem quebras nas hélices do ácido desoxirribonucleico (ADN) que podem resultar em deleções ou translocações cromossómicas. Um estudo envolvendo neoplasias hematológicas induzidas por radiação, em sobreviventes da bomba atómica, mostra que estas estão associadas a mutações do gene *acute myeloid leukemia 1* (AML1), em particular nos doentes que desenvolveram SMD e/ou LMA (Harada H., 2003).

Por outro lado, os fármacos anticancerígenos 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, tendo 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 cromossómica. Além disso, nos doentes com linfoma, mieloma ou tumor sólido, submetidos a transplante autólogo de medula, o risco de desenvolver SMD

relacionada com o tratamento de quimioterapia varia, segundo os estudos, entre 1 a 12%. A maioria dos casos ocorre 5 anos após o transplante e os factores de risco incluem a idade e o tipo de condicionamento (Del Canizo M., 2000).

Os agentes alquilantes podem causar deleções, monossomias ou perda dos braços longos dos cromossomas 5 e/ou 7, que podem resultar da maior susceptibilidade à quebra centromérica, após exposição a estes fármacos. As mais comuns incluem deleções ou perda do 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 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 patologias da linha mielóide, como a leucemia promielocítica, devido à sua taxa de sobrevivência elevada. 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 (Strom S. S., 2008).

Recentemente tem sido referida uma hipótese que procura relacionar a existência de polimorfismos de determinados genes que codificam proteínas envolvidas na metabolização de factores ambientais, com a maior susceptibilidade para a ocorrência de SMD. Como exemplos podemos citar as enzimas envolvidas no metabolismo dos carcinogénios, na defesa contra o stresse oxidativo e na reparação do ADN (Jawad M., 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 Y, 2010). 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 este facto (Smith M.T., 2000). Por outro lado, a exposição a elevadas concentrações de benzeno provoca, claramente, toxicidade medular, normalmente aplasia, que pode evoluir para mielodisplasia e/ou LMA (Rothman N., 1997). A reduzida actividade da enzima fosfato de nicotinamida adenina dinucleotídeo (NADPH) quinona oxirreductase, que inactiva o metabolito do benzeno altamente tóxico, a benzoquinona, está associada com o aumento do risco leucémico (Smith M. T., 2001).

As principais diferenças entre SMD relacionada com o tratamento e SMD *de novo* incluem: idade de apresentação mais jovem, elevada incidência de evolução para leucemia, citopenias mais graves, displasia medular mais marcada (displasia trilinear), diminuição da celularidade medular com fibrose, elevada incidência

de anomalias clonais citogenéticas e resistência à terapêutica. Globalmente, estes doentes apresentam um pior prognóstico (Bacher U., 2007).

1.1.4. Fisiopatologia

A etiologia e patogénese 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.

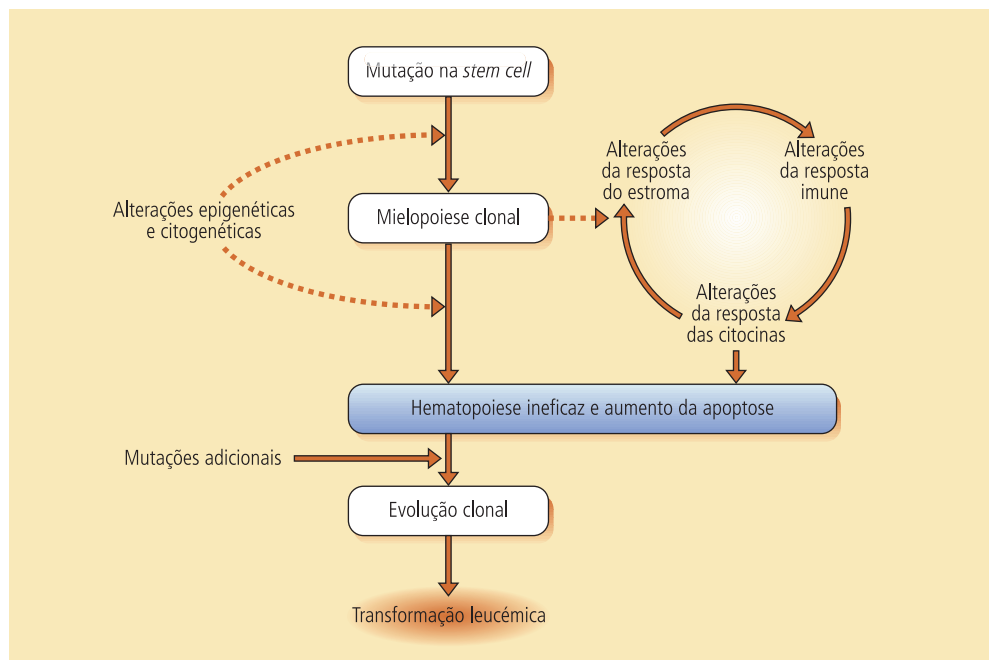
Assim, a história natural da SMD é altamente variável, reflectindo o conjunto de alterações citogenéticas, genéticas e epigenéticas associadas a esta patologia. Por outro lado, o desenvolvimento da SMD e a sua frequente progressão para leucemia aguda ocorre em várias etapas e engloba múltiplos mecanismos e factores, hereditários e ambientais, que atingem a célula estaminal hematopoiética, levando à alteração da função celular e à emergência e consequente evolução de um clone pré-maligno (Figura 1) (Pfeilstöcker M., 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 S. D., 2008).

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 proliferação acelerada 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 activados (na tentativa de eliminar o clone maligno), pela secreção de proteínas de morte celular (Fas/Fas-Ligando) e/ou citocinas pró-inflamatórias (factor de necrose tumoral - TNF- α e interleucina-6 - IL-6), pela expressão de proteínas pró-apoptóticas da família Bcl-2, e/ou através da deficiência de factores de crescimento hematopoiéticos (defeitos do estroma) (Nimer S. D., 2008; Mufti G.J., 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 inactivação do gene supressor tumoral *p53* tem sido detectada 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 S. D., 2008; Valko M., 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 H.T., 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, 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 stresse oxidativo (Farguhar M. J., 2003; Bowen D. T., 1998), em particular com a produção de radicais livres de oxigénio (Valko M., 2007) e a disfunção mitocondrial (Gatterman N., 1999). O stresse oxidativo persistente pode também causar respostas adaptativas nas células tumorais, conferindo resistência à apoptose (Toyokuni S., 1995) e, conseqüentemente, à terapêutica (Ziemann C., 1999). Alguns estudos mostram expressão ou actividade aumentada de antioxidantes derivados de tióis, assim como de enzimas antioxidantes, como a superóxido dismutase, a glutathiona peroxidase e a catalase, em alguns tecidos tumorais quando comparados com controlos normais (Ziemann C., 1999).

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 (Campioniet D., 2005). O mecanismo pelo qual o TRAIL elimina as células é desconhecido. Uma hipótese é a expressão diferencial dos receptores apoptóticos do TRAIL, TRAIL-R1 e -R2, também denominados, DR4 e DR5, e/ou dos seus receptores anti-apoptóticos, TRAIL-R3 e -R4, também designados por receptores *decoy*, DcR1 e DcR2 (Dae Young, 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) semelhante ao domínio de morte associado à proteína Fas (FADD), 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 A., 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 inactivação deste gene tem vindo a ser associada com o risco de evolução da doença para LMA, conferindo mau prognóstico (Hirai H., 2003).

Os grupos metilo necessários para as reacções de metilação podem derivar de produtos da dieta como o folato e a vitamina B12 (Ulrey C. L., 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 metiltetrahidrofolato reductase (MTHFR). São conhecidos dois polimorfismos no gene da 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 défice de folato, pouco se sabe sobre a influência do polimorfismo isolado A1298C e a alteração da metilação do ADN (Dale M. C., 2005).



FIGURA 2

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

(Adaptado de Stefan de Vogel, 2008).

1.1.4.1. Susceptibilidade 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 efectuada por análise citogenética e estudos de inactivação do cromossoma X em doentes com SMD (Abrahamson G., 1991; Delforge M., 2003). No entanto, também existe suporte científico de que as anomalias citogenéticas, frequentemente observadas nesta patologia, podem ser adquiridas durante a progressão da doença, não reflectindo o evento clonal inicial (Delforge M., 2003; Nilsson L., 2002). Independentemente da instabilidade genómica ser um evento primário ou secundário, tem um papel importante na patogénese da SMD, evidenciada pelas alterações cariotípicas comuns nesta patologia. Estas anomalias citogenéticas resultam da acumulação da lesão genómica e/ou da falência de reparação da lesão do ADN.

Por outro lado, o stresse oxidativo parece igualmente implicado na fisiopatologia da SMD. Alguns autores têm demonstrado existir uma associação entre défices e/ou polimorfismos de enzimas anti-oxidantes, como a glutationa transferase teta 1 (GSTT1), a NADPH quinona oxirredutase (NQO1) (Chen H., 1996; Farquhar M. J. e Bowen D. T., 2003), a superóxido dismutase (SOD) (Gonçalves A. C. *et al.*, 2009) e o aumento do risco de SMD. De facto, vários estudos mostram que o desequilíbrio redox induzido pelo stresse 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 M., 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 conseqüente instabilidade cromossómica. Além disso, a redução do comprimento do telómero tem sido reportada como factor de mau prognóstico nos doentes com SMD (Engelhardt M., 2004; Ohyashiki J. H., 1994).

1.1.4.2. Modificações epigenéticas

Os diversos tipos celulares nos organismos multicelulares 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 adulto 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, 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 M., 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. 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 A. P., 2007), a epigenética mantém a integridade do genoma e a identidade celular (Weber M., 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 afectar a estrutura das proteínas da cromatina (código das histonas), entre outras, ambas potencialmente reversíveis (Yoo C. B., 2006).

De facto, a metilação do ADN é um importante mecanismo epigenético de regulação da expressão dos genes, da manutenção da integridade e estabilidade do ADN, das modificações cromossómicas e do desenvolvimento de mutações (Mulero-Navarro S., 2008). Consiste na adição de um grupo metilo ao C5 do anel de resíduos de citosina que precedem as guaninas, os dinucleótidos CpGs, através das enzimas ADN metiltransferases, com formação de metilcitosina. Esta reacção utiliza S-adenosil-metionina (SAM) como dador de grupos metilo.

O genoma humano apresenta uma percentagem muito pequena de dinucleótidos 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 terminal 5' de aproximadamente 50% dos genes (Esteller M., 2008), nomeadamente genes supressores tumorais, ou outras regiões intergénicas, estando quase sempre não metilados (Figura 3). Por outro lado, estes dinucleótidos estão pouco representados no genoma global devido à desaminação espontânea da 5-metilcitosina em timidina.

Assim, numa célula normal, ocorre normalmente hipermetilação global do genoma e hipometilação localizada, sendo que a metilação está associada à inactivação da transcrição do gene correspondente (Figura 3). Este perfil de metilação altera-se em vários tipos de neoplasias, como representado na figura 3, levando ao silenciamento de genes supressores tumorais (Herman J. G., 2003).

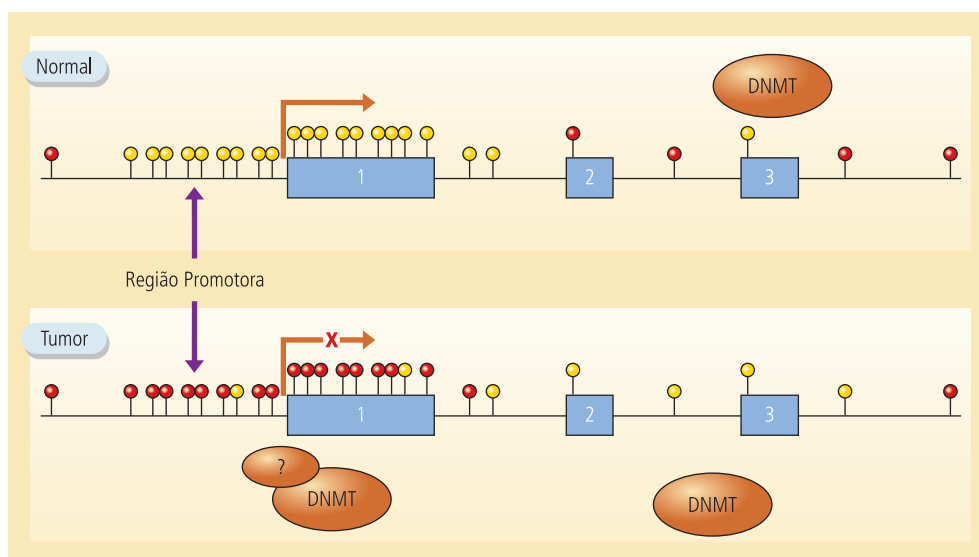


FIGURA 3

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).

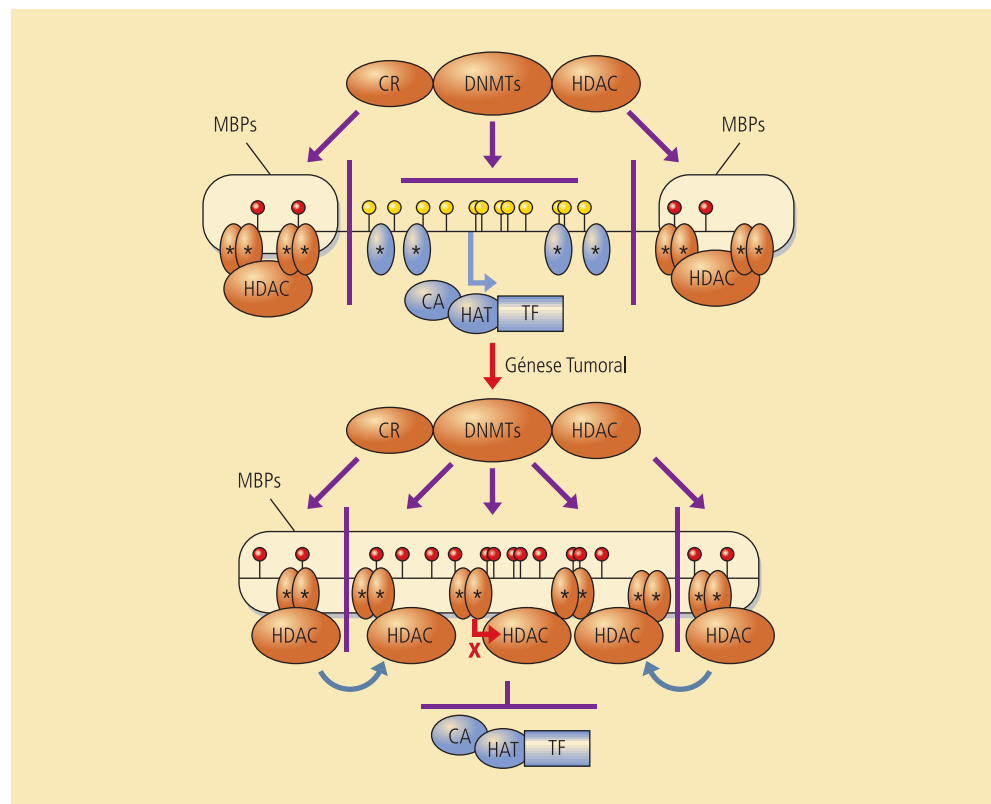
Numa célula normal, a maioria dos elementos intergénicos repetitivos de ADN estão metilados, contrariamente à maioria das regiões promotoras, excepto raros genes localizados no cromossoma X nas mulheres. Deste modo, a metilação fisiológica das regiões intergénicas poderá constituir um processo importante 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 génico promovido por deleção ou mutação e, como tal, serve como mecanismo de inactivação adicional dos genes supressores tumorais. Por outro lado, a ausência ou diminuição da metilação do ADN da região promotora está relacionada com activação 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 deacetilases das histonas (HDAC) (Figura 4). A metilação do ADN também pode inibir a transcrição bloqueando directamente a ligação dos factores de transcrição (Mulero-Navarro S., 2008).

FIGURA 4

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

Os locais desmetilados correspondem a genes activamente transcritos numa célula normal (círculos a amarelo), enquanto que os locais hipermetilados na célula cancerígena estão representados pelos 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).



A metilação do ADN é executada pelas ADN metiltransferases (DNMT), existindo três biologicamente activas: 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 inactiva por diferentes mecanismos. Através da sua interacção directa com as HDACs, podem recrutá-las para as regiões promotoras dos genes, prevenindo a transcrição desses genes. Este é um dos mecanismos que pode estar implicado na carcinogénese como representado na figura 4 (Herman J. G., 2003).

Outro mecanismo de modulação epigenética envolve a modificação das histonas. Existe um grande e crescente número destas modificações (acetilação/desacetilação, metilação/desmetilação, por exemplo), que podem actuar de uma maneira permissiva ou repressiva na transcrição génica.

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 projectam-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 4) (Quina A. S., 2006; Santos-Rosa H., 2005), a ubiquitinação, a fosforilação e a sumoilação. Estas modificações são reconhecidas por proteínas específicas que recrutam activadores da transcrição e co-repressores, estabelecendo uma ordem mais elevada da estrutura cromossómica (Hake S. B., 2004; Fischle W., 2003). Além disso influenciam o grau de compactação da cromatina e, conseqüentemente, a regulação da expressão génica. Deste modo, a acetilação dos resíduos de lisina nas histonas H3 e H4 está correlacionada com a cromatina aberta ou activa, o que permite o acesso de vários factores de transcrição às regiões promotoras dos genes alvo (Quina A. S., 2006; Santos-Rosa H., 2005). Pelo contrário, a deacetilação dos resíduos de lisina pelas HDACs resulta na compactação e inactivação desses genes (Yoo C. B., 2006).

Deste modo, as HATs e as HDACs estão envolvidas na modificação da cromatina, e, conseqüentemente, na regulação da transcrição génica. As HDACs incluem um grande número de proteínas agrupadas em três classes diferentes I a III. A deacetilação das histonas restaura a carga positiva dos resíduos de lisina no core das histonas, resultando numa interacção estreita entre o ADN e as histonas, o que mantém a cromatina num estado de silenciamento da transcrição. Contrariamente, a acetilação das histonas pode afectar 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 factores de transcrição. A quebra deste complexo leva à utilização de inibidores da histona deacetilase (HDACi) para a activação de genes supressores tumorais silenciados (Mihara K., 2007).

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

Recentemente, demonstrou-se que o padrão de metilação do ADN, observado no cancro, apresenta, geralmente, uma modificação evidente comparado com o do tecido normal (Esteller M., 2008).

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 A. P., 2007; Lund A. H., 2004; Herman J. G., 2003; Jones P.A., 2002) (Figura 5).

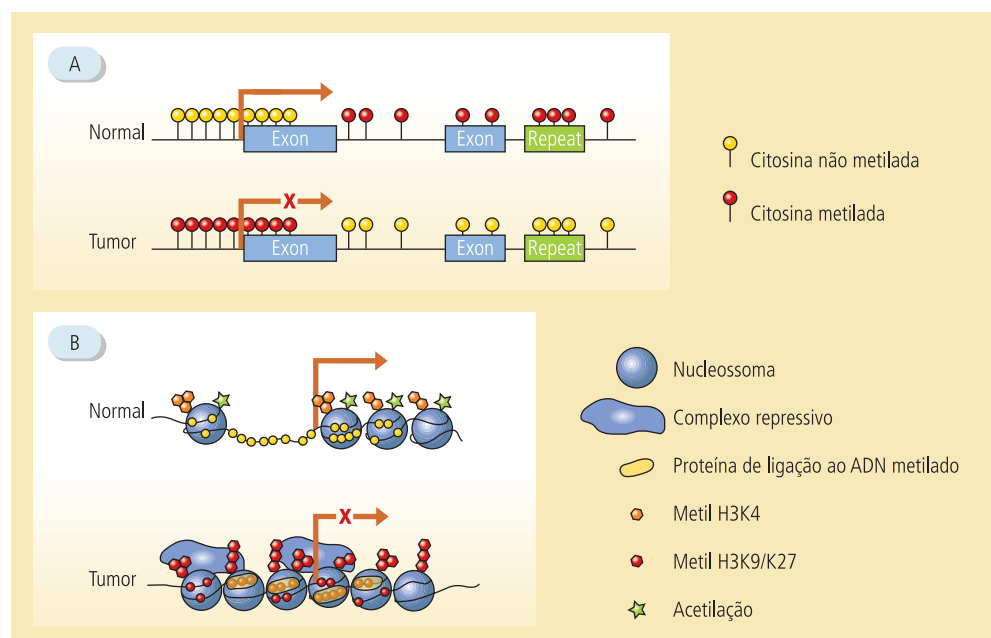
A expressão de vários genes supressores tumorais pode ser regulada por modificações epigenéticas sendo de salientar os genes *p15^{INK4B}* e *p16^{INK4A}*, entre outros, como referido na tabela 2. Estes genes controlam a transição da fase G1 para S do ciclo celular inibindo as cinases dependentes de ciclinas.

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 génica 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).



Estes genes supressores tumorais estão frequentemente inactivados por hipermetilação em vários tipos de cancro, nomeadamente em várias neoplasias hematológicas como a Leucemia Mielóide Crónica (LMC), a LMA e a Leucemia Linfoblástica Aguda (LLA) (Chim C. S., 2007; Galm O., 2005; Esteller M., 2002; Baylin S. B., 2000). Foi ainda demonstrada actividade anómala das HAT e HDAC em leucemias mielóides (Mihara K., 2007).

TABELA 2

Vias	Genes
Alterações do controlo do ciclo celular	Rb, <i>p16</i> , <i>p15</i> , <i>p14</i> , <i>p73</i>
Reparação da lesão de ADN	MLH1, O6-MGMT, GST-Pi, BRCA1
Apoptose	DAP cinase, caspase 8, TMS-1
Invasão da célula tumoral ou arquitectura tumoral	E-caderina, VHL, APC, LHB1, TIMP-3, THBS1
Resposta ao factor de crescimento	ER, RAR-beta, SOCS-1

Vias alteradas pela hipermetilação de promotores de genes no cancro

(Adaptado de Herman J. G., 2003)

No entanto, a alteração dos padrões de metilação está reconhecida há mais de 20 anos em vários tipos de cancro (Tabela 3). Vários estudos sugerem a importância da hipermetilação de genes promotores como por exemplo do gene *p16* no desenvolvimento de neoplasias, tais como a progressão para leucemia, da neoplasia mamária esporádica (Vallian S., 2009) ou de carcinomas colorectais nos estádios avançados (Goto T., 2009). A hipermetilação do gene *p15* (*CDKN2B* ou *p15^{INK4B}*) tem sido associada à SMD (Hopfer O., 2008; Aggerholm A., 2006; Teofili L., 2001; Preisler H. D., 2001; Uchida T., 1997) e à ocorrência ou progressão de leucemia (Kamb A., 1994; Nobori T., 1994).

De facto, a hipometilação global do genoma e a hipermetilação localizada têm sido descritas em neoplasias hematológicas (Attwood J. T., 2002; Nakayama M., 1998; Tsukamoto N., 1992), em particular do gene *CDKN2B* (que codifica a proteína *p15^{INK4b}*).

A célula progenitora hematopoiética normal sofre alterações sucessivas, estreitamente reguladas, durante o processo de diferenciação na respectiva célula madura. As transformações dinâmicas do imunofenótipo reflectem mudanças complexas do padrão de transcrição. Uma alteração molecular que modifique este perfil de expressão pode desviar este processo para a leucemogénese.

As neoplasias hematológicas envolvem, frequentemente, modificações de factores que controlam a transcrição e que envolvem a acetilação de histonas e a estrutura da cromatina. De facto, as alterações cromossómicas, estruturais

TABELA 3

Alterações epigenéticas em vários tipos de neoplasias	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> , <i>E-caderina</i> , <i>TMS1</i> e receptor 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 factor 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>IDA</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)

e numéricas, detectadas 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.

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 de clones malignos nas doenças hematológicas, pelo que os seus níveis elevados podem reflectir aumento da massa tumoral, estando associados a um prognóstico desfavorável (Roman J., 2001).

A presença de mutações em genes reguladores do ciclo celular, como o *p15*, *p16* e *p19*, têm sido raramente descritas na SMD. Pelo contrário, a hipermetilação do promotor do gene *p15^{INK4B}* tem sido observada em 30-50% destes doentes, correlacionando-se com a percentagem de blastos medulares (Quesnel B., 1998; Uchida T., 1997). Além disso, o grau de metilação correlaciona-se com o prognóstico e risco de evolução para LMA (Quesnel B., 1998).

Deste modo, a regulação epigenética aberrante, juntamente com as modificações genéticas, permitem a fuga aos mecanismos de controlo de crescimento, diferenciação e morte, originando o fenótipo maligno das células cancerígenas (Feinberg A. P., 2004; Herman J. G., 2003; Baylin S. B., 2000; Jones P. A., 1999). Como mencionado, a metilação dos dinucleótidos CpG concentrados nas regiões promotoras de alguns genes (ilhas CpG) resulta na sua inactivação funcional, sem alteração da sequência primária (Attwood J. T., 2002; Nakayama M., 1998; Tsukamoto N., 1992).

Assim, para além das alterações genéticas serem imprescindíveis na patogénese da SMD, as alterações epigenéticas também contribuem significativamente para o fenótipo da doença.

Além dos eventos epigenéticos poderem afectar a expressão génica, o efeito cumulativo das alterações genéticas e epigenéticas altera as vias de sinalização dos factores de crescimento, a regulação do ciclo celular e a apoptose. No entanto, o modo como cada um destes mecanismos interfere com a SMD difere do estágio e/ou dos subtipos de SMD. De facto, em alguns subtipos a hematopoiese é ineficaz devido ao elevado número de células em apoptose na medula. Por outro lado, nos subtipos de SMD com maior número de blastos, a taxa de apoptose está diminuída e a hematopoiese é ineficaz devido à anormal diferenciação dos blastos. Estas diferenças biológicas entre os vários subtipos de SMD sugerem uma abordagem terapêutica diferente segundo o mecanismo predominante. Assim, teoricamente, as SMD de baixo risco deveriam beneficiar de agentes anti-apoptóticos, enquanto a terapêutica citostática/citotóxica deveria ser mais apropriada na fase de proliferação blástica.

Como mencionado, a importância das alterações citogenéticas no desenvolvimento e progressão da SMD é evidente e está estabelecida na rotina clínica. O papel das modificações epigenéticas é actualmente um dos campos mais estimulantes na investigação clínica e pré-clínica, em particular nas neoplasias mielóides. Como já foi referido, este facto deve-se à possibilidade de reversão farmacológica das alterações epigenéticas, contrariamente às alterações genéticas, restaurando a função dos genes silenciados (Figura 6) (Garcia-Manero G., 2007). Além disso, 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 E. E., 1999), a terapêutica combinada de inibidores da metiltransferase e desacetilase da histona poderá constituir uma estratégia terapêutica na SMD (Figura 7).

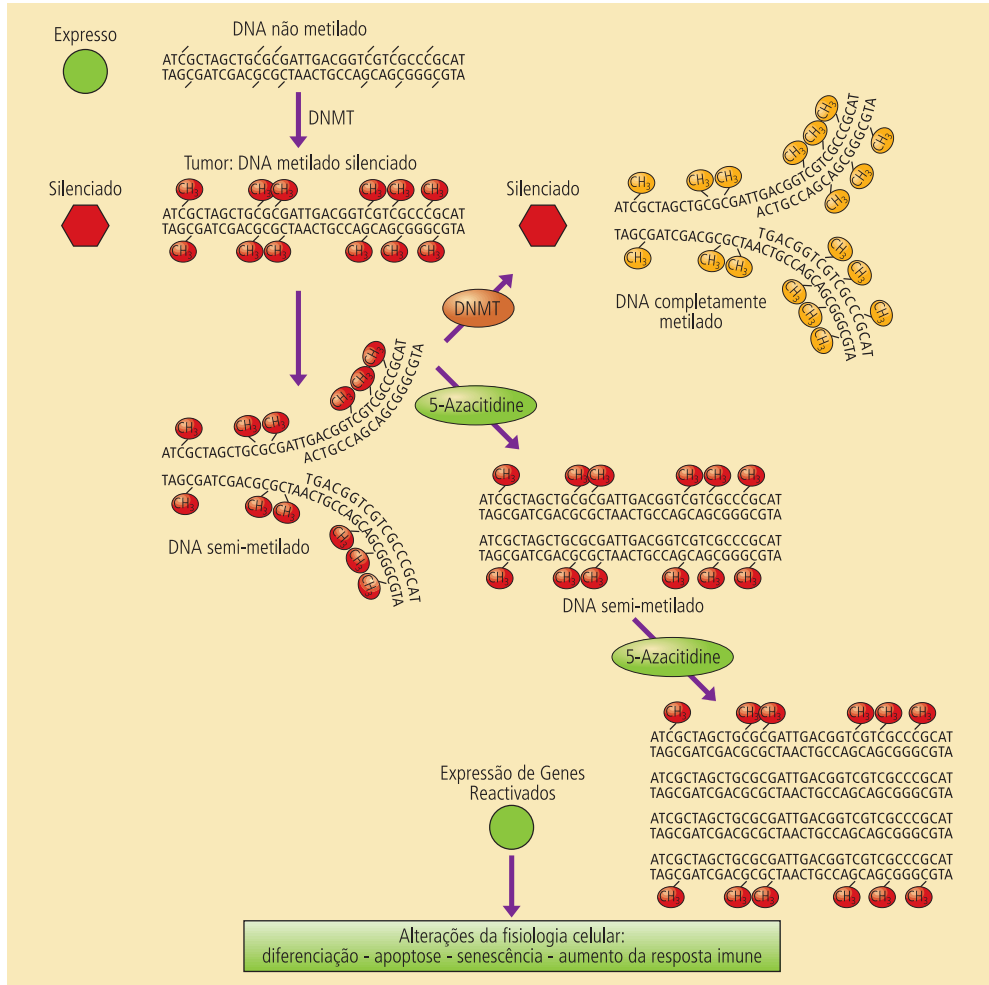


FIGURA 6
 Mecanismos prováveis de acção dos inibidores da metilação do ADN.
 (Adaptado de Issa J., 2007).

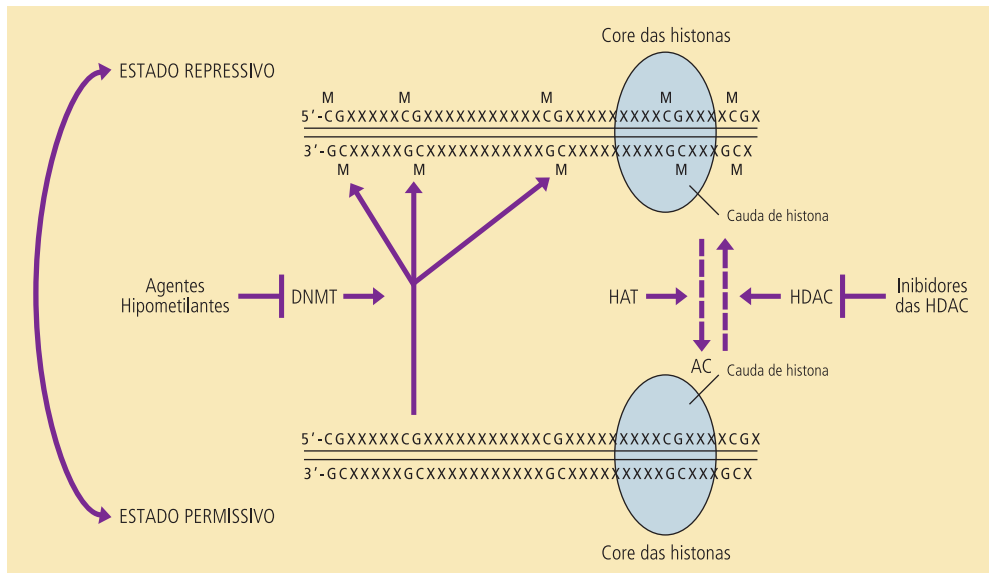


FIGURA 7
 Alvos da terapêutica epigenética.

Deste modo, a desregulação epigenética tem um importante papel no desenvolvimento e progressão das neoplasias, pelo que o estudo destas modificações constitui uma área bastante activa da investigação básica e clínica. O interesse clínico nestas alterações epigenéticas deve-se a dois factos: por um lado, a detecção de alterações epigenéticas específicas pode ser utilizada como marcador tumoral, no diagnóstico e prognóstico do cancro (Figura 8); 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 9 e 10).

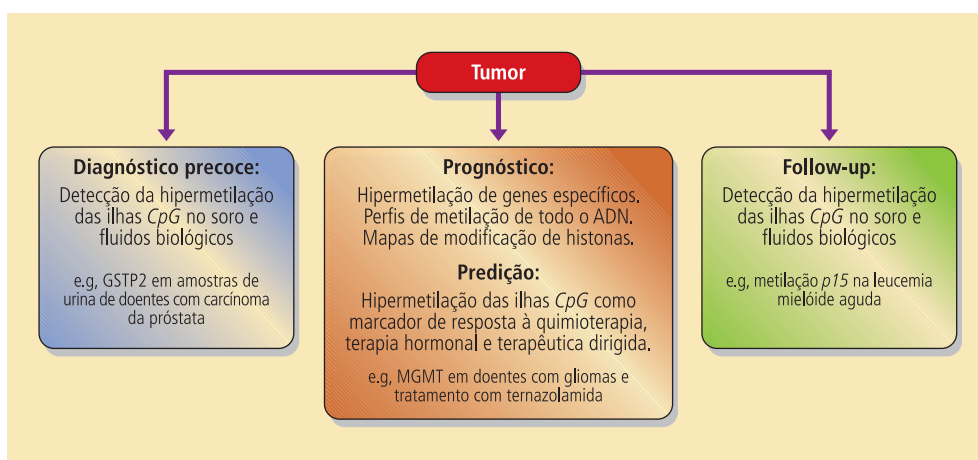


FIGURA 8

Importância da avaliação epigenética no cancro.

(Adaptado de Esteller M., 2008).

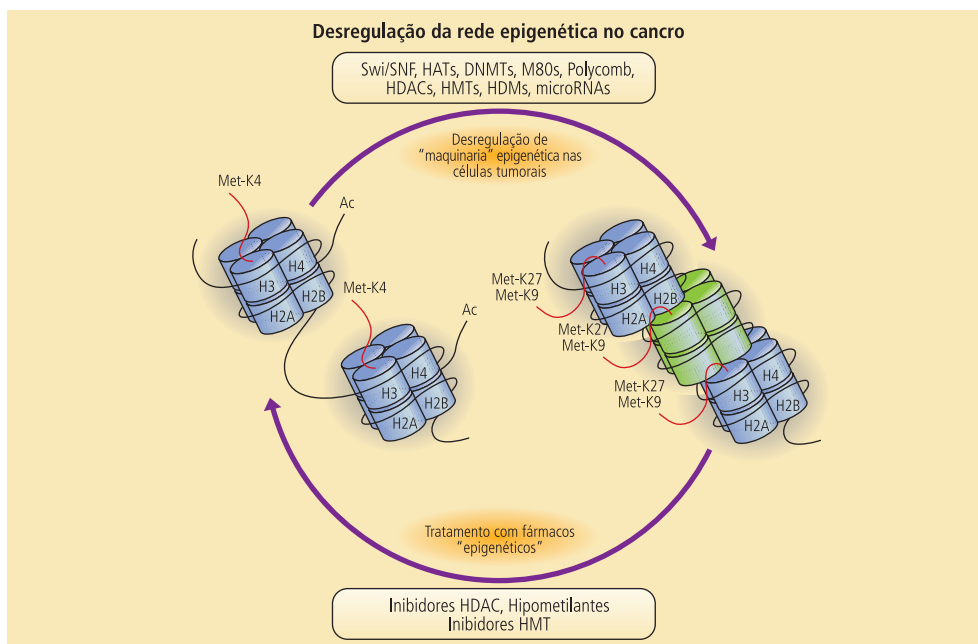


FIGURA 9

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

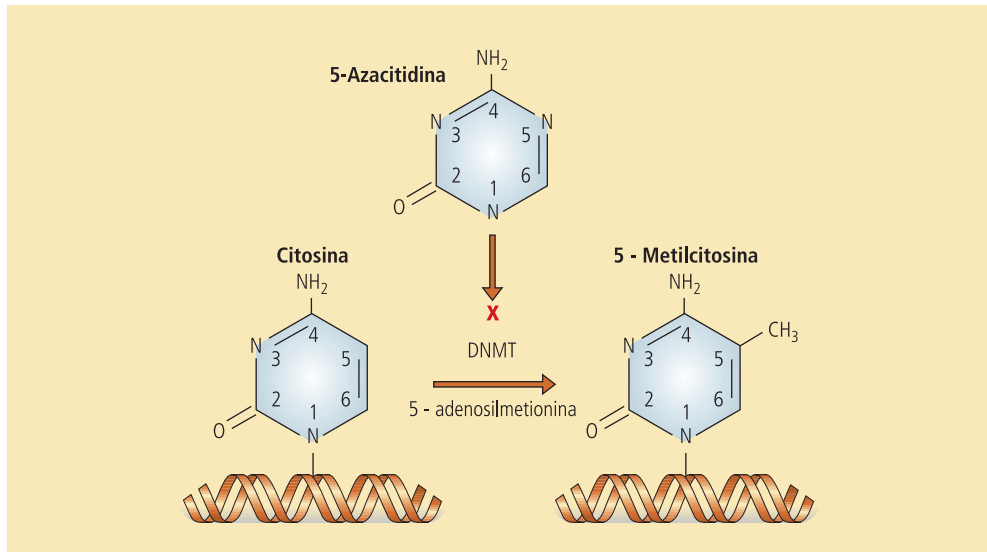
(Adaptado de Esteller M., 2008).

FIGURA 10

Mecanismo de acção da azacitidina.

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

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



Em suma, a inactivação da transcrição dos genes supressores tumorais pela hipermetilação da ilha promotora CpG tem sido uma questão de interesse como agente causal de neoplasias hematológicas. O evento mais frequente e melhor estudado nas SMD é a inactivação do gene *p15^{INK4B}*, que controla a progressão das células da fase G1 para a S. Ocorre em cerca de 50% dos casos de SMD, mais frequentemente nos de alto risco, e pode ser adquirida durante a progressão da doença, estando associada a transformação leucémica e mau prognóstico.

Empiricamente sabemos que a terapêutica epigenética funciona na SMD devido ao sucesso inicial dos hipometilantes observados primeiramente em SMD e LMA. No entanto, é necessário validar este tipo de abordagem terapêutica (Figura 11).

Actualmente é aceitável que a aberrante metilação do ADN é tão comum em tumores sólidos como em neoplasias hematológicas, e que alguns subtipos, como os linfomas cutâneos são sensíveis ao uso de HDACi, que por sua vez apresentam pouco sucesso como agentes isolados nas leucemias. Contrariamente, as leucemias e as SMD são sensíveis aos hipometilantes. Presentemente não existe explicação para este facto e pode não depender de alterações moleculares epigenéticas intrínsecas, mas da optimização dose/esquema dos fármacos. A maioria dos estudos não demonstrou uma relação entre a indução da hipometilação do ADN ou a acetilação das histonas e a resposta clínica. Este facto sugere a possibilidade de estarem envolvidos outros processos para além da hipometilação do ADN e da acetilação das histonas.

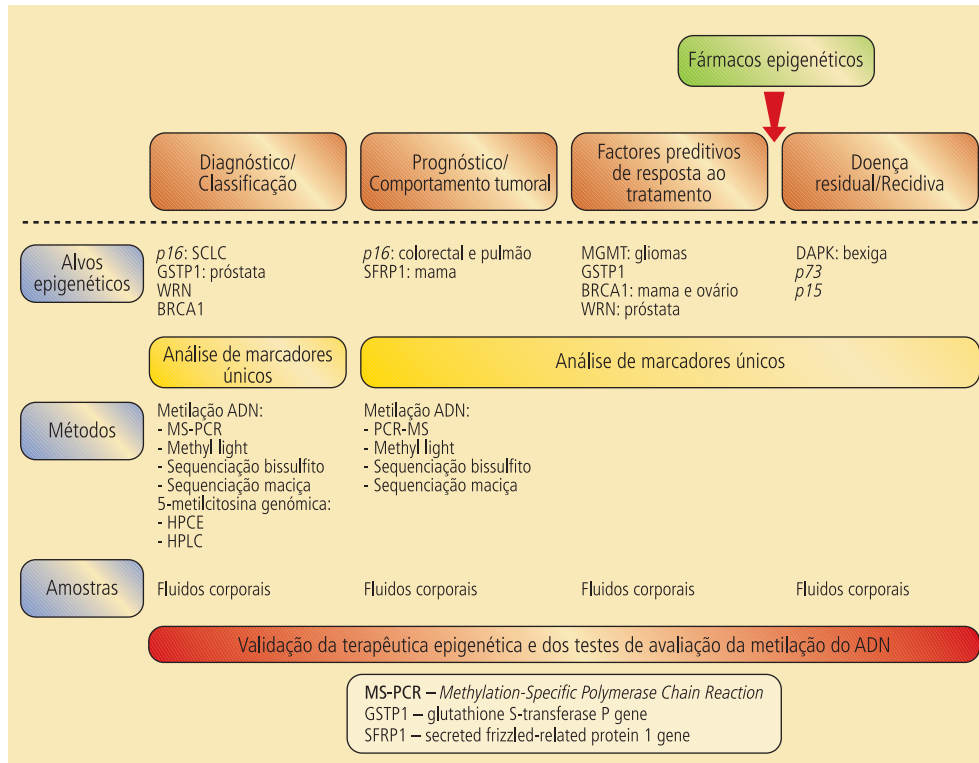


FIGURA 11

Validação da terapêutica epigenética e dos testes de avaliação da metilação do ADN. WRN-Werner syndrome gene; BRCA 1-breast cancer 1 gene; MGMT-O-6-methylguanine-DNA-methyltransferase gene; DAPK-death-associated protein kinase gene; HPLC-high performance capillary electrophoresis; HPLC-high performance liquid chromatography.

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

Outra justificação pode estar relacionada com o facto da maioria dos estudos se limitarem à análise de um gene e de um pequeno conjunto de genes, o que se deve à existência de poucas linhas celulares de SMD.

1.1.4.3. Alteração nas vias de sinalização celular

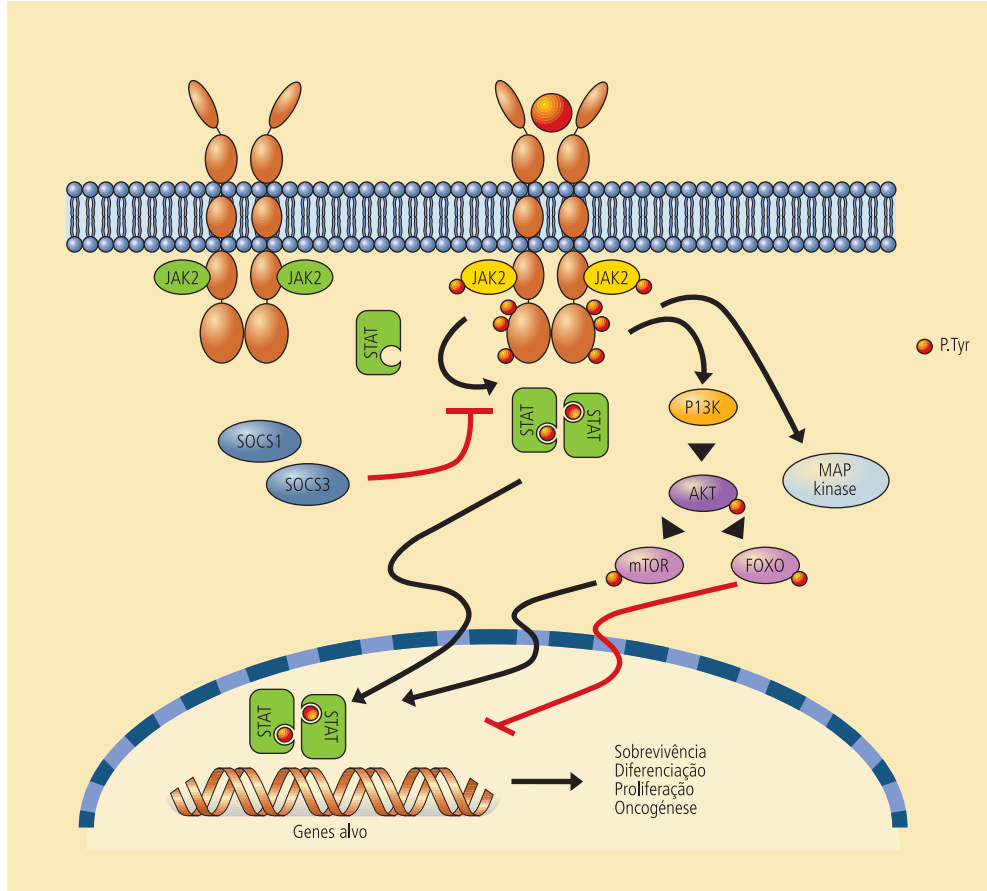
A hematopoiese ineficaz característica da SMD promoveu a investigação das vias de sinalização celular envolvidas na transdução de sinais mediados pela eritropoietina (EPO) e outros factores de crescimento hematopoiéticos. A primeira envolve uma complexa cascata de eventos, com início na ligação da EPO ao seu receptor (EPO-R). Seguidamente, a cinase Janus, JAK2, é activada, levando à fosforilação de resíduos de tirosina numa série de proteínas (Figura 12), nomeadamente de factores de transcrição (FT), os *signal transducer and activator of transcription* (STATs). A activação do STAT5, um dos FT importantes na sinalização da EPO, está alterada na SMD (Hoefsloot L. H., 1997). 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, 1996).

FIGURA 12

Vias de sinalização celular activadas pela eritropoietina.

Está representada a activação 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 receptores membranares e as moléculas sinalizadoras intracelulares. As proteínas JAK estão constitutivamente associadas com os domínios citoplasmáticos dos receptores. Normalmente a activação celular ocorre quando a ligação de um ligando, Epo ou trombopoietina (Tpo), induz a dimerização do seu receptor e a sua alteração conformacional com consequente activação da JAK. Os dois receptores associados à JAK aproximam-se permitindo a transfosforilação um do outro. As JAKs fosforiladas e activadas, por sua vez, fosforilam os domínios citoplasmáticos dos receptores, 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 activação pela JAK activada. As moléculas STATs activadas, migram para o núcleo, onde actuam como factores de transcrição ligando seqüências específicas reguladoras que activam ou reprimem a transcrição de genes alvo.

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



Como mencionado, as vias de sinalização conducentes à proliferação celular iniciam-se geralmente pela ligação de factores de crescimento a um receptor 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.

Além do EPO-R, têm particular importância na hematopoiese, os receptores de tirosina-cinase da família dos receptores das tirosinas cinases (RTK) tipo III, nomeadamente o receptor *FMS-like tyrosine kinase 3* (FLT3) (Figura 13), os receptores c-KIT, c-FMS (*colony-stimulating factor-1 receptor*) e PDGFR (Platelet-Derived Growth Factors). Como representado nas figuras 12 e 13, após activação do receptor pelo respectivo ligando, várias vias efectoras intracelulares podem ser activadas, 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, menos frequentemente, a via JAK/STAT (Small D., 2006; Parcells B. W., 2006).

A via das RAS/MAPK, altamente conservada nos organismos eucarióticos, é activada após ligação de um factor de crescimento ao seu receptor, com actividade de tirosina-cinase. Daqui resulta a estimulação de uma proteína tirosina-cinase e subsequente activação da proteína RAS, a qual activa a serina/treonina-cinase RAF, e posteriormente a proteína MAP Kinase/ERK Kinase (MEK). Esta proteína vai activar, por fosforilação de resíduos treonina e tirosina, proteínas que são membros da família *Extracelular Signal-Regulated Kinase* (ERK) (Figura 13). A proteína ERK migra para o núcleo e activa, por fosforilação, outras proteínas cinases e factores 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 D. M., 1999).

Outra via celular também activada pela proteína RAS, para além da MAPK, é a via do PI3K/AKT (Figura 13), o que confere a esta proteína um papel central não só na proliferação e crescimento como também na sobrevivência da célula (Lodish H. F. *et al.*, 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 factores 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 R. A., 1998; Paquette R. L., 1993).

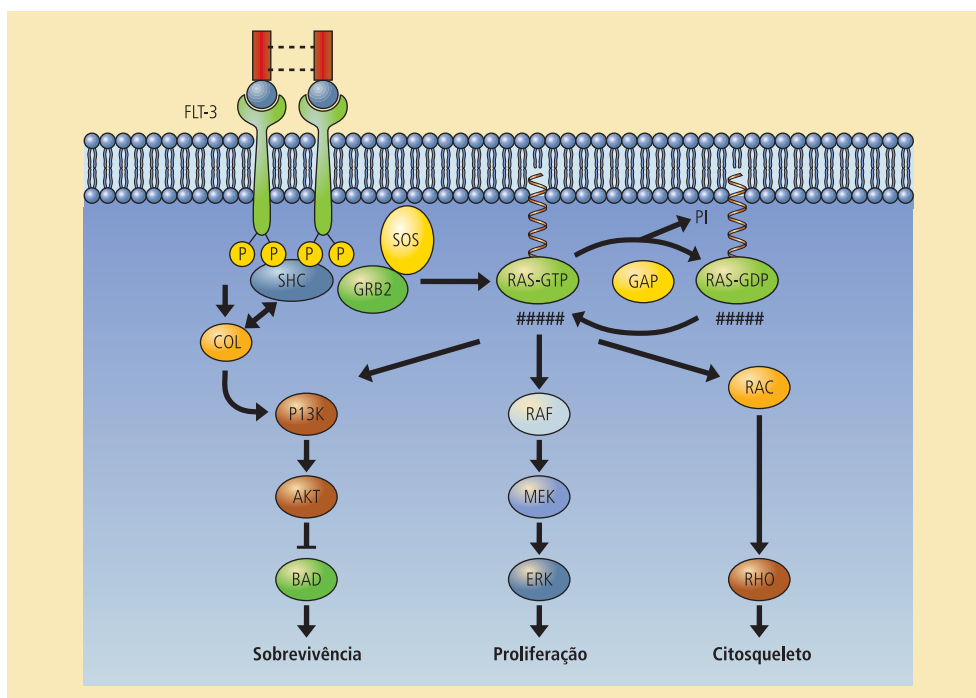


FIGURA 13

Vias de sinalização a jusante do receptor de tirosina cinase FLT3.

A activação do receptor FLT3 induz activação 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 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. O ciclo celular é o processo que engloba várias fases sequenciais: a fase G1, onde ocorre crescimento celular, a fase em que ocorre a síntese de ADN ou fase S, a fase G2, em que a célula se prepara para a mitose, sintetizando proteínas, e a fase M ou fase mitótica, onde ocorre a divisão celular (fase M e citocinese) (Cooper G. M. & Hausman R. E., 2006; Azevedo C., 1999).

O ciclo celular é altamente coordenado espacial e temporalmente por diversas moléculas como as proteínas fosfatase, CDC (do inglês *Cell-Division Control*), proteínas supressoras tumorais, como a *p53* que desempenha um importante papel nos pontos de restrição ou “checkpoints”, *p16* e *p15*, e pelos complexos Ciclina/CDK, cujas funções são interdependentes (Figura 14).

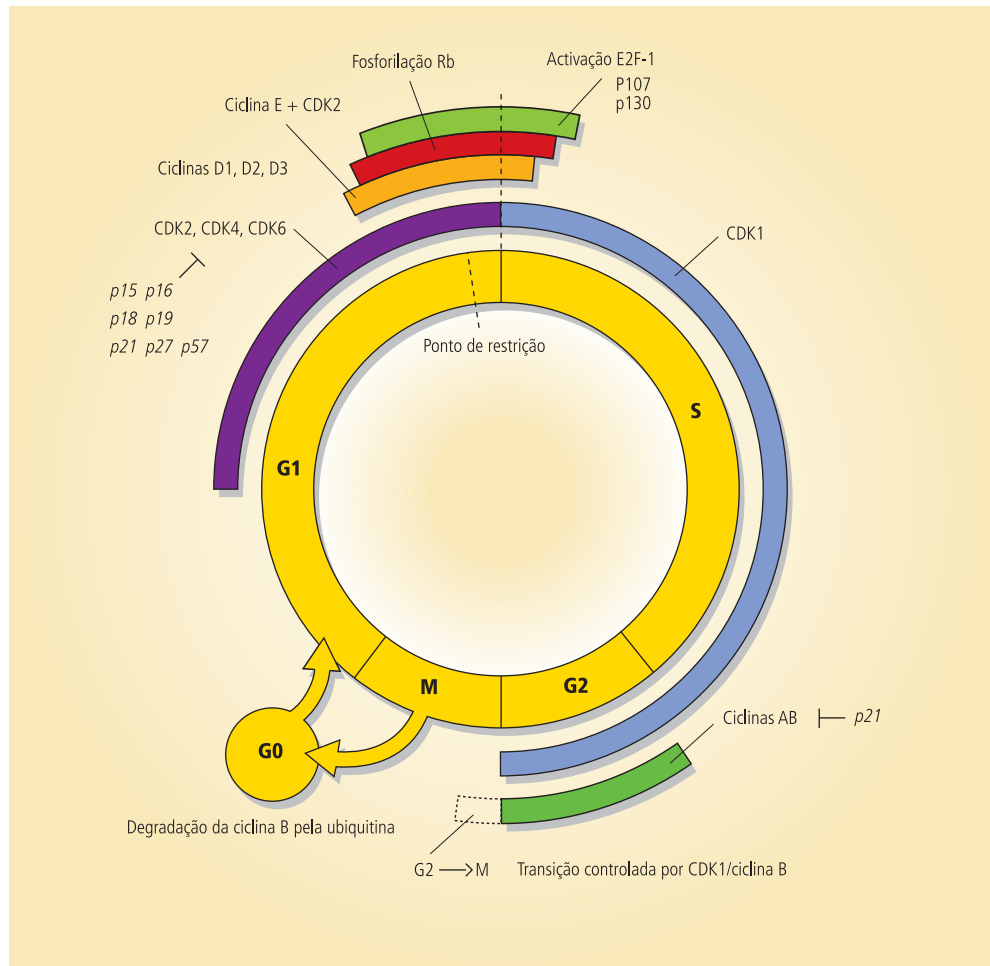


FIGURA 14

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.

Os complexos proteicos Ciclina/CDK possuem actividade de serina/treoninase e actuam através da activação ou inactivação 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 actividade catalítica, cuja activação depende da ligação à subunidade reguladora, a Ciclina. Esta subunidade é sintetizada apenas em resposta a determinados estímulos. Por exemplo, a expressão da Ciclina D1, responsável pela progressão da fase G1 para S, é induzida pela activação da via das MAPK por factores de crescimento (Cooper G. M. & Hausman R. E., 2006; Azevedo C., 1999).

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 efectuem a sua maturação e especialização coordenadas conforme o contexto do organismo. 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.

A apoptose, ou morte celular programada, foi inicialmente descrita por Wyllie e colaboradores em 1980. É caracterizada morfológicamente por retracção do volume celular com condensação do citoplasma e núcleo, fragmentação nuclear e formação de corpos apoptóticos, 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 P. L., 1998; Walker N. I., 1988). Assim, a morte celular programada é um mecanismo de morte celular intrínseco, 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 stresse ou lesões no ADN) ou extrínsecas (em resposta a substâncias citotóxicas ou a ligandos de receptores de morte da família do factor de necrose tumoral, TNF α , como o próprio TNF α , o ligando do FAS, FAS-L, e o TRAIL). Assim, os iniciadores da via apoptótica incluem uma variedade de estímulos endógenos e agressões exógenas, em particular, hormonas esteróides e diferentes citocinas, como TNF- α , FAS-L e factor de crescimento tumoral β (TGF- β), citostáticos, radiações gama e UV, químicos e vírus (Greenberg P. L., 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 activação 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 activação de receptores pertencentes à família do $TNF\alpha$, como os receptores do FAS e do TRAIL (TRAIL-Rs) (via extrínseca ou de receptores de morte) e/ou do envolvimento da mitocôndria (via intrínseca ou mitocondrial), como está representado na figura 15 (Cooper G. M. & Hausman R. E., 2006).

A via extrínseca é activada por ligação de factores de morte da superfamília do TNF (por exemplo FAS-L) com os respectivos receptores de morte da superfície celular, resultando posteriormente na activação proteolítica sequencial das proteínas citoplasmáticas caspase 8, 1 e 3 (Figura 15) (Parker J. E., 2004; Zang D. Y., 2001).

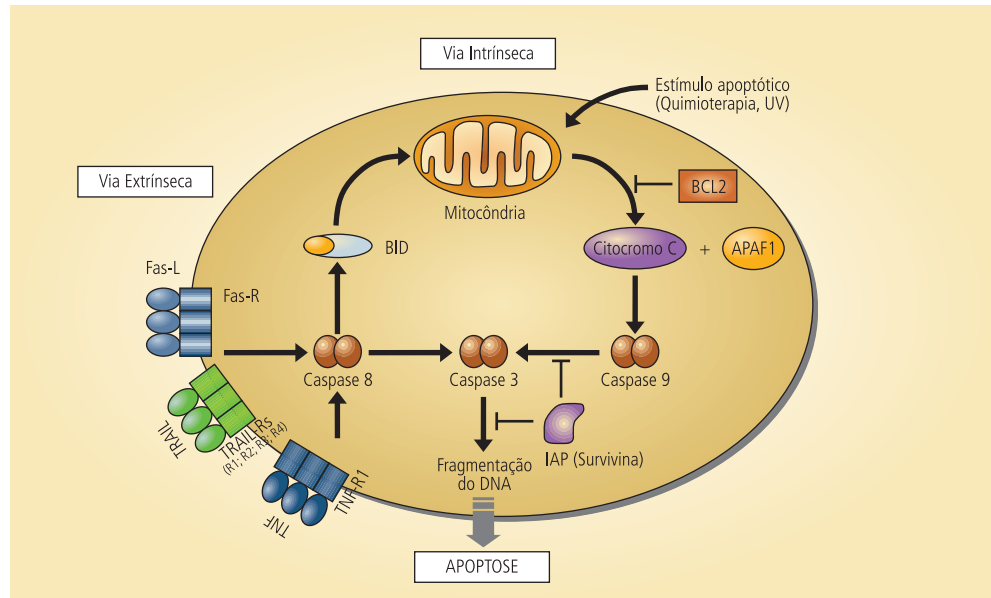
A estimulação dos receptores pelos respectivos ligandos ou anticorpos agonistas causa a agregação dos mesmos e alteração conformacional do domínio de morte citoplasmático. Seguidamente, ocorre o recrutamento de moléculas adaptadoras intracelulares como o FADD e a caspase 8, formando-se o complexo sinalizador de indução de morte, DISC (Chinnaiyan A. M., 1995; Nagata S., 1995), com consequente activação das caspases, responsáveis pela apoptose (Figura 15).

FIGURA 15

Esquemática das vias extrínseca e intrínseca da apoptose.

A via extrínseca inicia-se pela interacção de FAS-L com o receptor FAS com consequente activação da cascata de caspases 8, 1 e 3. A via mitocondrial pode ser activada 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 activa a Caspase 3. Esta proteína pode inibir directamente factores 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).



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 envolve a regulação de 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-XL/BAD e BAX/BAX possuem funções pró-apoptóticas, permitindo a abertura do poro. O stresse e a lesão intracelular podem levar à diminuição do potencial de membrana mitocondrial e abertura do PPTM, com libertação de citocromo C para o citosol. Este forma um complexo proteico com a *apoptotic protease-activating factor-1* (APAF-1), a procaspase-9 e desoxiadenosina trifosfato (dATP) (Li H., 1997; Liu X., 1996), o apoptosoma, ocorrendo posteriormente a activação da Caspase 3 (Figura 15) (Cooper G. M. & Hausman R. E., 2006; Azevedo C., 1999; www.sgul.ac.uk).

A família de proteínas intracelulares BCL-2 inclui a maioria dos reguladores de apoptose mais importantes. Alguns dos membros pró-apoptóticos, como a proteína BAD, actuam através da ligação e inactivação dos membros inibidores de morte desta família (Parker J. E., 2004). 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 S., 1999; Hsu Y. T., 1997; Schendel S. L., 1997; Zha H., 1996). Por outro lado, as proteínas BCL-2 e BCL-XL inibem a apoptose bloqueando a libertação do citocromo C, através da ligação directa e sequestro do citocromo C e APAF-1, ou interagindo com as proteínas BAX ou BAK, inibindo a formação de poros (Eskes R., 2000; Hu Y., 1998; Yang J., 1997; Oltvai Z. N., 1993).

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 directamente factores de transcrição e outras proteínas com funções na reparação do ADN. A fragmentação nuclear ocorre através da acção proteolítica das caspases sobre as Laminas (levando à desagregação da estrutura da membrana nuclear), as proteínas *Caspase Activated DNase* e a *PoliADP Ribose Polimerase* (PARP),

conduzindo à fragmentação internucleossômica do ADN por acção de nucleases (Cooper G. M. & Hausman R. E., 2007; Azevedo C., 1999).

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 IAP, como por exemplo a Survivina. Estas proteínas regulam negativamente a apoptose, interferindo com a activação da Caspase 9 e formação do apoptosoma, inibindo desta forma a actividade de caspases efectoras (Figura 15).

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 homeostasia tecidular, 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 mielodisplasia. Além disso, a diminuição da apoptose, associada à transformação maligna, pode resultar no desenvolvimento de leucemia ou linfoma. 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 factores de crescimento, assim como, o crescimento independente da ancoragem durante a metastização (Fulda S., 2009).

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 detecção molecular de proteínas activadas relacionadas com a apoptose (Parker J. E., 2000). O aumento da apoptose nos progenitores medulares enquadra-se na clínica dos estádios iniciais da SMD, que cursam com citopenias periféricas e medula hiper celular. 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) 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 (Hellstrom-Lindberg E., 1997; Lepelley P., 1996), o que poderá estar relacionado com o aumento de FAS verificado em vários estudos (Gersuk G. M., 1998; Kitagawa M., 1998; Bouscary D., 1997). Além disso, Li H. e colaboradores (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) 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 (Hellstrom-Lindberg E., 1997; Parker J. E., 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 susceptibilidade 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 imunitário, 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 susceptibilidade à apoptose intrínseca e imune é a marca da patogénese inicial da SMD, o que explica as citopenias periféricas, apesar de uma medula hiperclonal. O aumento da expressão do FAS-L (CD95) 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.

1.1.4.4. Desregulação do sistema imune e ambiente medular

Embora controverso, existe uma evidência crescente de que alterações no microambiente medular e do sistema imune podem afectar 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 M. W., 2002). Tem sido demonstrado que os linfócitos T citotóxicos exercem efeitos inibitórios na mielopoiese da SMD *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 K., 2003; Barrett J., 2000).

Os ensaios clínicos mostram que a globulina antitimócito (ATG) e a ciclosporina têm actividade no tratamento de grupos de doentes com SMD seleccionados (Killick S. B., 2003; Molldrem J. J., 2002; Jonasova A., 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 H. J., 2004; Rosenfeld C., 2002; Molnár L., 2000; Kitagawa M., 1997; Maciejewski J. P., 1995). 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 J. N., 2002). Por outro lado, os factores preditivos de resposta à terapêutica imunossupressora incluem idade jovem, presença de clone de hemoglobinúria paroxística nocturna, HLA-DR15, hipocelularidade e cariótipo normal (Sauntharajah Y., 2002).

No entanto, o mecanismo subjacente à autoimunidade na SMD permanece por esclarecer. A hipótese de que os linfócitos T reagem especificamente contra os antigénios 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 afectar a hematopoiese normal na SMD.

Citocinas

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 , factor estimulador das colónias de granulócitos e monócitos (GM-CSF) e TNF- α , (Fontenay-Roupie M., 1999; Bowen D., 1993; Maurer A. B., 1993; Verhoef G. E., 1992). O aumento do TNF- α tem sido consistentemente associado com a expressão elevada de FAS nas células CD34+. De salientar que este factor pode ser produzido pelos macrófagos e linfócitos medulares.

Por outro lado, a angiogénese tem um papel importante no crescimento tumoral e na metastização (Folkman J., 1995). O aumento da densidade microvascular foi demonstrado na medula de doentes com doenças hematológicas, incluindo SMD (Alexandrakis M. G., 2004 e 2005; Padro T., 2000; Pruneri G., 1999). 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 factores de crescimento, tais como factor 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), Alexandrakis M. G. (2005) e Faderl S. (2004). O receptor solúvel do VEGF foi indicado como factor prognóstico em doentes com LMA e SMD (Hu Q., 2004).

1.1.4.5. Alterações genéticas/citogenéticas

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 A., 2009).

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

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 actuam na via de sinalização dos receptores dos factores de crescimento. Após activação do receptor do factor de crescimento, ocorre activação 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 inactivas. A proteína mutada tem menor actividade GTPásica, mantendo-se persistentemente na forma activa, 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.

Outras mutações descritas na SMD incluem as do gene supressor tumoral *p53* (5-10% dos casos); do receptor de tirosina-cinase *FLT3* (5% dos casos); do gene supressor tumoral *p15^{INK4b}* (reprimido por silenciamento do promotor por hipermetilação em mais de 50% dos casos de SMD de alto risco). Além disso, esta alteração está associada ao 7q- e a tempo de sobrevivência inferior.

Novos estudos relatam mutações no gene *TET2* (localizado no cromossoma 4q24) em SMD e outras neoplasias mielóides, sugerindo que este gene tem um papel importante na hematopoiese e patogénese destas entidades ocorrendo numa fase precoce (Mullighan CG, 2009). Pensa-se que o gene *TET2* é o mais frequentemente mutado em SMD (Langemeijer SM, 2009).

Além do mencionado, é de salientar que as alterações cromossômicas estão descritas em 40-70% das SMD primárias e em mais de 90% das SMD relacionadas com terapêutica prévia (Delforge M., 2003), consistindo normalmente numa perda, deleção ou translocação. É surpreendente verificar a presença de um cariótipo normal numa doença clonal, em cerca de 30 a 60% dos casos, o que pode ser explicado por falha técnica ou evolução do cariótipo ao longo do tempo. No entanto, 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 oposto 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.

- Anomalias do 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%) (Third MIC Cooperative Study Group 1988). 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 deseritropoiese, 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 na síndrome 5q- envolve a banda 5q33, que contém um gene supressor tumoral mielóide diferente do gene da banda 5q31 que está normalmente associado à deleção 5q- (Figura 16). De salientar que, no braço longo do cromossoma 5 existem genes que codificam numerosos factores de crescimento hematopoiéticos importantes na proliferação dos granulócitos, como a interleucina 3 (IL-3), a IL-4, a IL-5, o factor regulador do interferão 1 (IRF-1), o factor estimulador das colónias de monócitos (M-CSF) e seu receptor e o GM-CSF. Assim, a perda destes genes pode desempenhar um papel na patogénese da SMD.

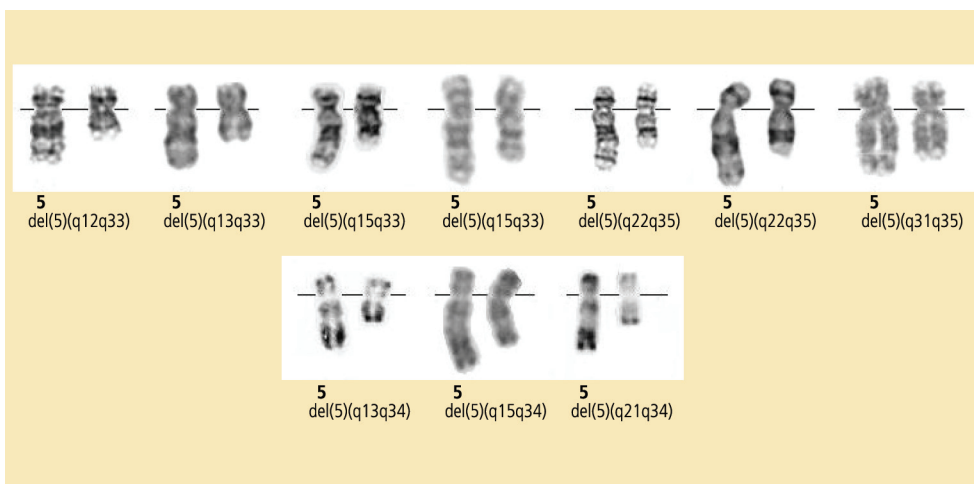


FIGURA 16

Deleção 5q-.

(adaptado de <http://atlasgeneticsoncology.org/Anomalies/del5q1D1092.html>).

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 factor 1* (NPM-MLF1) associada a SMD em transformação leucémica (Yoneda-Kato N., 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 A., 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.

- Anomalias do 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 P., 2001).

A análise de doentes com LMMJ, que frequentemente apresentam monossomia 7, demonstrou que aproximadamente 30% cursam com mutações do gene *neurofibromatose 1* (*NF1*) (Shannon K. M., 1994). Este gene supressor tumoral codifica uma proteína com actividade de GTPase, actuando como um regulador negativo da actividade da proteína RAS (Martin G. A., 1990). Como referido, a activação da proteína RAS ocorre numa proporção significativa de adultos com SMD. As mutações do gene *RAS* e a inactivação do gene *NF1* parecem desempenhar um papel importante na progressão da SMD com monossomia do 7 (Stephenson J., 1995). Além do mencionado, a deleção 7q- está também associada a mutações do gene *AML1*.

A região 7q22.1 foi sugerida como ponto de quebra típico das neoplasias mielóides (Johnson E. J., 1996). Os genes localizados no braço longo do cromossoma 7 são a eritropoietina, o inibidor do activador da plasmina, o receptor β da célula T, o gene da asparagina sintetase e da *phosphoinositide-3-kinase, catalytic, gamma polypeptide* (PIK3CG).

- Anomalias do cromossoma 8 – A Trissomia 8

A trissomia 8 está descrita em diversas neoplasias hematológicas, incluindo a SMD, leucemias agudas e crónicas. 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 A., 1998; Iwabuchi A., 1992). Por isso, o seu significado não está ainda totalmente esclarecido.

- Anomalias do Cromossoma 17

A deleção do 17p é observada primariamente em doentes com SMD relacionada com terapêutica e caracteriza-se por desgranulopoiese e hipolobulação pseudo-Pelger-Huet (Lai J. L., 1995). O gene *p53* está localizado na banda 17p13.1 e encontra-se frequentemente envolvido nesta síndrome. 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 activando 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 inactiva o restante gene *p53*, não existindo portanto *p53* funcional.

- Anomalias do 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. Morfologicamente existe displasia marcada da série eritróide 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 favorável relativo.

A região crucial delectada está situada entre D20S174 e D20S17 (Asimakopoulos F. A., 1994; Roulston D., 1993) que inclui potenciais genes supressores tumorais, como o gene que codifica a fosfolipase C, a adenosina desaminase, a topoisomerase 1, o factor 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.

- *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 D. V. T., 2005).

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, acarreta um prognóstico favorável.

- *Translocações mais frequentes na SMD*

A $t(5;12)(q33;p13)$ foi inicialmente descrita por Srivastava A. (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 T. R., 1994) (Figura 17). Sabe-se que esta translocação ocorre num grupo extenso de neoplasias mielóides com características mieloproliferativas e mielodisplásicas simultaneamente. Os membros da família ETS actuam como activadores da transcrição, enquanto o *PDGFR- β* é um receptor de tirosina cinase que activa múltiplas vias de sinalização intracelulares, incluindo a via das proteínas RAS-RAF.

A fusão do gene *TEL* também foi descrita em associação com outros genes como o *Arylhydrocarbon Receptor 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 F., 2000; Yagasaki F., 1999; Buijs A., 1995).

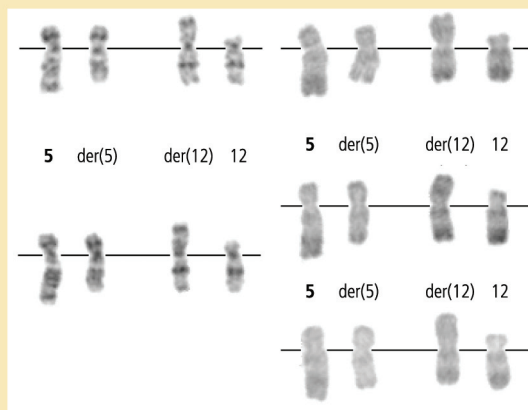


FIGURA 17

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

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

Outro gene identificado como membro de fusão em doentes com LMA relacionada com terapêutica e SMD com translocações cromossómicas envolvendo o cromossoma 11p15.5, é o *nucleoporina 98 kDa* (NUP98), que codifica as nucleoporinas, moléculas envolvidas na importação e exportação de proteínas e ARNs (Radu A., 1995).

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, respectivamente. 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 D., 1994).

As translocações que envolvem a banda 11q23 estão classicamente descritas nas SMD ou LMA secundárias a tratamento com inibidores das topoisomerases da classe II, nas leucemias bifenotípicas, nas leucemias monocíticas e nas leucemias das crianças (Ridge S.A., 1994; Ayton P.M., 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 cromossómica que se encontra alterada em doentes com SMD com história de exposição a este fármaco. Nos doentes com LMA normalmente confere mau prognóstico.

No entanto, não está esclarecido o mecanismo exacto do gene *MLL* na SMD primária, sugerindo-se que actue 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 (Caligiuri M. A., 1996).

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 H., 2003).

A síndrome 3q21q26 foi descrita em doentes com anomalias da megacariocitopoiese, trombocitose e mau prognóstico (Jotterand B., 1992). Nesta região estão incluídos os genes da transferrina e do seu receptor, 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 activação do gene *MEL1*, homólogo do *EVI-1*, sob o controlo da riboforina I, localizado na região 3q21 (Mochizuki N., 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 (Mitani K., 1994). A fisiopatologia da leucemogénese mediada pelo *EVI-1* não está clara, mas pode estar relacionada com efeitos na sinalização do TGF- β (Izutsu K., 2001).

Buonamici S. e seus colaboradores (2004) desenvolveram recentemente um modelo murino *EVI-1* de mielodisplasia. Estes animais desenvolveram uma pancitopenia fatal acompanhada de medula hiperclular 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 N., 1996). O gene *NPM* está relacionado com o transporte das nucleoproteínas ribossômicas entre o nucléolo e o citoplasma. O gene de fusão resultante pode afectar o crescimento celular através de alterações na replicação do ADN, no processamento do ARN ou na expressão génica.

1.1.5. Características clínicas

Existe uma variabilidade clínica significativa que reflecte 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 efectuado 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 infecções bacterianas recorrentes (sobretudo pneumonias bacterianas e infecções cutâneas, em doentes com neutropenia inferior a 1,0 G/L) ou equimoses fáceis ou espontâneas. Raramente apresentam febre não relacionada com a infecção. Outros doentes apresentam sintomas sistémicos ou aspectos característicos de auto-imunidade, como artralgias. 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 aspectos laboratoriais podem viver vários anos.

O exame objectivo, 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.

1.1.6. 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 eritróide e mielóide (Figura 18). Na presença de um esfregaço leucoeritoblástico pode ocorrer leucocitose com um desvio à esquerda.

O aspirado medular é típico, normalmente consiste numa medula hiper celular com displasia; megacariócitos atípicos (micromegacariócitos mono ou bilobados), hiperplasia eritróide 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.

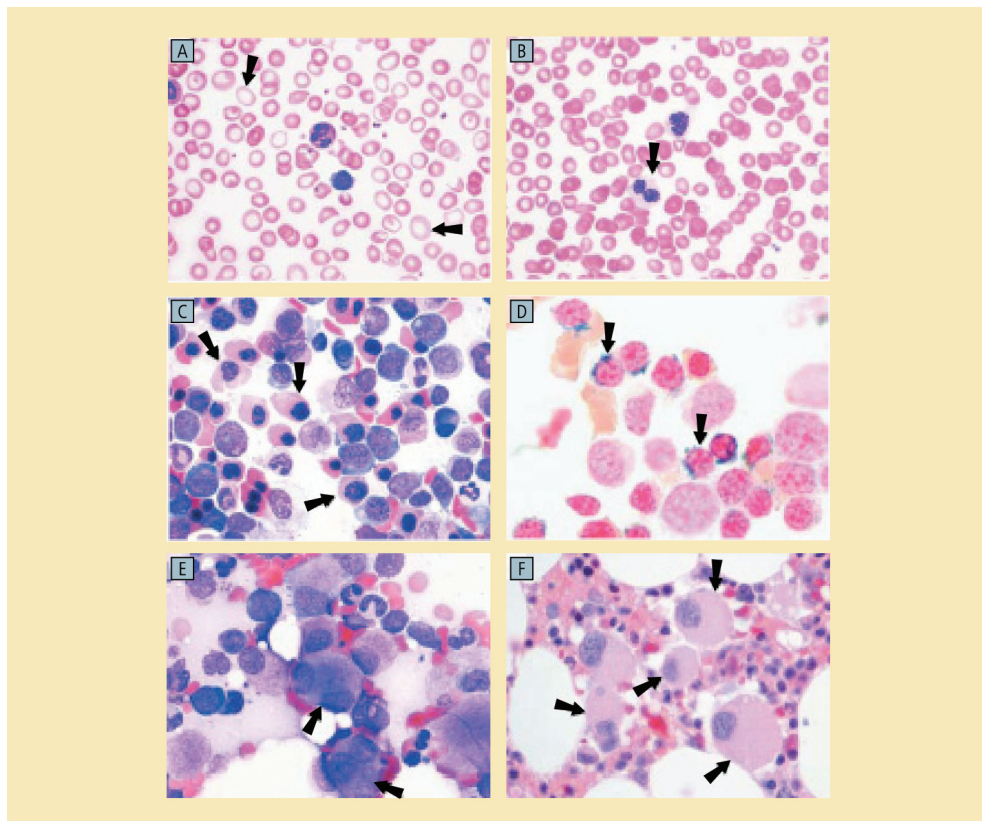
As alterações cromossómicas clonais são detectadas pelo cariótipo convencional em 40-70% dos casos de SMD *de novo* e em 95% dos casos de SMD secundária a terapêutica. Neste último grupo, 90% correspondem a deleção parcial ou completa dos cromossomas 5 e/ou 7 e a cariótipos complexos. Não existem alterações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

FIGURA 18

Características morfológicas do sangue periférico e medula óssea na SMD:

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

(Adaptado de Tefferi A., 2009).



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 hiper celularidade, a displasia, particularmente megacariocítica, as alterações na arquitetura medular (por exemplo a presença de precursores imaturos em localização anormal - ALIPs) e a invasão por blastos. Os ALIPs são grupos de mieloblastos e promielócitos com localização intertrabecular anormal, devido à produção autócrina do factor de crescimento do endotélio vascular. Para além destes aspectos morfológicos, a biópsia óssea permite a obtenção de tecido para outras análises, como a imunocitoquímica e procedimentos moleculares que podem adicionar informação. Possibilita, por outro lado, a exclusão de outras doenças que podem mimetizar a SMD, em particular a leucemia de *hairycells*, linfoma ou metástase.

A detecção de células CD34+ por citometria de fluxo no aspirado medular, ou por imunocitoquímica em amostras de tecido ósseo é importante porque parte dos blastos são CD34+.

Os parâmetros bioquímicos não apresentam alterações, à excepção da lactato desidrogenase, que pode estar elevada devido à elevada taxa de proliferação e/ou apoptose medular.

1.1.7. Diagnóstico e classificação

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). Além disso têm sido utilizados vários sistemas de score prognóstico, sendo o mais conhecido 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 objectivo, 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 correcto.

A detecção 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 S. D., 2008).

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 A., 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 novos 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 4 e 5.

TABELA 4

Classificação da OMS das neoplasias mielodisplásicas/mieloproliferativas	Patologia	Sangue Periférico	Medula Óssea
	Leucemia mielomonocítica crónica	- 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 crónica atípica BCR-ABL 1 negativa	- Leucocitose, Neutrofilia, - Displasia neutrofilica - Precursores 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 factor de crescimento ou citotóxico - Ausência de gene de fusão BCR-ABL 1 - Sem rearranjo PDGFRA ou PDGFRB	- Características mistas SMD/SMP - <20% blastos
	Anemia** refractária 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

* LMMC 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.

** 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

(Adaptado de Swerdlow S. H., 2008)

TABELA 5

Patologia	Sangue Periférico	Medula Óssea
Citopenias Refractárias com displasia unilinear: - anemia refractária - neutropenia refractária - trombocitopenia refractária	- Uni ou bicitopenia - Blastos raros ou ausentes (<1%)	- Displasia unilinear; ≥10% de células displásicas da linhagem afectada - <5% blastos - <15% dos precursores eritróides são sideroblastos em anel
Anemia refractária com sideroblastos em anel	- Anemia - Ausência de blastos	- Somente displasia eritróide - ≥15% dos precursores eritróides são sideroblastos em anel - <5% blastos
Citopenia refractária 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 refractária 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 refractária 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)

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 6).

TABELA 6

	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	-	-	-

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

(Adaptado de Nimer S. D., 2008)

Sistema de Score prognóstico Internacional (IPSS) para SMD

1.1.8. Tratamento

Na tabela 7 estão inumeradas as várias opções terapêuticas actualmente 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 7

Tratamento de doentes com SMD

"Best supportive care": transfusões, antibióticos
Factores 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 alogénico 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 – factor estimulador de colónias 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 objectivo 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 deferoxamina 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 activas ou graves e/ou com trombocitopenia grave.

Os factores 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 factor estimulador de colónias de granulócitos (G-CSF) por via subcutânea associado à eritropoietina pode aumentar as hipóteses de resposta eritróide (Sekeris M. A., 2009).

Recentemente, foi aprovada pela FDA para o tratamento da SMD a azacitidina. É um fármaco hipometilante que pode reactivar genes supressores tumorais ou reguladores do ciclo celular que se encontram inactivos no clone SMD por metilação de regiões reguladoras dos genes. Além disso, a azacitidina também apresenta actividade 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 M. A., 2009).

Outro fármaco aprovado para tratamento da SMD é a talidomida, um imunomodulador e anti-angiogénico. 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 S.T., 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 J., 2007).

Outra abordagem terapêutica, utilizada também na anemia aplástica, é a globulina antitimócito, 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 seleccionados; 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 M. A., 2009).

Em Portugal, no âmbito do Grupo Português de Mielodisplasia as recomendações para tratamento são as apresentadas na figura 19.

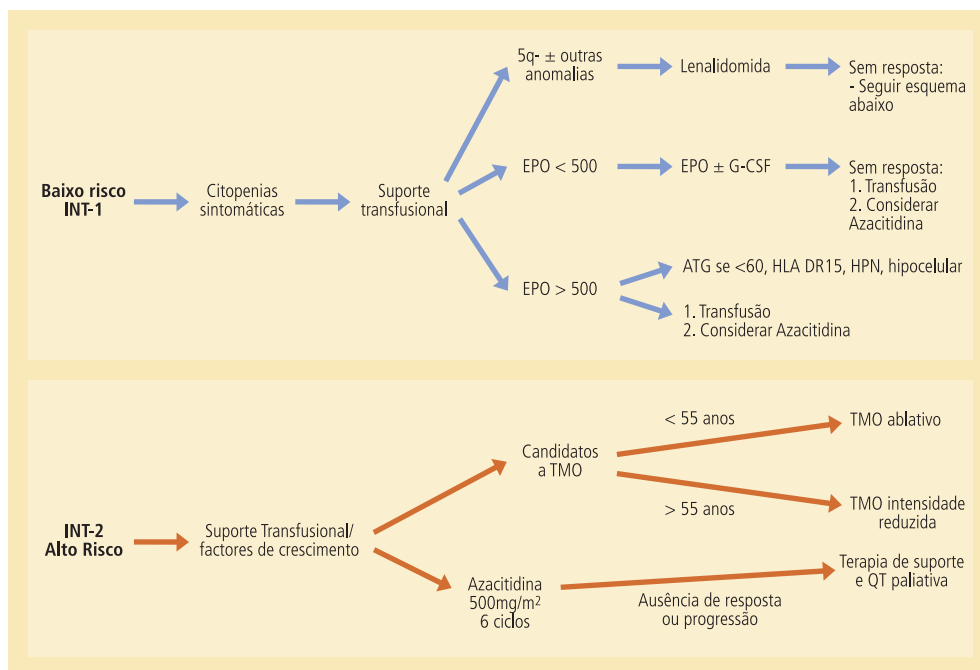


FIGURA 19

Algoritmo de tratamento na SMD, pelo GPM.

1.1.9. Prognóstico e Evolução

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 (Tabela 8).

TABELA 8

IPSS e relação com sobrevivência e tempo para progressão para LMA

Grupo de risco	Score total	Sobrevivência média (anos)	Tempo para progressão para LMA (anos)
Baixo	0	5,7	9,4
Intermédio-1	0,5 - 1,0	3,5	3,3
Intermédio-2	1,5 - 2,0	1,2	1,1
Alto	≥ 2,5	0,4	0,2

(Adaptado de Nimer S. D., 2008)

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 infecções 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 M. A., 2010).

1.2. Nutrição, epigenética e Síndrome Mielodisplásica

Aproximadamente 20% das neoplasias a nível mundial e 30% nos países ocidentais podem ser atribuídas a factores dietéticos. Por outro lado, determinados grupos da população estão em risco de carência vitamínica, por défice de ingestão, alterações no metabolismo e perdas, ou diminuição da sua síntese.

A influência das vitaminas no risco de desenvolver cancro tem sido extensamente investigada e os resultados evidenciam a eficácia destas na prevenção de alguns cancros.

De facto, factores dietéticos influenciam a suplementação em grupos metil envolvidos no metabolismo de um carbono, logo nos processos de metilação (Figura 20). Estes nutrientes incluem o folato, a vitamina B12, a vitamina B6, a metionina e a colina (Norman H. A., 2004).

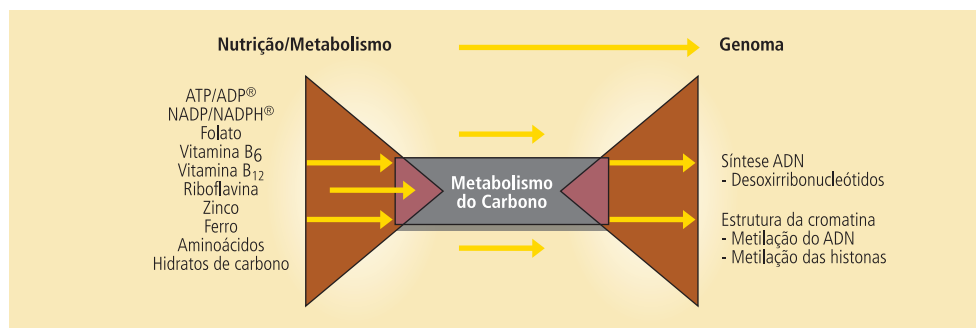


FIGURA 20

Relação entre a nutrição e o genoma.

A figura representa a influência do metabolismo envolvendo um átomo de carbono, na relação entre a nutrição/metabolismo e a síntese do ADN e a estrutura da cromatina.

(Adaptado de Stover P. J., 2008).

Neste contexto, o folato, uma vitamina hidrossolúvel presente numa variedade de frutas e vegetais, tem sido foco de grande interesse devido à associação inversa entre este e o risco de diversas neoplasias (em particular, o cancro colorectal) e à sua potencial capacidade de modelar a metilação do ADN (Engeland M., 2003).

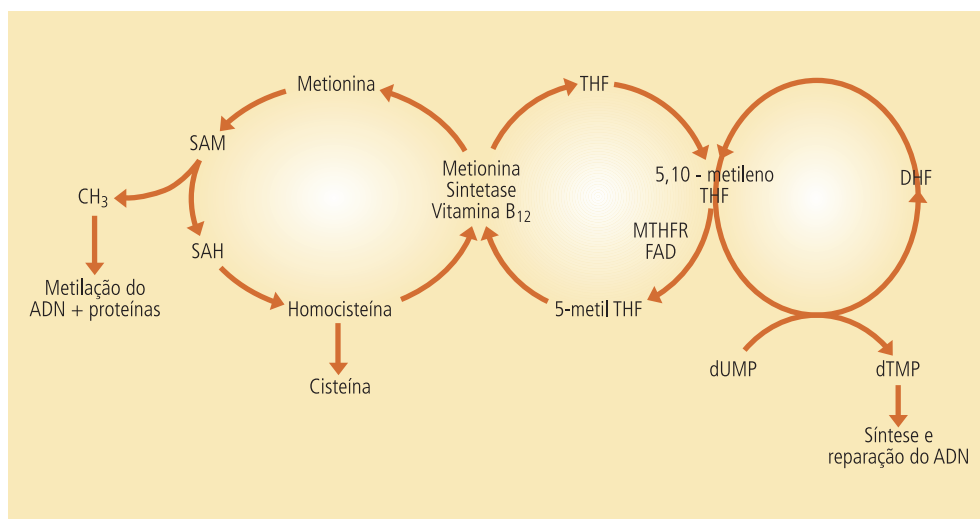
Assim, o folato adquire um interesse peculiar como agente quimiopreventivo devido ao seu papel na síntese, reparação e metilação do ADN. É um co-factor essencial na remetilação da homocisteína a metionina, assegurando o aporte de S-adenosilmetionina, o principal dador do grupo metil na maioria das metilações biológicas, incluindo a do ADN (Figura 21) (Vogel S., 2008).

FIGURA 21

Ciclo do folato.

THF - Tetrahydrofolato;
DHF - Dihydrofolato;
MTHFR - Metilentetrahydrofolatoreductase;
SAM - S-adenosilmetionina;
SAH - S-adenosilhomocisteína;
FAD - Flavina adenina dinucleotídeo;
dUMP - Uridina-monofosfato;
dTMP - Timidina-monofosfato.

(Adaptado de Vogel S., 2008).



Deste modo, a deficiência de folato poderá aumentar o risco de algumas neoplasias. Por outro lado, a aberrante metilação do ADN foi considerada o mecanismo iniciador pelo qual o défice desta vitamina promove a carcinogénese. Apesar de dietas com carência em dadores de grupo metil como a colina, folato, metionina e vitamina B12, terem revelado sistematicamente induzir hipometilação do ADN (Teodoridis J. M., 2008), o efeito de um défice isolado de folato na metilação do ADN permanece controverso e inconclusivo (Stempak J. M., 2005).

Estudos efectuados em modelos animais, humanos e *in vitro* sugerem que os efeitos da deficiência e suplementação de folato na metilação do ADN são altamente complexos, sendo gene e localização específicos. Além disso, dependem do tipo celular, do órgão-alvo, do estado de transformação, do grau e duração da depleção de folato (Schernhammer E., 2007).

Assim, trabalhos de investigação envolvendo o folato e a vitamina B12 em neoplasias mostraram que elevadas concentrações de B12 podem estar associadas ao risco aumentado para tumor da próstata em estágio avançado (Johansson M., 2008); outros evidenciaram uma relação inversa entre o folato, a piridoxal fosfato (PLP) e B12 e o risco de desenvolver tumor pancreático (Scherhammer E., 2007). Além disso, segundo alguns autores, o folato e a ingestão de álcool podem estar associados a alterações de hipermetilação da região promotora de genes no cancro colorectal esporádico (Engeland M., 2003).

Como referido, os grupos metilo necessários para as reacções de metilação podem derivar de produtos da dieta. Uma via chave nestas reacções é o metabolismo da metionina. A metionina, a colina, o folato e a vitamina B12 são um grupo de nutrientes que fornecem ou regeneram os grupos metilo lábeis, podendo influenciar a metilação do ADN. 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 da MTHFR, C677T e A1298C. Enquanto alguns estudos relacionam o polimorfismo C677T com a redução da metilação de dinucleótido CpG do ADN em linfócitos humanos em condições de défice de folato, pouco se sabe sobre a influência do polimorfismo isolado A1298C e a alteração da metilação do ADN.

Os polimorfismos em genes que codificam várias enzimas têm sido associados a neoplasias. Por exemplo, o genótipo 677TT do gene da MTHFR tem sido associado a aumento de risco para LLA (Tong N., 2010) e o genótipo 66AG no gene da 5-metiltetrahydrofolato homocisteína metiltransferase (MTRR) associado a aumento do risco para SMD (Kim H. N., 2009). Os indivíduos com os genótipos da MTHFR 677TT, 1298AC e 1298CC apresentam risco diminuído para LLA, mas não para LMA (Skibola C. F., 1999). Além disso, as concentrações dos intermediários do folato em tumores colorectais estão directamente relacionadas com a presença de hipermetilação frequente do ADN e inversamente relacionadas com a presença do polimorfismo C677T da MTHFR (Kawakami K., 2003). Deste modo, elevadas concentrações de folato e B12 séricas estão associadas a risco de metilação de regiões promotoras de genes. No entanto, esta relação é modificada pelos genótipos do polimorfismo C677T da MTHFR (Mokarram P., 2008).

Apesar dos progressos, a SMD permanece mal caracterizada e novas estratégias tem vindo a ser desenvolvidas na abordagem da patogénese, diagnóstico, prognóstico e tratamento.

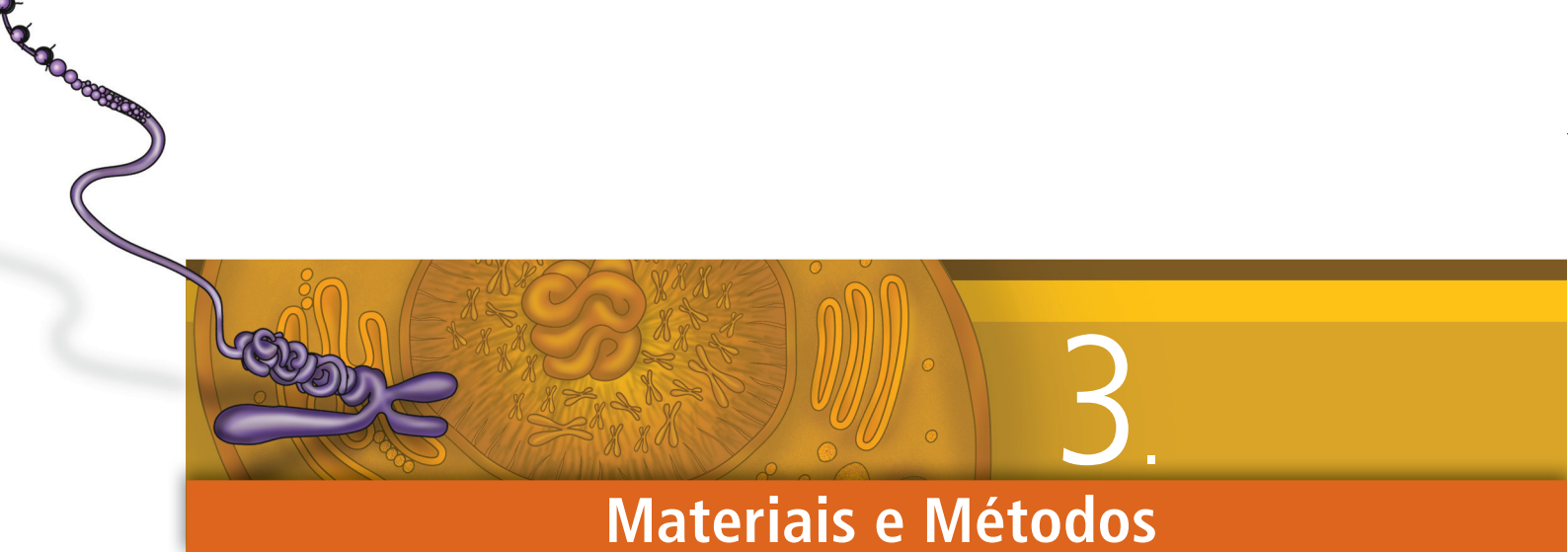


2.

Objectivos

Os objectivos deste trabalho consistem em identificar mecanismos moleculares envolvidos na SMD, nomeadamente o envolvimento da modulação epigenética e o papel da nutrição, em particular o *status* do folato e vitamina B12, correlacionando-os com a clínica, incluindo a evolução para LMA, sobrevivência e grupos de risco prognóstico. Neste sentido, no presente trabalho pretende-se:

- Avaliar o perfil de metilação de genes envolvidos na SMD e a sua relação com o metabolismo do folato e vitamina B12;
- Analisar se a metilação dos genes *p15* e *p16* e os polimorfismos da MTHFR podem constituir novos marcadores moleculares para a classificação da SMD;
- Identificar novos grupos de risco prognóstico que constituam também novos alvos terapêuticos;
- Analisar a eficácia de alvos terapêuticos moleculares, especialmente de agentes hipometilantes do ADN e/ou HDACi, identificando a associação com melhor eficácia terapêutica e menor dose de modo a melhorar a sobrevivência e qualidade de vida dos doentes com SMD.



Para atingir os objectivos propostos os estudos foram efectuados em doentes com SMD, controlos não neoplásicos e numa linha celular de mielodisplasia humana.

3.1. Reagentes

Para a realização dos estudos em doentes com SMD e em controlos saudáveis utilizou-se: kit de extracção de ADN *Illustra™ Blood genomicPrep Mini Spin* e marcador de pesos moleculares de 100 pares de bases (GE Healthcare); tampão Tris Acetato EDTA (TAE), agarose e brometo de etídeo (BioRad); HotStart Taq polymerase (Quiagen); enzima de restrição *Hinf I* e *Mbo II* (New England BioLabs); AIA-PAK B12 e AIA-PAK Folate (TOSOH Bioscience).

Para os estudos realizados na linha celular de mielodisplasia humana utilizou-se: uma linha celular de SMD, as células F36P (*European Collection of Cell Cultures*); meio de cultura RPMI 1640, interleucina-3 recombinante, penicilina, streptomina e soro fetal bovino (Gibco, Invitrogen); Tricostatina A, Decitabina, azul de tripano a 0,4%, resazurina, dimetilsulfóxido, metanol, glicerol, meio salino de fosfato, soluto de May-Grünwald e soluto de Giemsa (Sigma-Aldrich); kit de detecção de apoptose (Immunotech).

3.2. Estudos realizados em doentes com Síndrome Mielodisplásica e controlos

3.2.1. Selecção e caracterização de doentes

Neste estudo participaram 34 indivíduos, dos quais 26 doentes com SMD e 8 controlos não neoplásicos com Púrpura Trombocitopénica Imune (PTI). Para os estudos dos polimorfismos da MTHFR foram ainda utilizadas 289 amostras de indivíduos saudáveis.

A selecção e a caracterização dos doentes com e sem SMD foi efectuada no Serviço de Hematologia Clínica dos Hospitais da Universidade de Coimbra e na consulta de Oncologia do Serviço de Medicina do Hospital Distrital da Figueira da Foz, EPE.

Os doentes incluídos neste estudo preenchem os seguintes critérios:

- Idade superior a 14 anos;
- Características morfológicas para diagnóstico de SMD pela classificação FAB e OMS, em sangue periférico e aspirado medular;
- Estudo cromossómico por citogenética convencional e FISH;
- Classificação em grupos de prognóstico de acordo com os critérios IPSS, de acordo com a tabela 6;
- Consentimento informado do doente.

De salientar que ao diagnóstico foi realizado um aspirado medular para caracterização morfológica por microscopia óptica, avaliação do cariótipo por citogenética convencional e caracterização imunofenotípica por citometria de fluxo.

Para a avaliação das características morfológicas dos doentes com SMD os esfregaços de sangue periférico e medula foram corados com os meios Wrigth-Giemsa ou May-Grünwald-Giemsa e posteriormente analisados por microscopia óptica. Os aspectos considerados foram: a presença de displasia e a percentagem de blastos, de monócitos (após a coloração por esterase não-específica) e de sideroblastos em anel.

A citogenética convencional permitiu pesquisar as anomalias cromossómicas mais frequentes (deleções, inversões, translocações, trissomias e monossomias). Para a análise citogenética as amostras obtidas de medula foram processadas por G-banding com coloração tripsina-Giemsa. As metafases foram examina-

das num microscópio óptico 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.

De acordo com a classificação OMS 2001 a população de doentes SMD está distribuída por 5 subtipos: 5 doentes com anemia refractária (AR); 9 doentes com citopenia refractária com displasia multilinear (CRDM); 3 doentes com anemia refractária com excesso de blastos 1 (AREB-1); 5 doentes com anemia refractária com excesso de blastos 2 (AREB-2); 1 doente com síndrome 5 q- e 3 doentes com leucemia mielomonocítica crónica (LMMC).

Além da classificação da OMS, os doentes foram distribuídos em 3 categorias de risco de acordo com o IPSS: baixo (7 doentes); intermédio-1 (13 doentes) e intermédio-2 (6 doentes). Para a determinação deste *score* de prognóstico foram utilizados os factores de prognóstico descritos na literatura (Greenberg P., 1998), isto é, a percentagem de blastos na medula, as alterações citogenéticas e o número de citopenias.

Os controlos não neoplásicos foram seleccionados com base nos critérios de diagnóstico de PTI (Rodeghiero F., 2009). Os controlos saudáveis sem patologia conhecida foram seleccionados no Centro Regional de Sangue de Coimbra, após exame físico e testes laboratoriais (hematológicos e bioquímicos) de rotina.

3.2.2. Doseamento do ácido fólico e da vitamina B12

O doseamento do ácido fólico e da vitamina B12 foi efectuado em sangue colhido por punção venosa (5 mL em tubo com gel para separação do soro) recorrendo a ensaios imunoenzimáticos competitivos por quimioluminescência utilizando kits comerciais, respectivamente, AIA-PACK Folate e AIA-PACK B12 (TOSOH Bioscience).

Neste ensaio, o folato sérico e folato enzimaticamente marcado competem pela ligação a um número limitado de proteínas de ligação marcadas com fluoresceína isotiocianato (FITC). Estas proteínas foram posteriormente ligadas a anticorpos anti-FITC imobilizados em esferas magnéticas. Seguidamente, estas esferas foram lavadas, de modo a remover o folato livre, e incubadas com um substrato fluorogénico, o 4-metilumbeliferil-fosfato. Procedeu-se à leitura num analisador automático de imunoensaio enzimático (TOSOH AIA-2000). Finalmente, estabeleceu-se uma curva padrão utilizando amostras de folato

de concentração conhecida e calculou-se a concentração de folato sérico da amostra através desta curva, uma vez que a quantidade de folato sérico é inversamente proporcional à quantidade de folato marcado com as esferas magnéticas (de acordo com as instruções do fabricante).

Para o doseamento da vitamina B12 sérica utilizou-se um procedimento idêntico ao referido para o folato.

3.2.3. Análise genotípica das variantes polimórficas da enzima metiltetrahidrofolatoredutase

Para os estudos dos polimorfismos da MTHFR 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 detectados 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*, respectivamente. 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 electroforese.

Assim, 100 ng de ADN genómico, obtido de acordo com o referido em 3.4.1., foi amplificado utilizando um primer directo 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, dNT's (desoxinucleótidos trifosfatados de adenina, guanina, citosina e timina) a 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, respectivamente 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 Cyciler (BioRad).

Após amplificação dos fragmentos de ADN genómico contendo os locais polimórficos C667T e A1298C do gene da MTHFR procedeu-se à digestão enzimática *overnight* dos fragmentos obtidos, respectivamente, com a endonuclease de restrição *Hinfl* e *MbolI* (New England BioLabs). Os produtos

digeridos foram posteriormente visualizados em gel de agarose a 2%, em simultâneo com um marcador de pesos moleculares de 100 pb (GE HealthCare), por coloração com brometo de etideo, fotografados e identificados. 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 efectuada 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.

3.3. Estudos realizados na linha celular de Mielodisplasia humana

3.3.1. Cultura da linha celular de Mielodisplasia humana

Neste estudo foi utilizada uma linha celular de Mielodisplasia humana, as células F36P, obtidas na *European Collection of Cell Cultures* (ECACC). Esta linha celular foi estabelecida a partir de células isoladas do líquido pleural de um doente do sexo masculino com 65 anos de idade com diagnóstico de AREB-t (Chiba P., 1991).

As células F36P são dependentes de citocinas para proliferarem, pelo que se adicionou ao meio de cultura o GM-CSF ou a IL-3. Assim, as células F36P foram mantidas em cultura em meio *Roswell Park Memorial Institute 1640* (RPMI 1640) (Sigma) a pH 7.4, contendo 2 mM de L-glutamina, 20 mM de HEPES-Na, 1.5 g/L de NaHCO₃, 10 ng/mL de IL-3 recombinante, 100 U/mL de penicilina (Gibco), 100 µg/mL estreptomicina (Gibco) e enriquecido com soro fetal bovino

(Gibco) a 10%. As células foram, propagadas e mantidas em cultura no meio apropriado à temperatura de 37°C numa atmosfera humedecida contendo 5% de CO₂, iniciando-se a cultura a uma densidade de 0.5 a 0.75 milhões de células por mL.

3.3.2. Incubação da linha celular de Mielodisplasia humana com decitabina e tricostatina A

As células de mielodisplasia humana, F36P, foram mantidas em cultura nas condições referidas na secção 3.3.1., na ausência e na presença de decitabina (DAC) e de tricostatina A (TSA), numa gama de concentrações entre 1-100 uM e 1-100 nM, respectivamente, durante um período de 96 horas, a 37°C em atmosfera humedecida contendo 5% de CO₂.

As células foram mantidas em frascos ou em placas de cultura, dependendo da quantidade de células necessárias aos estudos subsequentes, e numa densidade celular inicial de 0.5 ou 0.75 milhões de células/mL (10⁶ cel/mL). Prepararam-se soluções concentradas destes compostos de modo a incubar as células F36P com pequenos volumes de fármacos.

3.3.3. Análise da densidade e proliferação celular

Os estudos de proliferação celular permitem avaliar os efeitos exercidos pela DAC e pela TSA no crescimento/morte celular das células de mielodisplasia humana. Para avaliar estes parâmetros celulares recorreu-se ao ensaio metabólico com resazurina.

O ensaio metabólico com resazurina envolve a adição de um indicador redox fluorogénico à cultura celular. Quando a resazurina é adicionada à cultura celular entra no citosol e é reduzida a resorufina por acção das enzimas mitocondriais. Esta reacção redox é acompanhada de alteração de cor, passando de azul índigo não fluorescente para rosa fluorescente (Figura 22). Esta alteração de cor pode ser facilmente medida por espectrofotometria ou por espectrofluorimetria (Al-Nasiry S., 2007; O'Brien J., 2000). Como cada linha celular apresenta propriedades metabólicas únicas e como a redução da

resazurina é um processo enzimático, as linhas celulares devem ser caracterizadas individualmente de modo a determinar os parâmetros experimentais óptimos. Estes incluem o tempo de incubação, a diluição da resazurina e a densidade celular. Assim, podemos determinar a gama de densidades celulares em que se observa uma relação linear entre a absorvância ou a fluorescência e a densidade celular (Nakayama M., 1997).

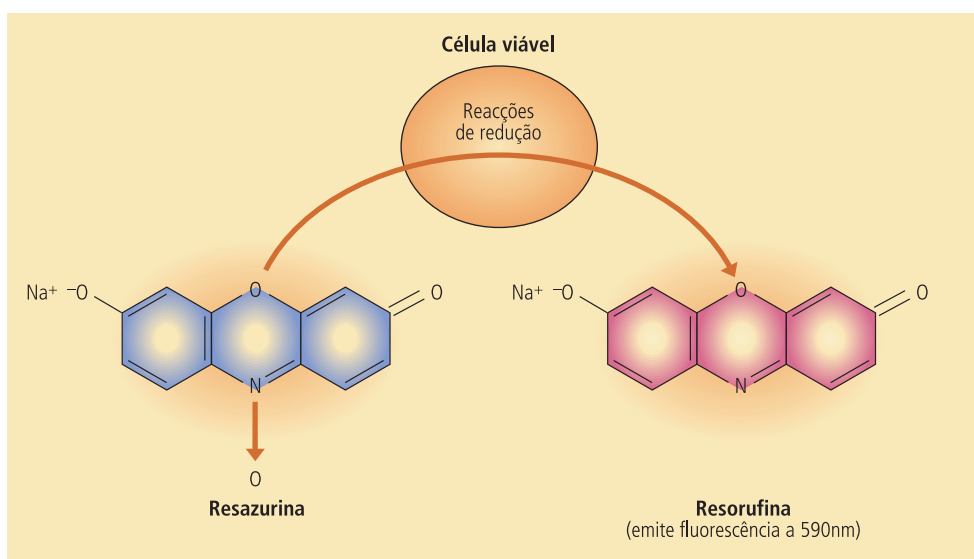


FIGURA 22

Estrutura química da resazurina e da resorufina.

A resazurina (composto azul índigo não fluorescente) é reduzida a resorufina (composto rosa fluorescente) com emissão de fluorescência (por aceitação de electrões provenientes do NADPH, *flavin adenine dinucleotide* - FADH, FMNH, nicotinamida adenina dinucleotídeo - NADH e dos citocromos), numa reacção catalisada por enzimas mitocondriais.

(Adaptado de O'Brien J., 2000).

Neste sentido, as células F36P foram pré-incubadas a 37°C, em atmosfera apropriada, numa densidade celular entre $2,5 \times 10^3$ e $2,5 \times 10^6$ células/mL, em diluições seriadas de 1/1.000 durante 1 hora, após a qual foi adicionado um volume de resazurina a 0,1 mgr/mL correspondente a 5 e 10% do volume de células em estudo. O mesmo procedimento foi seguido para meio de cultura sem células (branco). Nas células incubadas a 37°C em atmosfera apropriada mediui-se em triplicado a absorvância nos comprimentos de onda de 570 nm e 600 nm às 0h, e após 2h, 4h, 6h, 8h e 24h de incubação. Observámos uma relação linear ($r=0,991$) entre a densidade celular e a redução da resazurina quando as células foram incubadas com 10% de resazurina durante 6h. Na optimização das condições experimentais foram efectuados 3 ensaios independentes (resultados omitidos).

Seguidamente fomos avaliar o efeito antiproliferativo/citotóxico da DAC e da TSA nas células F36P utilizando o mesmo teste metabólico com resazurina. Assim, as células F36P foram incubadas na ausência e presença destes compostos, nas

condições referidas anteriormente, numa densidade celular inicial de 0.5×10^6 células/mL durante 96h. Após cada período de 24h de incubação adicionou-se às células um volume de resazurina correspondente a 10% do volume de células em estudo. A leitura da absorvância nos comprimentos de onda de 570 nm e 600 nm foi efectuada num espectrofotómetro leitor de placas (Synergy™ HT Multi-Mode Microplate Reader, BioTek Instruments). Os resultados de cada ensaio representam a média das 3 leituras efectuadas, tendo-se realizado 5 ensaios independentes.

O efeito antiproliferativo/citotóxico foi calculada pela fórmula:

$$\frac{[(A_{570} - A_{600}) \textit{ amostra}] - [(A_{570} - A_{600}) \textit{ branco}]}{[(A_{570} - A_{600}) \textit{ controlo}] - [(A_{570} - A_{600}) \textit{ branco}]} \times 100$$

onde A570 corresponde à absorvância no comprimento de onda de 570 nm e A600 corresponde à absorvância no comprimento de onda de 600 nm.

3.3.4. Análise da morte celular 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 ligados a anticorpos monoclonais ou outros compostos (Bernas T., 2006).

A morte celular foi avaliada por citometria de fluxo através da dupla marcação com anexina V (ligada ao fluorocromo isotiocianato de fluoresceína – anexina V-FITC) em combinação com o iodeto de propídeo (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 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 R., 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. No entanto, a perda de integridade membranar, ou seja, a ruptura 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 discriminar as células viáveis (não marcadas com anexina V e IP), as células em apoptose inicial (marcadas com anexina V), as células em apoptose tardia/necrose (marcadas simultaneamente com anexina V e IP) e as células em necrose (marcadas com IP) (Aubry J. P., 1999; Gorman A. M., 1997).

Assim, nas células F36P incubadas, durante 48 horas, na ausência e na presença da DAC e da TSA, 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, respectivamente 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).

3.4. Estudos realizados em doentes com Síndrome Mielodisplásica, controlos não neoplásicos e na linha celular de Mielodisplasia humana

3.4.1. Extracção e quantificação de ADN genómico

O ADN genómico das células de sangue periférico e de células F36P incubadas na ausência na presença de DAC e TSA foi extraído pela técnica de adsorção em matriz de sílica com recurso ao kit *Illustra™ Blood genomicPrep Mini Spin* (GE Healthcare). Esta técnica baseia-se na capacidade de adsorção dos ácidos nucleicos a formulações de sílica de modo dependente do pH e da concentração salina, permitindo a obtenção de amostras de ADN de elevada pureza e integridade física.

Assim, 3 mL de sangue periférico obtido de controlos e doentes com e sem SMD foi centrifugado durante 10 minutos a 500 xg de modo a obter um “buffy coat” que contém um concentrado de células leucocitárias. Paralelamente, um milhão de células F36P incubadas na ausência e na presença dos compostos em estudo foram lavadas com tampão fosfato (PBS) por centrifugação durante 10 minutos a 500xg e concentradas em 200 µL do mesmo tampão. Seguidamente, 200 µL de concentrado celular foi misturado com 20 µL de proteínase K (kit *Illustra™*) e 400 µL de tampão de lise (kit *Illustra™*), tendo-se incubado à temperatura ambiente durante 10 minutos. Transferiu-se a mistura para um coluna de purificação, contendo uma matriz de sílica colocada num tubo colector, e centrifugou-se durante 1 minuto a 11.000 xg. Adicionou-se 500 µL de solução de lise (kit *Illustra™*) à coluna de purificação. Centrifugou-se novamente durante 1 minuto a 11.000 xg, adicionou-se 500 µL de tampão de lavagem (kit *Illustra™*) e centrifugou-se durante 3 minutos a 11.000 xg. Posteriormente, transferiu-se a coluna de purificação para um microtubo de 1,5 mL e adicionou-se 200 µL de tampão de eluição (pré-aquecido a 70°C, kit *Illustra™*). De seguida incubou-se durante 1 minuto à temperatura ambiente e centrifugou-se durante 1 minuto a 11.000 xg recolhendo-se o eluído contendo o ADN.

Após a obtenção das amostras de ADN efectuou-se a determinação da sua concentração e grau de pureza por espectrofotometria de absorção recorrendo ao quantificador SmartSpec Plus (BioRad). Este aparelho determina a concentração do ADN considerando que a cada unidade de absorvância

corresponde uma concentração de ADN de 50 µg/mL. O grau de pureza do ADN é determinado através da razão entre as densidades ópticas avaliadas no comprimento de onda de 260 nm e de 280 nm.

A determinação da concentração e do grau de pureza das amostras de ADN genómico dos doentes com SMD e dos controlos saudáveis foi efectuada utilizando como referência (branco) o tampão de eluição das amostras. As amostras de ADN foram consideradas puras para a razão entre as densidades ópticas de 260 nm e 280 nm igual a 1.8. Todas as amostras com um grau de pureza entre 1.7 e 1.9 e uma concentração entre 100 e 200 ng/µL foram guardadas a -80 °C até à sua posterior utilização.

3.4.2. Análise do perfil de metilação dos genes *p15* e *p16*

Para analisar o estado de metilação dos genes *p15* e *p16* realizou-se um PCR específico de metilação, a MS-PCR. Os procedimentos actuais para a detecção da metilação baseiam-se na conversão de resíduos de citosina não metilados em uracilo, após tratamento com bissulfito de sódio, que são posteriormente convertidos a timina durante a *polymerase chain reaction* (PCR) subsequente. Assim, após o tratamento com bissulfito, o ADN dos alelos previamente metilados apresenta sequências diferentes, comparativamente com os alelos não metilados correspondentes.

3.4.2.1. Modificação de ADN com Bissulfito de Sódio

A modificação de ADN genómico, ou seja, a conversão das citosinas não metiladas em uracilos, foi efectuada através do Kit de modificação de ADN *Epiect Bisulfite Kit* (Qiagen), segundo as instruções do fabricante.

Resumidamente, misturou-se 1 µg de ADN genómico com bissulfito de sódio e tampão de protecção de ADN (*Epiect Bisulfite Kit*) e procedeu-se à modificação do ADN submetendo-se esta mistura a um ciclo de desnaturação (5 min, 95°C), incubação (25 min, 60°C), desnaturação (5 min, 95°C), incubação (85 min, 60°C), desnaturação (5 min, 95°C), incubação (175 min, 60°C) num termociclador (MyCycler, BioRad). Seguidamente, colocou-se o ADN modificado numa coluna de purificação (*Epiect Bisulfite Kit*) e por centrifugação e adição de vários tampões de lavagem (*Epiect Bisulfite Kit*) obteve-se ADN puro. Este foi guardado a -20°C até à sua posterior utilização.

3.4.2.2. Methylation-Specific Polymerase Chain Reaction (MS-PCR)

O ADN modificado dos doentes com e sem SMD e das células F36P incubadas na ausência e na presença de DAC e TSA foram amplificados por MS-PCR segundo a metodologia descrita por Herman J. G. (1996) e Yeh K. T. (2003), com algumas modificações. Assim, a 100 ng de ADN modificado foi adicionado um primer directo e um primer inverso (Tabela 9) na concentração de 100 µM, dNT's (desoxinucleótidos trifosfatados de adenina, guanina, citosina e timina) a 200 µM, cloreto de magnésio a 5 mM e 2,5 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 e extensão (72°C durante 30 segundos), e um período de extensão final a 72°C durante 5 minutos (Tabela 9), utilizando o termociclador My Cycler (BioRad).

TABELA 9

Sequência de primers utilizados no MS-PCR

Primer	Sequência
Alelo Metilado (M)	
<i>p15F</i> (Directo) 60°C	5'-TAGTGAGGATTCGCGACGC-3'
<i>p15R</i> (Reverso)	5'-ACGACCGATCGTTAACTCCG-3'
<i>p16F</i> 60°C	5'-TTATTAGAGGGTGGGGCGGATCGC-3'
<i>p16R</i>	5'-GACCCCGAACCGCGACCGTAA-3'
Alelo Desmetilado (U)	
<i>p15F</i> 65°C	5'-GTTAGAGTGAGGTGGGGTAGTGAGGATTTGTGATGT 3'
<i>p15R</i>	5'-TACAATAACCAACAACCAATCATTAACTCCA-3'
<i>p16F</i> 60°C	5'-TTATTAGAGGGTGGGGTGGATTGT-3'
<i>p16R</i>	5'-CAACCCCAAACCAACCATAA-3'

Simultaneamente foram amplificadas quatro amostras controlo: uma amostra sem ADN (Branco), uma amostra de ADN metilado modificado (Controlo Universal Metilado), uma amostra de ADN desmetilado modificado (Controlo Universal Desmetilado) e uma de ADN desmetilado não modificado (Controlo EpiTect PCR Control DNA Set, Qiagen).

Os produtos de PCR obtidos foram analisados por electroforese em gel de agarose a 2%, corados com brometo de etídio e visualizados sob luz ultravioleta.

3.5. Análise Estatística

O tratamento estatístico dos resultados foi efectuado utilizando os programas SPSS, versão 16 (*Statistical Package for Social Sciences*), e GraphPad, versão 5.

Na análise estatística dos estudos efectuados em linhas celulares foi utilizado o teste ANOVA e ANOVA de medidas repetidas. Na análise do polimorfismo genético utilizou-se o teste do χ^2 na determinação do desvio do equilíbrio de Hardy-Weinberg e o teste exacto de Fisher na análise do risco relativo (*Odds ratio* – OD). O estudo da relação entre folato/B12, metilação e polimorfismos da MTHFR foi efectuado por análise multivariada.

Em todos os testes utilizados considerou-se um nível de significância estatística a 95% ($p < 0.05$).

4.

Resultados

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

Os doentes com SMD foram caracterizados de acordo com a classificação da OMS, atendendo às características morfológicas, hematológicas e clínicas das células da medula óssea destes doentes. Assim, dos 26 doentes estudados, 5 foram classificados como AR, 9 como CRDM, 3 como AREB-1, 5 como AREB-2, 3 como LMMC e 1 como Síndrome 5q- (5q-) (Figura 23).

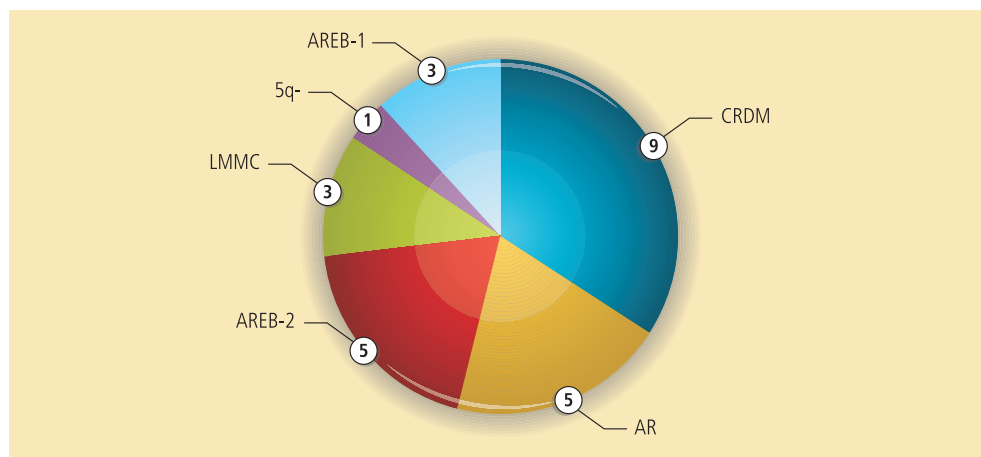


FIGURA 23

Caracterização da população de doentes com SMD segundo a OMS.

AR – anemia refractária;
CRDM – citopenia refractária com displasia multilinear;
AREB-1 – anemia refractária com excesso de blastos 1;
AREB-2 – anemia refractária com excesso de blastos 2;
LMMC – leucemia mielomonocítica crónica;
5q- – síndrome 5q-.

Dos 26 doentes estudados, 12 eram do sexo Feminino (F) e 14 do Masculino (M) (ratio F/M aproximadamente de 1:1.7). A média de idades é de 74 anos, com um intervalo entre os 33 e os 84 anos de idade.

Atendendo às características do cariótipo, à percentagem de blastos e às citopenias existentes, os doentes com SMD foram classificados segundo o IPSS

em 3 grupos de risco: 7 de baixo risco (Baixo), 13 de risco intermédio-1 (Int-1) e 6 de risco intermédio-2 (Int-2) (Figura 24).

Na tabela 10 estão representadas as características dos doentes com SMD, de acordo com a idade e sexo, o subtipo de SMD segundo a classificação da OMS, o cariótipo e o IPSS.

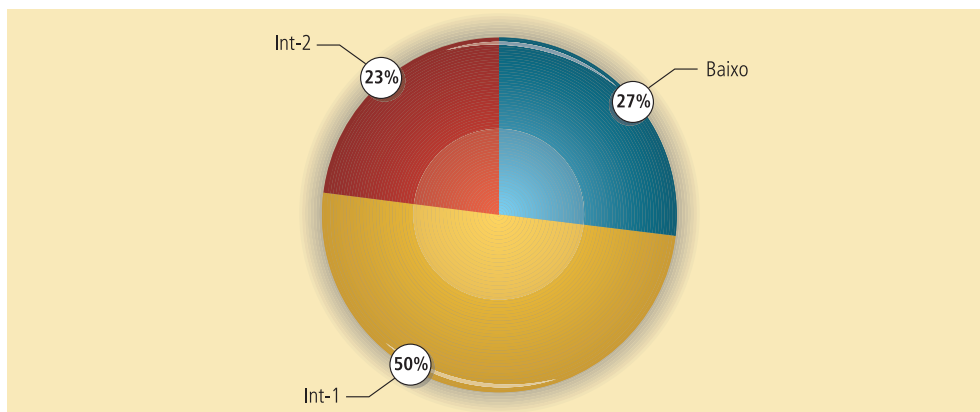


FIGURA 24

Caracterização da população de doentes com SMD segundo o IPSS.

Baixo – baixo risco;
Int-1 – risco intermédio 1;
Int-2 – risco intermédio 2.

TABELA 10

Caracterização clínica e laboratorial dos doentes com SMD

Nome	Idade/Sexo	Subtipo OMS	Cariótipo	IPSS
AC	72/M	CRDM	46 XY	Int-1
AJ	84/M	AREB-2	46 XY	Int-2
APC	76/M	AREB-2	46 XY	Int-2
AG	74/M	CRDM	46 XY	Int-1
AVSA	81/M	CRDM	Trissomia 8	Int-1
EDC	68/F	AR	46 XX	Baixo
FAT	80/F	CRDM	46 XX	Int-1
HJL	74/M	AREB-1	46 XY	Int-1
IDR	78/F	AREB-2	46 XX	Int-2
JMC	56/M	CRDM	46 XY	Int-1
JSS	84/M	AR	46 XY	Baixo
JMR	71/M	AREB-2	46 XY	Int-2
JSVS	62/M	CRDM	46 XY	Int-1
MAJA	80/M	AREB-1	46 XY	Int-1
MAMBM	73/F	AREB-2	46 XX	Int-2
MCPR	77/F	CRDM	46 XX	Int-1
MERM	81/F	5q-	5q-	Baixo
MESPG	82/F	AR	46 XX	Baixo
MA	84/F	CRDM	46 XX	Int-1
MRJP	65/F	CRDM	46 XX	Int-1
MCOC	77/F	AR	46 XX	Baixo
FJHSBMM	77/M	AR	46 XY	Baixo
AJARP	33/F	AREB-1	46 XX	Int-1
AAF	67/M	LMMC	46 XY(3); 45 XY,-6(7)	Int-2
MJPC	82/F	LMMC	46 XX	Int-1
AR	80/M	LMMC	46 XY	Baixo

Os controlos não neoplásicos escolhidos foram 8 doentes com o diagnóstico de PTI; 7 do sexo masculino e 1 do feminino, com uma idade mediana de 72 anos (34-82 anos). Para a caracterização genotípica da enzima MTHFR, foram seleccionados 289 indivíduos saudáveis (controlos saudáveis), após exame físico e laboratorial.

4.2. Avaliação do perfil de metilação dos genes *p15* e *p16* em doentes com Síndrome Mielodisplásica e sua relação com o metabolismo do folato e B12

4.2.1. Avaliação do perfil de metilação dos genes *p15* e *p16*

Dos 26 doentes com SMD estudados 13 (50%) apresentam metilação das regiões promotoras de pelo menos um dos genes analisados, 5 apresentam ambos os genes metilados, enquanto em 12 doentes (46%) não se detectou metilação em nenhum dos genes. Uma das amostras de ADN de um doente com AR não amplificou (Figura 25).

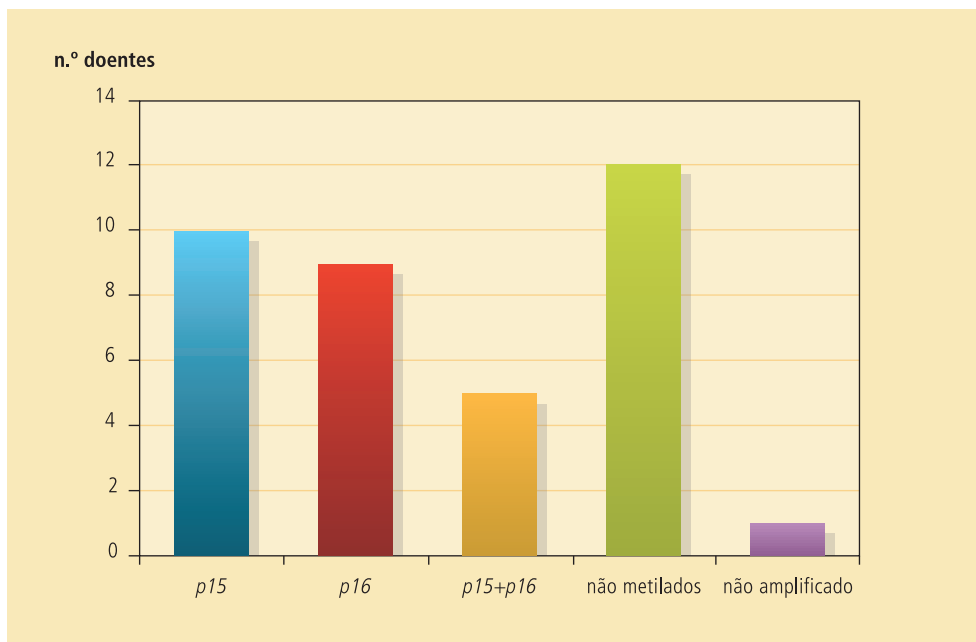


FIGURA 25

Avaliação da metilação dos genes *p15* e *p16* em doentes com SMD.

A figura representa os doentes que tem metilação do *p15* e/ou *p16*, isoladamente e/ou de ambos os genes (*p15+p16*). A metilação das regiões promotoras dos referidos genes foi efectuada por MS-PCR como descrito na secção de materiais e métodos.

Posteriormente, fomos analisar o perfil de metilação da região promotora dos genes *p15* e *p16* nos doentes de acordo com os diferentes subtipos de SMD. Como podemos observar na figura 26, o gene *p15* encontra-se metilado em 10 doentes, sendo em 5 deles (subtipos AR-1; CRDM-2; LMMC-2) isoladamente e noutros 5 associado à metilação do gene *p16* (AR-3; CRDM-1; síndrome 5q- 1). Por outro lado, a metilação da região promotora do gene *p16* está presente em 9 doentes, dos quais 4 (2 com CRDM e 2 com AREB-1) apresentam metilação deste gene isoladamente (Figura 26).

No entanto, como podemos verificar na figura 27, 5 doentes (19%) apresentam ambas as regiões promotoras dos genes *p15* e *p16* metiladas, dos quais 3 pertencem ao subtipo AR, 1 apresenta síndrome 5q- e 1 foi classificado como CRDM.

FIGURA 26

Avaliação da metilação isolada dos genes *p15* e *p16* em doentes SMD de acordo com os diferentes subtipos OMS.

A figura representa os doentes que tem metilação do *p15* ou do *p16*. A metilação das regiões promotoras dos referidos genes foi efectuada por MS-PCR como descrito na secção de materiais e métodos.

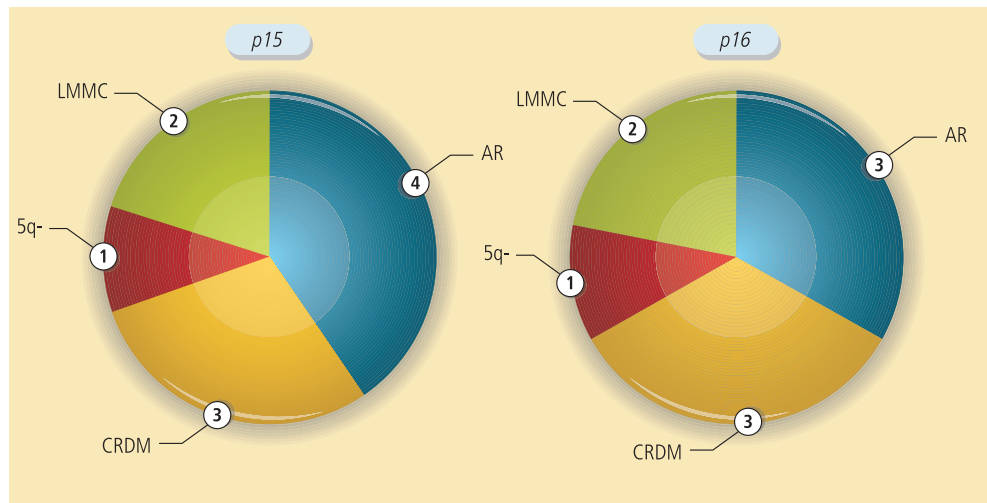
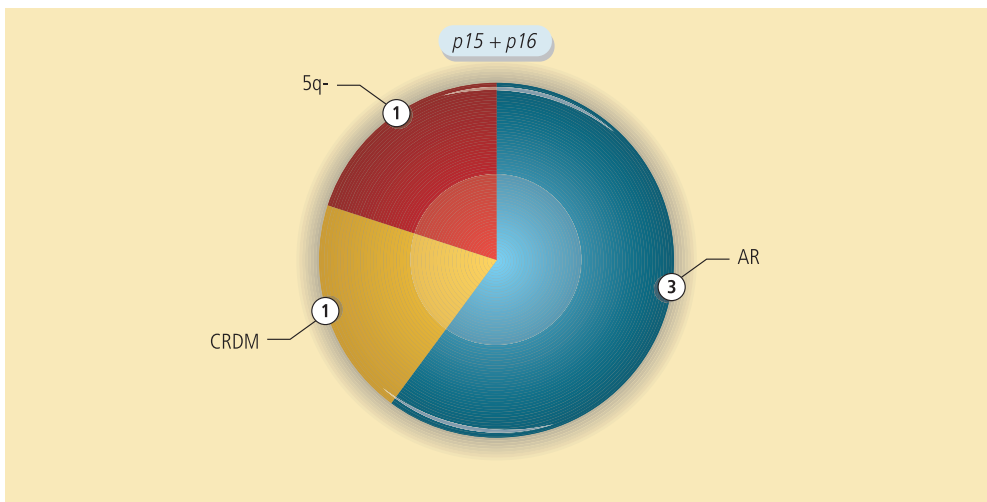


FIGURA 27

Avaliação da metilação simultânea dos genes *p15* e *p16* em doentes SMD de acordo com os diferentes subtipos OMS.

A figura representa os doentes que apresentam simultaneamente os genes *p15* e *p16* metilados. A metilação das regiões promotoras dos referidos genes foi efectuada por MS-PCR como descrito na secção de materiais e métodos.



Relacionando a metilação com o IPSS verificámos que apenas os doentes com risco baixo e intermédio-1 apresentam os genes *p15* e *p16* metilados, com excepção de um doente com LMMC que tem IPSS Int-2 e apresenta metilação do *p15* (Figura 28). De salientar que aproximadamente 80% dos doentes de baixo risco apresentam metilação dos dois genes estudados, *p15* e *p16* (Figura 29). Os restantes doentes, na categoria intermédio-2, que correspondem aos doentes com AREB-2 (42%) não demonstraram alterações do padrão de metilação como se pode verificar na figura 30.

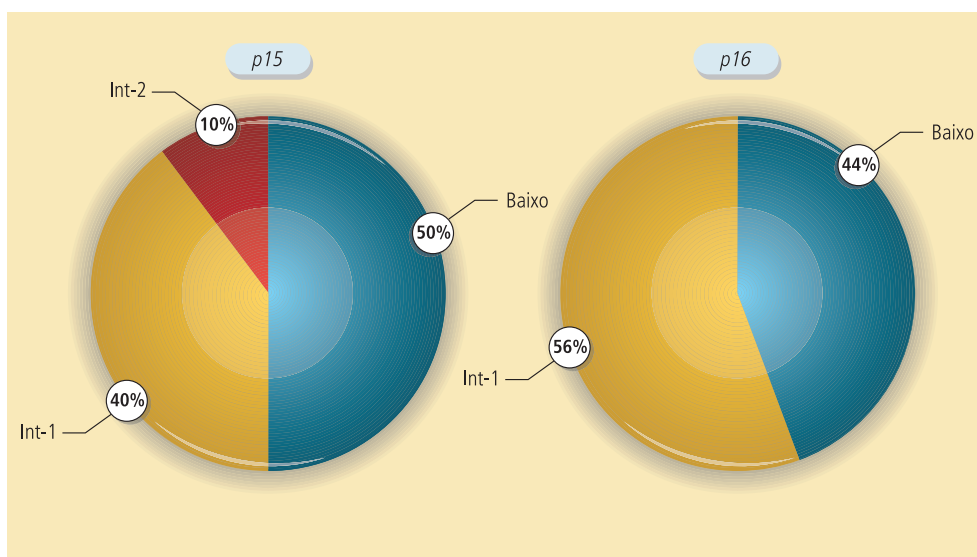


FIGURA 28

Avaliação da metilação isolada dos genes *p15* e *p16* em doentes SMD de acordo com IPSS.

A figura representa os doentes que tem metilação do *p15* e/ou *p16*, isoladamente e/ou em associação. A metilação das regiões promotoras dos referidos genes foi efectuada por MS-PCR como descrito na secção de materiais e métodos. Os resultados são expressos em percentagem (%).

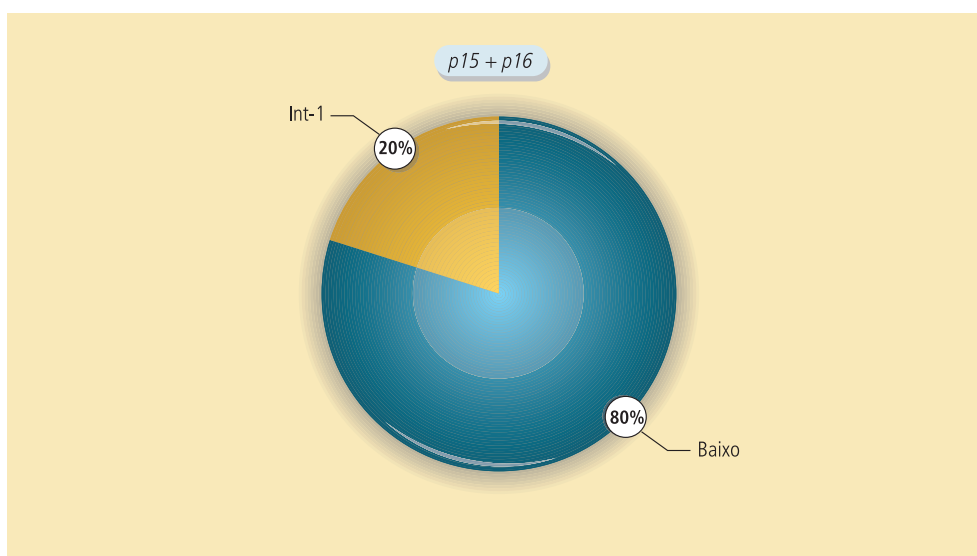


FIGURA 29

Avaliação da metilação simultânea dos genes *p15* e *p16* em doentes SMD de acordo com IPSS.

A figura representa os doentes que tem simultaneamente metilação dos genes *p15* e *p16*. A metilação das regiões promotoras dos referidos genes foi efectuada por MS-PCR como descrito na secção de materiais e métodos. Os resultados são expressos em percentagem (%).

De facto, podemos observar que dos doze doentes onde não foi detectada metilação de nenhum dos genes, a maior parte é do subtipo AREB-2 (Figura 30).

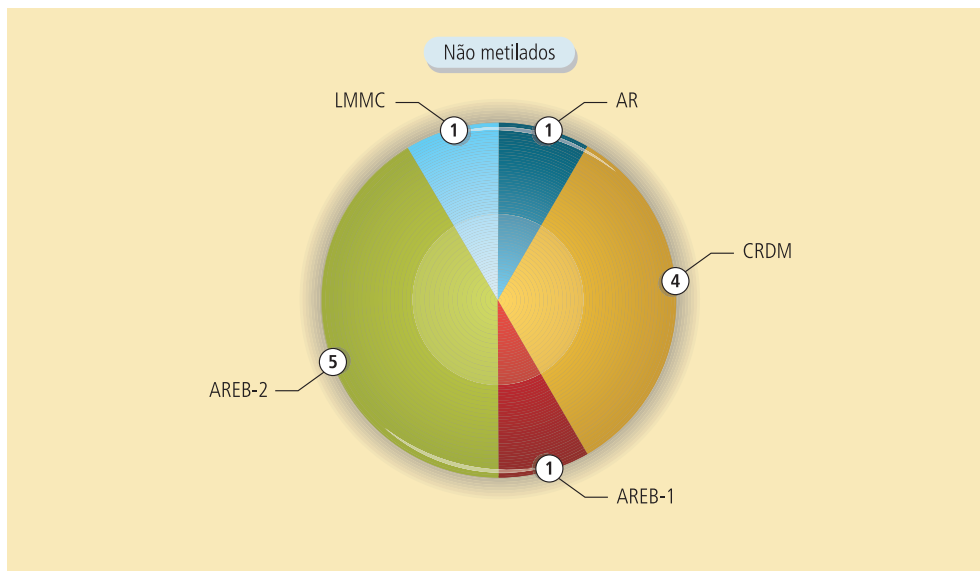


FIGURA 30

Avaliação da desmetilação dos genes *p15* e *p16* em doentes SMD de acordo com o subtipo OMS e com o IPSS.

Resumindo, relativamente aos subtipos de SMD, verificámos que dos 5 doentes com AR, 3 apresentam metilação dos dois genes, 1 apresenta metilação do *p16* e noutro doente o ADN não amplificou. O subtipo CRDM está representado com 9 doentes, 5 dos quais com alterações na metilação: 2 com metilação do *p15*, 2 com metilação do *p16* e 1 com ambos os genes metilados. Dos 3 doentes com AREB-1, 2 exibem metilação do *p16*. Os 3 doentes com o subtipo LMMC não apresentam metilação do gene *p16*, mas 2 deles demonstraram metilação do gene *p15*. O doente com síndrome 5q apresenta ambos os genes metilados. Como já foi referido, em nenhum doente com AREB-2 detectámos metilação dos genes *p15* e *p16*.

Além disso, relacionando os dados do perfil de metilação obtidos com o IPSS, verificámos que a maior parte dos doentes que apresentam genes metilados são de risco baixo e intermédio-1, excepto um doente com LMMC que tem IPSS Int-2 e apresenta metilação do *p15*. De facto, quase todos os doentes na categoria intermédio-2, e que correspondem aos doentes com AREB-2, não expressam metilação dos genes estudados. De salientar que nenhuma das amostras de medula dos controlos não malignos evidenciou metilação dos genes *p15* ou *p16*.

4.2.2. Análise dos doseamentos séricos do folato e vitamina B12

Após avaliação do perfil de metilação dos genes *p15* e *p16* fomos verificar se este se correlaciona com os níveis séricos de folato e vitamina B12.

Como podemos observar na figura 31, em média, não existem diferenças significativas nos níveis séricos do folato determinados em doentes com SMD relativamente aos controlos.

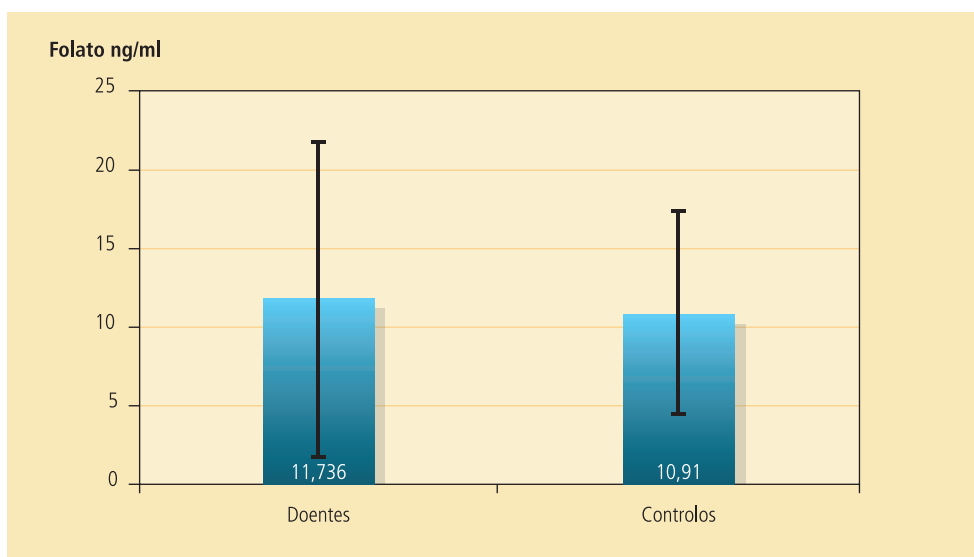


FIGURA 31

Avaliação dos níveis séricos de folato.

A figura representa a determinação da concentração sérica média de folato \pm desvio padrão nos doentes e controlos de acordo com o descrito na secção de materiais e métodos. Os resultados estão expressos em ng/ml.

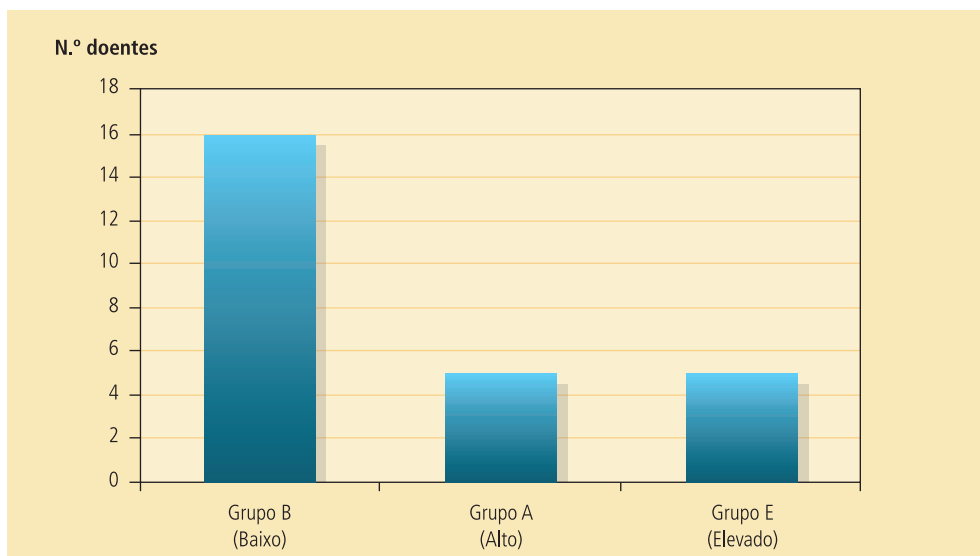
No entanto, e com o objectivo de proceder a uma análise mais detalhada destes resultados, considerámos o valor normal de folato sérico, para o kit utilizado, entre 1 a 20 ng/mL, e dividimos os doentes em três grupos, de acordo com os valores de folato obtidos. Deste modo, considerámos um grupo B (Baixo), correspondente a valores de folato sérico entre 1 a 10 ng/mL, um grupo A (Alto) que inclui os doentes com valores de folato sérico entre 11 e 20 ng/mL e um grupo E (Elevado) onde incluímos os doentes com folato superior a 20 ng/ml (Figura 32).

Como podemos verificar na figura 32, mais de 50% dos doentes (16 dos 26 doentes) tem valores de folato baixos (grupo B). Por outro lado, dos restantes 10 doentes, 5 tem valores de folato considerados altos (grupo A) e os outros 5 apresentam valores acima do limite superior considerado (grupo E).

FIGURA 32

Distribuição dos doentes com SMD de acordo com os níveis séricos de folato.

O doseamento do folato sérico foi efectuado nos doentes SMD de acordo com o descrito na secção de materiais e métodos. Posteriormente, os doentes foram distribuídos em 3 grupos de acordo com a gama de concentrações obtidas para o folato sérico; Grupo B (Baixo), entre 1 a 10 ng/mL, grupo A (Alto) entre 11 e 20 ng/mL e grupo E (Elevado) com folato superior a 20 ng/mL.

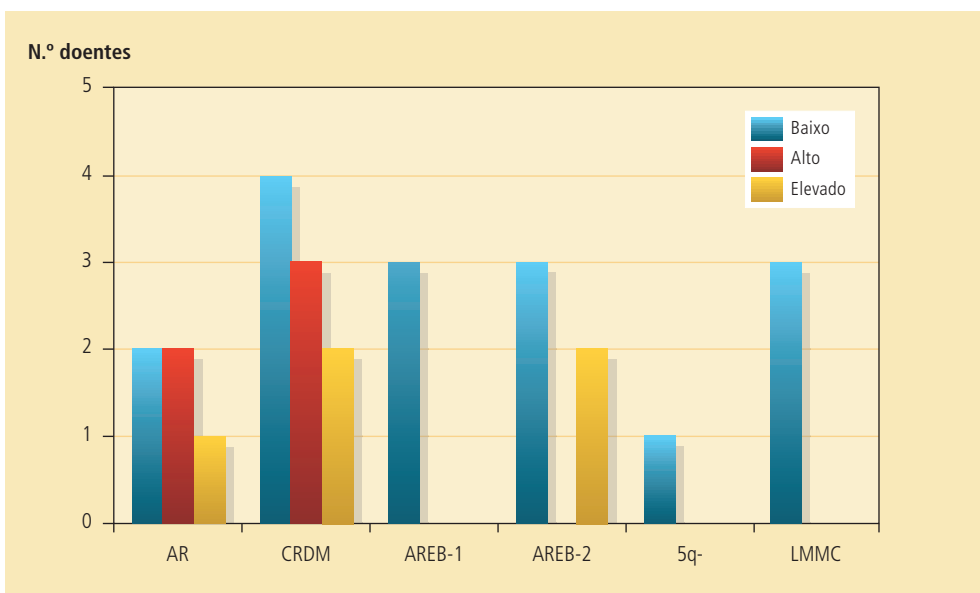


Na tentativa de identificar se os níveis de folato variavam com o subtipo de SMD da classificação OMS, fomos avaliar a correlação entre a concentração de folato e os diferentes subtipos de SMD (Figura 33). Como podemos verificar na figura 33, existe o predomínio de baixas concentrações de folato em todos os subtipos de SMD, embora nos subtipos, AR, CRDM e AREB-2 existam doentes com concentrações altas ou elevadas de folato. Pelo contrário nos subtipos AREB-1, 5q- e LMMC, todos os doentes apresentam valores abaixo da média (grupo B).

FIGURA 33

Relação entre os grupos de doentes com diferentes concentrações de folato sérico e os subtipos de SMD segundo a classificação da OMS.

Os doentes foram distribuídos em 3 grupos de acordo com a gama de concentrações obtidas para o folato sérico; Grupo B (Baixo), entre 1 a 10 ng/mL, grupo A (Alto) entre 11 e 20 ng/mL e grupo E (Elevado) com folato superior a 20 ng/mL.



Seguidamente, fomos analisar a relação entre os diferentes grupos de níveis de folato, A, B e E, e a metilação/desmetilação dos genes *p15* e *p16* (Figuras 34 e 35).

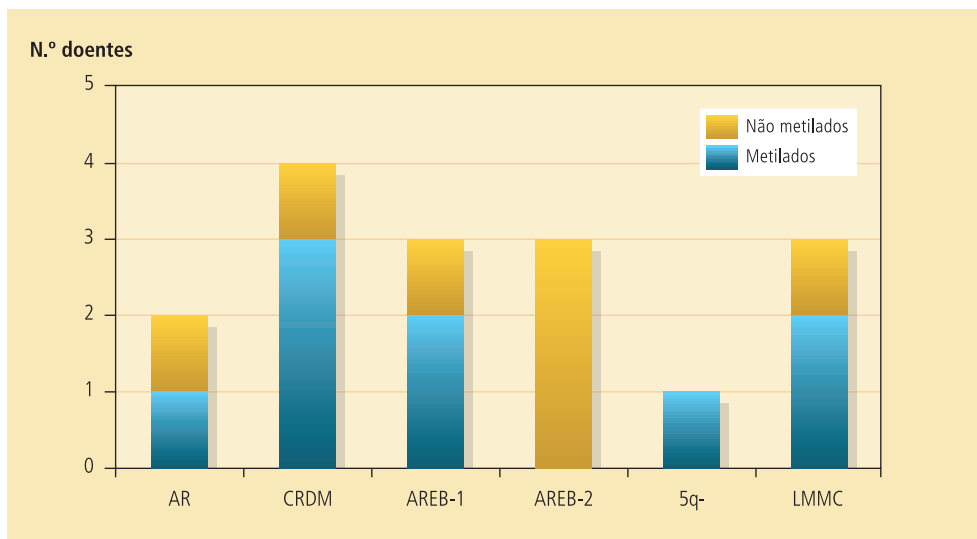


FIGURA 34

Avaliação do perfil de metilação dos genes *p15* e *p16* nos vários subtipos da OMS, em doentes SMD com baixos níveis de folato.

Na figura está representado a distribuição do perfil de metilação nos diferentes subtipos SMD nos doentes com níveis de folato entre 1 e 10 ng/L (grupo B).

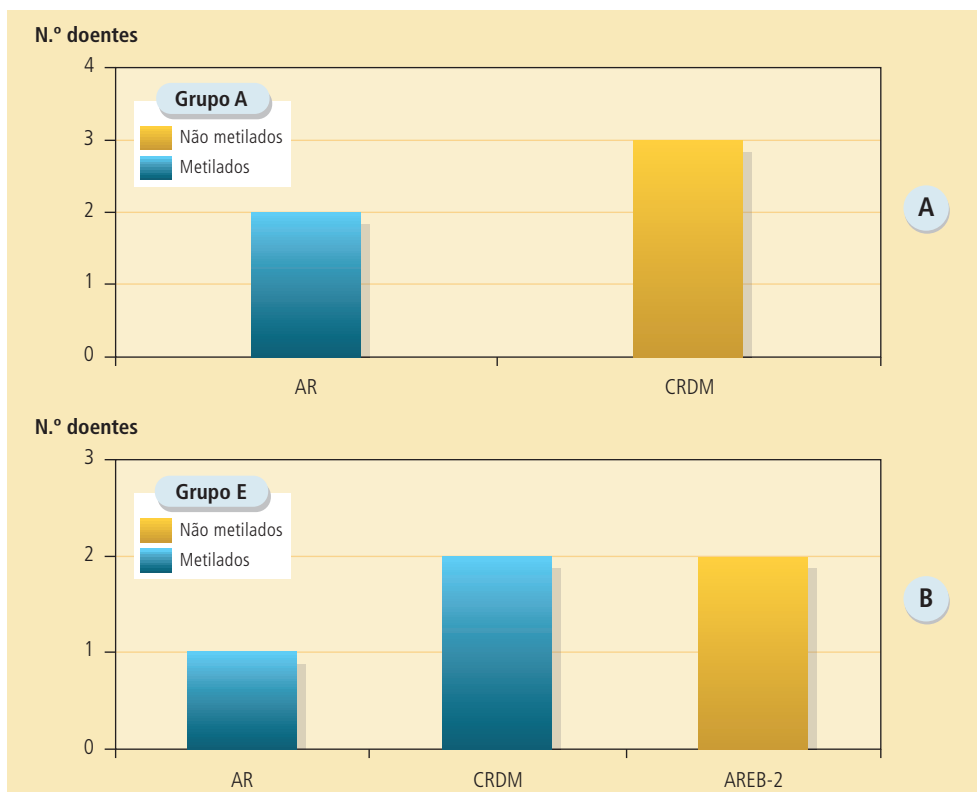


FIGURA 35

Avaliação do perfil de metilação dos genes *p15* e *p16* nos vários subtipos da OMS nos grupos com concentrações de folato A e E.

Os doentes do grupo A (Alto) têm concentração sérica de folato entre 11 e 20 ng/mL e os do grupo E (Elevado) têm concentrações de folato superiores a 20 ng/ml.

Como podemos observar na figura 34, dos 16 doentes com doseamento de folato mais baixo, grupo B, 9 apresentam pelo menos 1 dos genes metilados, dos quais 2 doentes são do subtipo AREB-1, 3 do subtipo CRDM, 1 doente tem AR, 1 tem Síndrome 5q- e 2 doentes têm LMMC. De salientar que 2 destes doentes, 1 com AR e outro com 5q-, apresentam metilação dos 2 genes simultaneamente e que todos os doentes com AREB-2 apresentam os 2 genes desmetilados.

Por outro lado, no grupo A, os 2 doentes do subtipo AR apresentam metilação dos genes (ambos tem o gene *p15* metilado e um deles também o gene *p16*), enquanto nos 3 doentes com CRDM os 2 genes estão desmetilados (Figura 35-A). No entanto, dos doentes com valores elevados de folato sérico ou seja, pertencentes ao grupo E, só os doentes com AREB-2 têm ambos os genes desmetilados; enquanto os doentes AR e CRDM apresentam metilação dos genes em estudo (Figura 35-B).

Por último, fomos analisar a relação entre os grupos de risco prognóstico do IPSS e os níveis de folato dos grupos A, B e E. Como podemos verificar na tabela 11, a maior parte dos doentes na categoria intermédio-1 apresenta valores de folato abaixo da média, ou seja, pertencem ao grupo B.

TABELA 11

Relação entre o doseamento de folato sérico e os grupos de IPSS	Concentração de Folato (por grupos)	IPSS		
		Baixo	Intermédio-1	Intermédio-2
B		4	5	4
A		2	3	0
E		1	2	2

Relativamente aos valores da concentração do folato sérico nos indivíduos controlo, verificámos que a maioria (n=6) apresenta valores baixos de folato. Apenas um controlo tem valor de folato sérico alto e outro apresenta concentração elevada, provavelmente devido a terapêutica com ácido fólico.

A figura 36 representa os níveis séricos de vitamina B12 determinados em doentes com SMD e em controlos. Como podemos verificar os doentes com SMD apresentam em média tendência para menor concentração sérica de vitamina B12 em relação aos indivíduos controlo. No entanto, a diferença não tem significado estatístico.

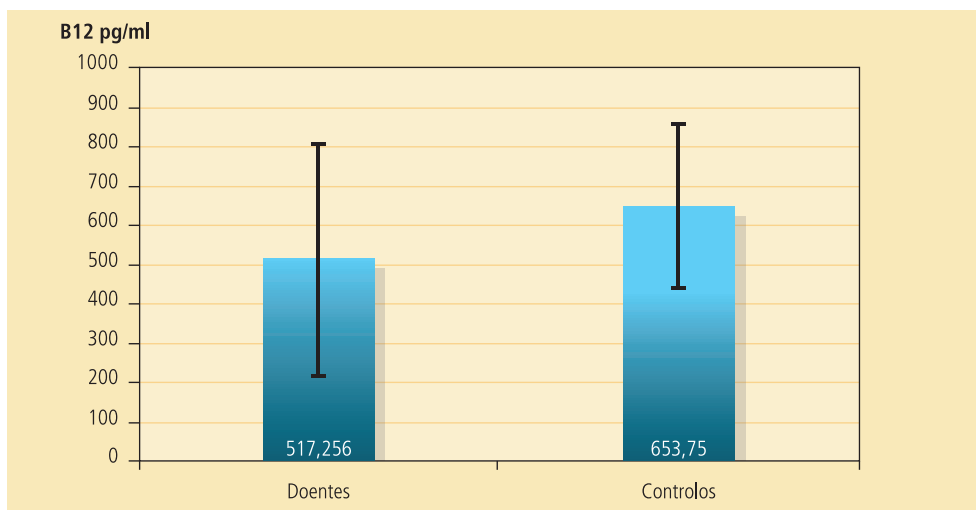


FIGURA 36

Avaliação dos níveis séricos de B12.

A figura representa a determinação da concentração sérica média de vitamina B12 \pm desvio padrão nos doentes e controlos de acordo com o descrito na secção de materiais e métodos. Os resultados estão expressos em pg/ml.

À semelhança do folato, os doentes foram distribuídos em 3 grupos de acordo com a gama de concentrações obtidas para a vitamina B12; grupo B (Baixo), entre 210 a 555 pg/mL, grupo A (Alto) entre 556 e 900 pg/mL e grupo E (Elevado) com vitamina B12 superior a 900 pg/ml.

Verificámos que predominam os doentes com valores mais baixos (grupo B) de B12 (n=17), seguidos por 5 doentes no grupo A e 4 doentes com valores acima do limite superior considerado (grupo E), como se encontra representada na figura 37.

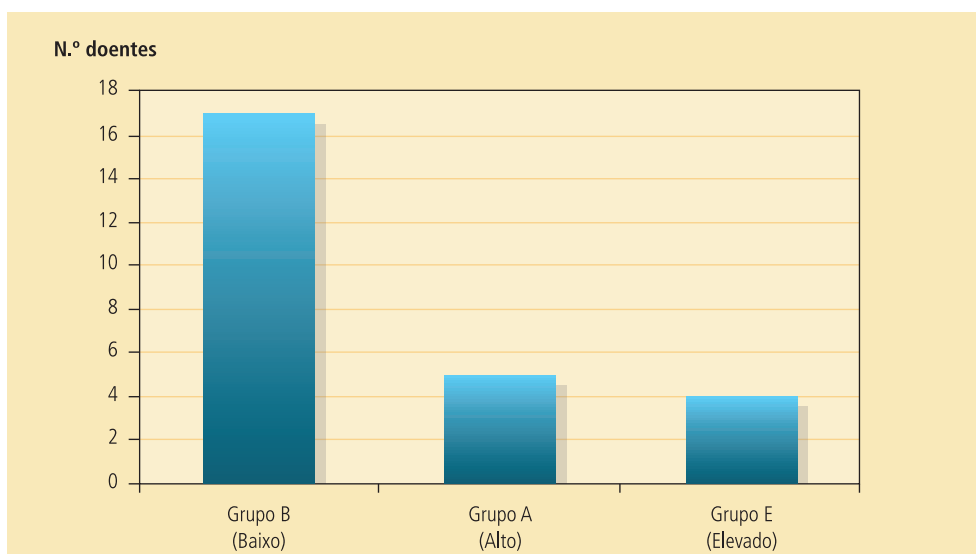


FIGURA 37

Distribuição dos doentes SMD de acordo com os níveis séricos de B12.

O doseamento de B12 foi efectuado nos doentes SMD de acordo com o descrito na secção de materiais e métodos. Posteriormente, os doentes foram distribuídos em 3 grupos de acordo com a gama de concentrações obtidas para a vitamina B12 sérica, ou seja, grupo B (Baixo), entre 210 a 555 pg/mL, grupo A (Alto) entre 556 e 900 pg/mL e grupo E (Elevado) com vitamina B12 superior a 900 pg/ml.

Seguidamente relacionámos os grupos de doentes SMD distribuídos de acordo com a gama de concentrações obtidas para a vitamina B12 sérica, com os subtipos de SMD segundo a OMS (Figura 38). Os resultados representados na figura 38 mostram que os doentes com SMD que apresentam níveis mais baixos de vitamina B12 (grupo B) são do subtipo CRDM, enquanto que no grupo A predomina o subtipo AREB-1 (Figura 38).

À semelhança do que fizémos para o folato, analisámos a relação entre os diferentes grupos de doentes com base nos valores séricos de vitamina e o estado de metilação dos genes *p15* e *p16*. Como podemos verificar na figura 39, dos doentes com valores de B12 inferiores à média, ou seja do grupo B, 10 apresentam pelo menos 1 gene metilado, sendo que 5 doentes têm alterações da metilação no *p16* e 8 doentes no gene *p15*.

FIGURA 38

Relação entre os grupos de doentes com diferentes concentrações de vitamina B12 sérica e os subtipos de SMD segundo a classificação da OMS.

Os doentes foram distribuídos em 3 grupos de acordo com a gama de concentrações obtidas para a vitamina B12 sérica; grupo B (Baixo), entre 210 a 555 pg/mL, grupo A (Alto) entre 556 e 900 pg/mL e grupo E (Elevado) com vitamina B12 superior a 900 pg/ml.

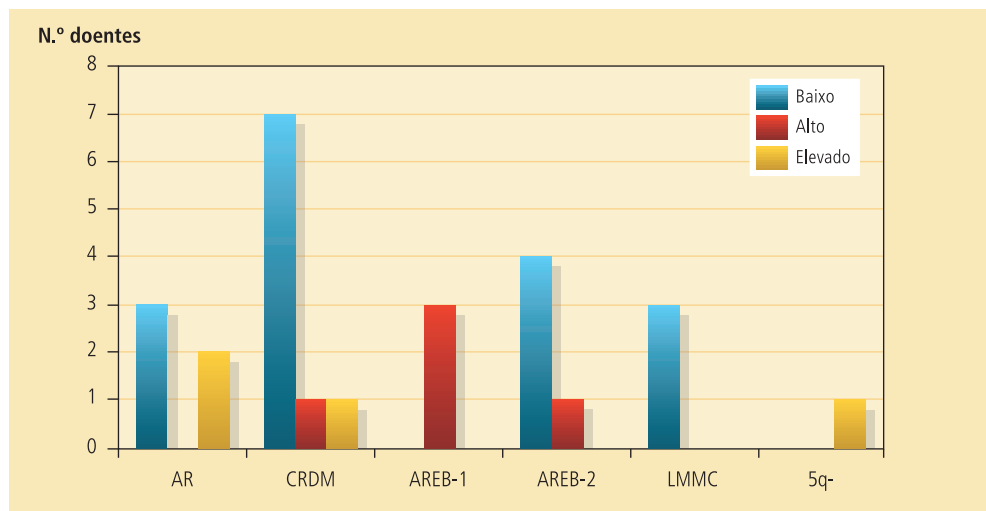
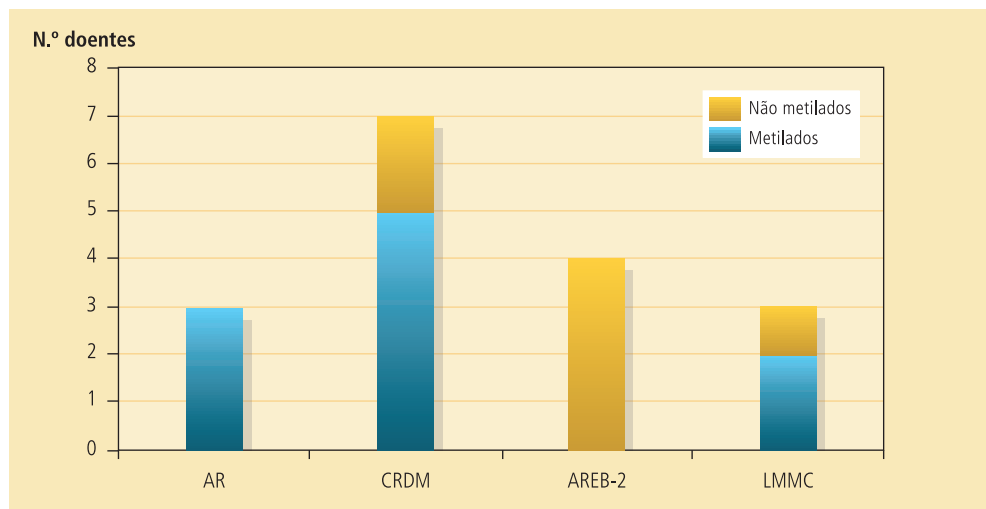


FIGURA 39

Avaliação do perfil de metilação dos genes *p15* e *p16* nos vários subtipos da OMS, em doentes SMD com baixos níveis de vitamina B12.

Na figura está representada a distribuição do perfil de metilação nos diferentes subtipos SMD nos doentes com níveis de B12 entre 210 a 555 pg/mL (grupo B).



Por outro lado, no grupo de doentes com valores de B12 entre 555 e 900 pg/ml (grupo A), somente os 2 doentes com o subtipo AREB-1 apresentam metilação do gene supressor tumoral *p16* (Figura 40-A).

Por outro lado, no grupo E, ou seja, nos doentes com valores de B12 acima do limite superior, apenas 2 doentes, 1 com 5q- e outro com AR apresentam metilação dos 2 genes. Num doente com AR o ADN não amplificou e o doente com CRDM não demonstrou alterações na metilação (Figura 40-B).

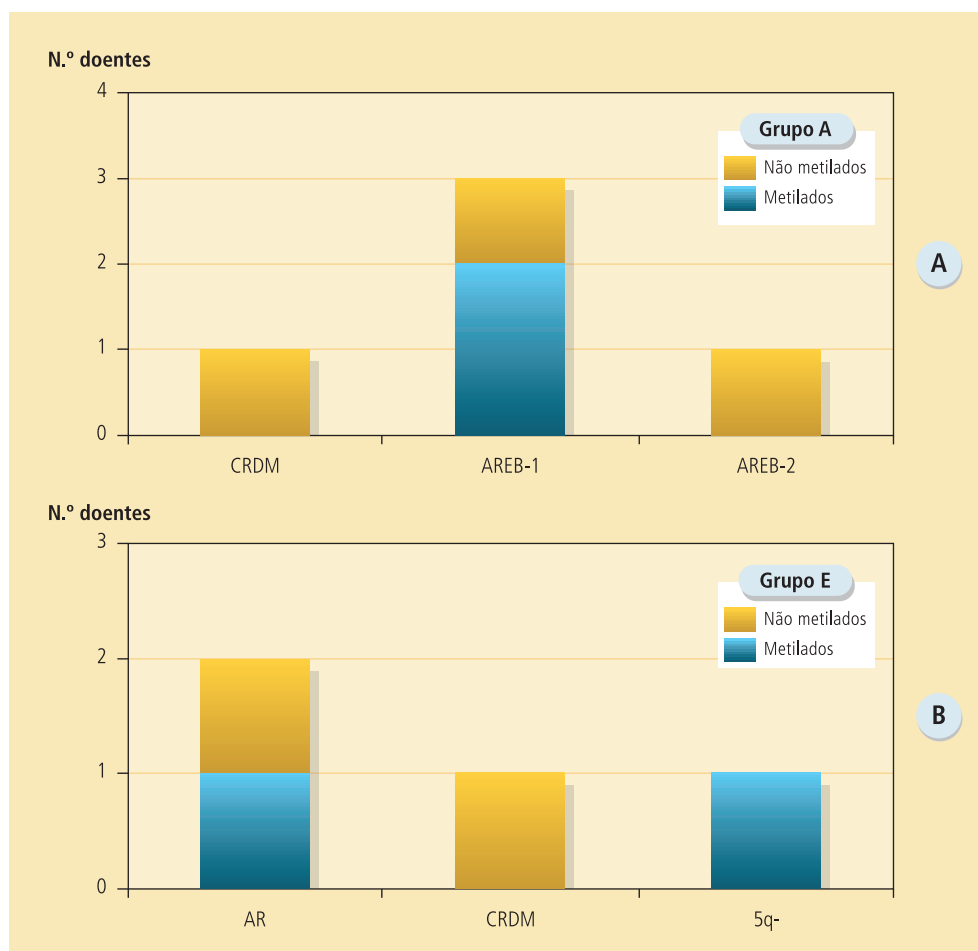


FIGURA 40

Avaliação do perfil de metilação dos genes *p15* e *p16* nos vários subtipos da OMS, nos grupos A e E de vitamina B12.

Os doentes do grupo A (Alto) apresentam valores de B12 entre 556 e 900 pg/mL e os do grupo E (Elevado) vitamina B12 superior a 900 pg/ml

Seguidamente relacionámos a metilação do *p15* e *p16* com os grupos de B12 A, B e E (Figura 41).

A figura 41 mostra um predomínio claro dos níveis baixos de B12 (grupo B) em doentes com genes metilados, embora sem valor estatisticamente significativo.

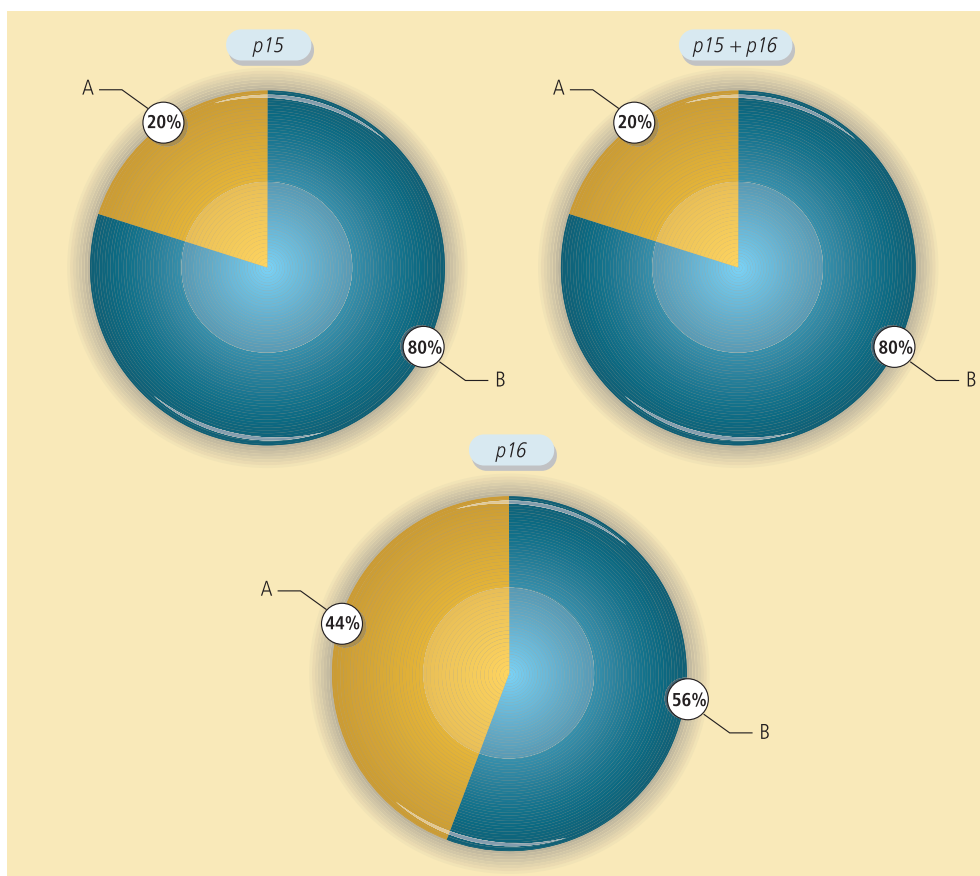


FIGURA 41

Relação entre os doseamentos séricos de B12 e a metilação dos genes *p15* e *p16*.

Para concluir esta parte do estudo, fomos analisar a relação entre os grupos de risco prognóstico do IPSS e os níveis de vitamina B12 dos grupos A, B e E. Como podemos verificar na tabela 12, a maior parte dos doentes na categoria intermédio-1 apresenta valores de B12 abaixo da média, ou intermédios ou seja, pertencem aos grupo B e A.

TABELA 12

Relação entre os doseamentos de B12 sérica e os grupos de IPSS	Concentração de B12 (por grupos)	IPSS		
		Baixo	Intermédio-1	Intermédio-2
B		4	8	5
A		0	4	1
E		3	1	2

Apenas um controlo não apresenta doseamento de B12 dentro da gama de valores correspondente ao grupo B.

4.2.3. Caracterização genotípica das variantes polimórficas da enzima metilenotetrahidrofolato reductase

O estudo das variantes polimórficas da MTHFR, C677T e A1298C foi efectuado por PCR em sangue periférico de doentes com SMD e em controlos não neoplásicos (PTI) e saudáveis.

4.2.3.1. Frequência dos diferentes genótipos da mutação MTHFR C677T

A frequência e percentagem dos diferentes genótipos da mutação da MTHFR, C677T em doentes e controlos está representada na tabela 13 e figura 42.

A maioria dos doentes (n=20; 76,9%) é portadora do polimorfismo C677T em heterozigotia (CT) (Figura 42), independentemente do subtipo de SMD (Figura 43). Pelo contrário, nos controlos existe uma distribuição idêntica dos polimorfismos da MTHFR, C677T e C677C. Por outro lado, encontram-se diferenças significativas na prevalência destes polimorfismos entre as populações SMD e controlo (Tabela 13).

TABELA 13

Genótipos	Doentes SMD		Controlos não neoplásicos		Controlos saudáveis	
	(n)	%	(n)	%	(n)	%
MTHFR C677C	5	19,2	3	42,9	98	39,5
MTHFR C677T	20	76,9	3	42,9	113	45,6
MTHFR T677T	1	3,8	1	14,3	37	14,9

Frequência e percentagem dos diferentes genótipos da MTHFR em doentes SMD e controlos

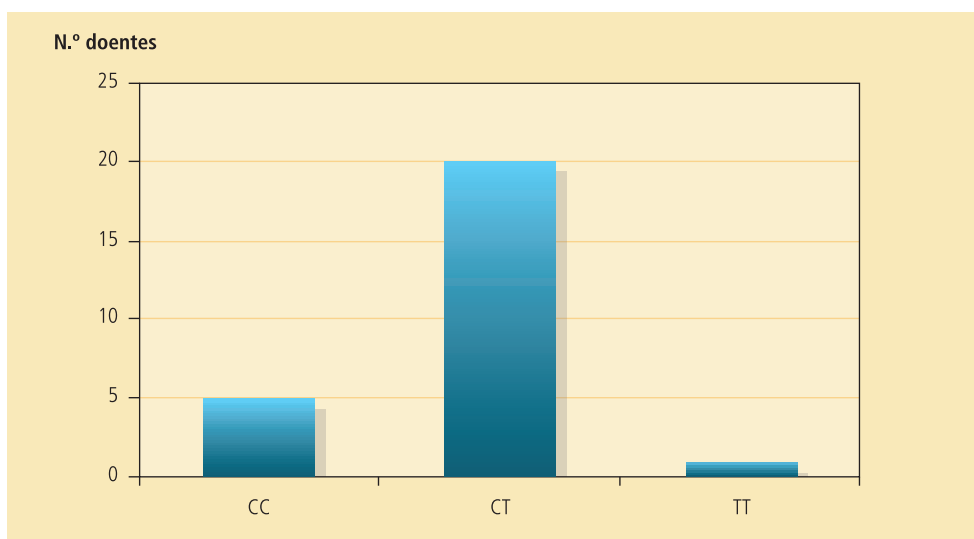


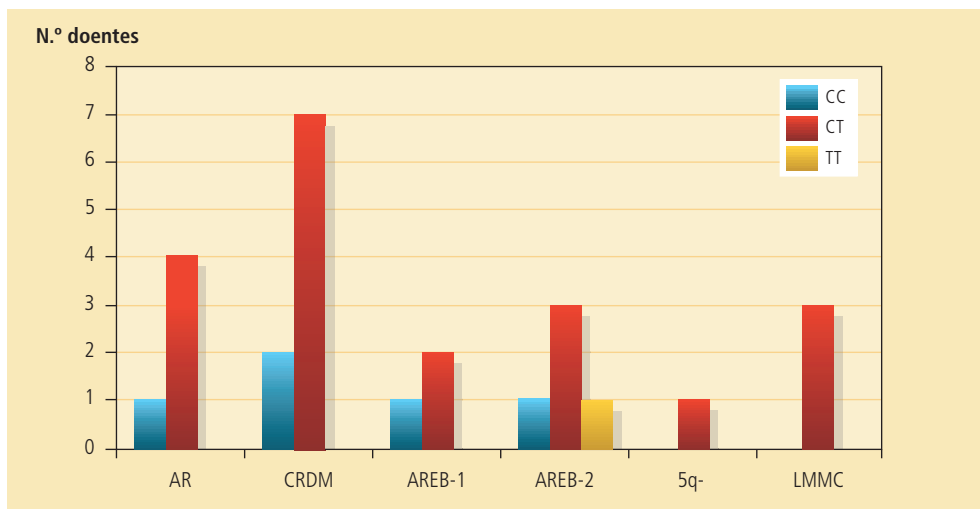
FIGURA 42

Frequência/distribuição dos genótipos da MTHFR C677T em doentes com SMD.

Quando relacionámos os diferentes genótipos do polimorfismo da enzima MTHFR com os diferentes subtipos de SMD, verificámos que em todos existe um predomínio do genótipo CT. De salientar que nos doentes com LMMC só existe o genótipo em heterozigotia C677T. Além disso, o polimorfismo em homozigotia (TT) apenas foi observado num doente com AREB-2 (Figura 43).

FIGURA 43

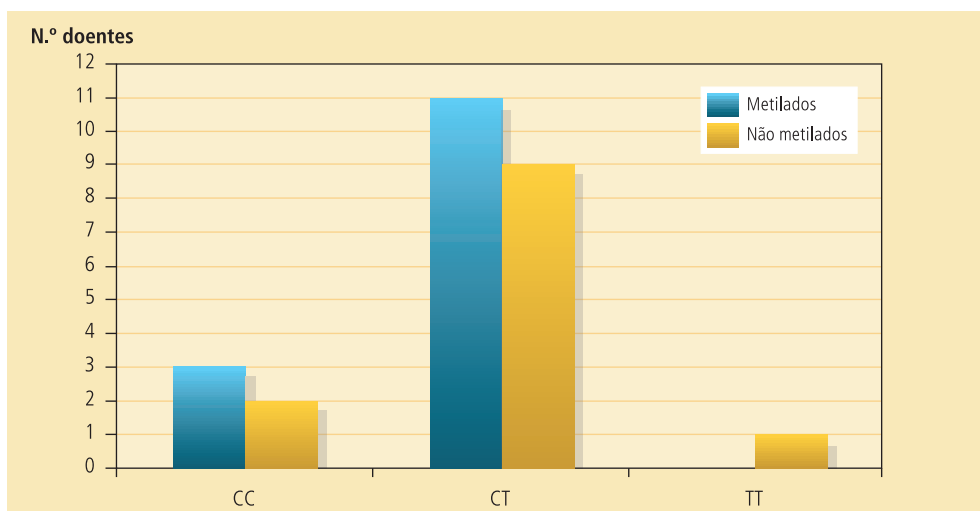
Distribuição/frequência dos genótipos da MTHFR C677T nos diferentes subtipos de SMD da OMS.



Posteriormente, fomos analisar a relação entre as variantes genotípicas da MTHFR C677T e o estado de metilação dos genes *p15* e *p16*. Como podemos observar na figura 44, apesar de um predomínio de genes metilados nas variantes

FIGURA 44

Distribuição das variantes genotípicas da MTHFR C677T em função do perfil de metilação/desmetilação dos genes *p15* e *p16*.



homozigóticas e heterozigóticas CC e CT, não existem diferenças significativas no perfil de metilação/desmetilação em relação com estes genótipos, nem destes com os diferentes subtipos de SMD (Figura 45). No entanto, o único doente com o alelo TT, do subtipo AREB-2, não apresenta metilação do gene *p15* ou *p16* (Figura 44), tal como acontece nas outras variantes genótípicas dos doentes com AREB-2 (Figura 45).

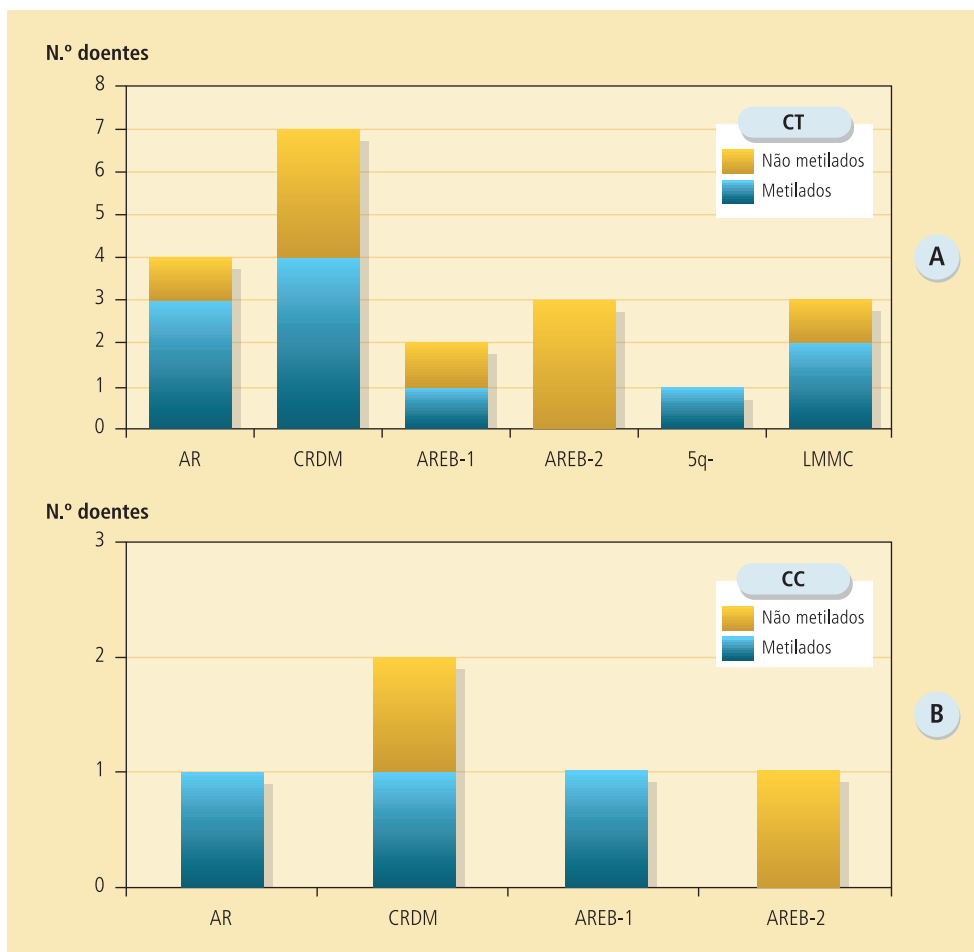


FIGURA 45

Relação entre os genótipos CT (A) e CC (B) e a metilação/desmetilação dos genes *p15* e *p16* nos diferentes subtipos de doentes SMD.

Finalmente, fomos verificar se na nossa população do estudo existia alguma correlação entre os diferentes genótipos da MTHFR C677T e o IPSS. Como podemos verificar na tabela 14, a maior parte dos doentes tem um IPSS intermédio-1, sendo a variante CT a mais frequente. Apesar do número de doentes relativamente pequeno, os resultados sugerem que a variante CT é a mais prevalente independentemente do grupo de risco prognóstico. Por outro lado, o único doente com o genótipo TT tem um IPSS intermédio-2.

TABELA 14

Representação da frequência dos genótipos MTHFR C677T segundo o grupo de risco do IPSS

Genótipos MTHFR C677T	IPSS		
	Baixo	Intermédio-1	Intermédio-2
CC	1	3	1
CT	6	10	4
TT	0	0	1

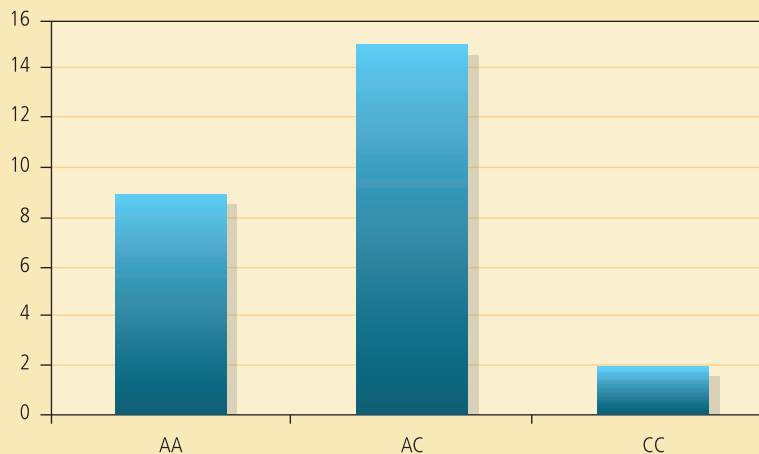
4.2.3.2. Frequência dos diferentes genótipos da mutação MTHFR A1298C

A frequência e percentagem dos diferentes genótipos da mutação da MTHFR, A1298C em doentes e controlos está representada na tabela 15 e figura 46. A maioria dos doentes (n=15; 57,7%) tem o genótipo da MTHFR A1298C em heterozigotia (AC) (Figura 46), independentemente do subtipo de SMD (Figura 47). Pelo contrário, apenas nos controlos saudáveis existe uma distribuição idêntica dos polimorfismo da MTHFR, A677A e A677C. Por outro lado, encontram-se diferenças significativas na prevalência destas polimorfismos em homozigotia entre as populações SMD e controlo (Tabela 15).

TABELA 15

Frequência e percentagem dos diferentes genótipos da MTHFR A1298C em doentes SMD e controlos

Genótipos	Doentes SMD		Controlos não neoplásicos		Controlos saudáveis	
	(n)	%	(n)	%	(n)	%
MTHFR A1298A	9	34,6	2	28,6	123	49,6
MTHFR A1298C	15	57,7	5	71,4	105	42,3
MTHFR C1298C	2	7,7	0	0	35	16,7

N.º doentes**FIGURA 46**

Representação da frequência dos genótipos da MTHFR A1298C em doentes com SMD.

Além disso, quando relacionámos os diferentes genótipos do polimorfismo A1298C da enzima MTHFR com os diferentes subtipos de SMD, verificámos que em todos existe um predomínio do genótipo AC, com excepção da AR onde predomina o genótipo AA (Figura 47). De referir que dois doentes, 1 com AR e outro com CRDM, apresentam o polimorfismo em homozigotia (CC), e que em ambos existe alteração da metilação de pelo menos um gene (Figura 48).

Na figura 48 está representada a relação entre as variantes genotípicas da MTHFR A1298C e o estado de metilação dos genes *p15* e *p16*. Como podemos observar existe um predomínio de genes desmetilados na variante homozigótica AA, enquanto que existe um maior número de doentes com genes metilados na variante heterozigótica AC e homozigótica CC.

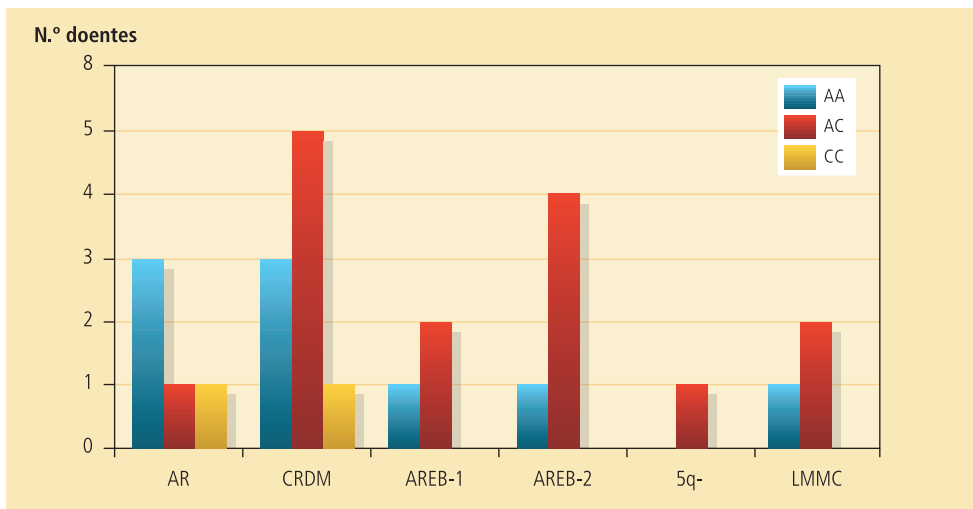


FIGURA 47

Distribuição/frequência dos genótipos da MTHFR A1298C de acordo com os subtipos de SMD, segundo a OMS.

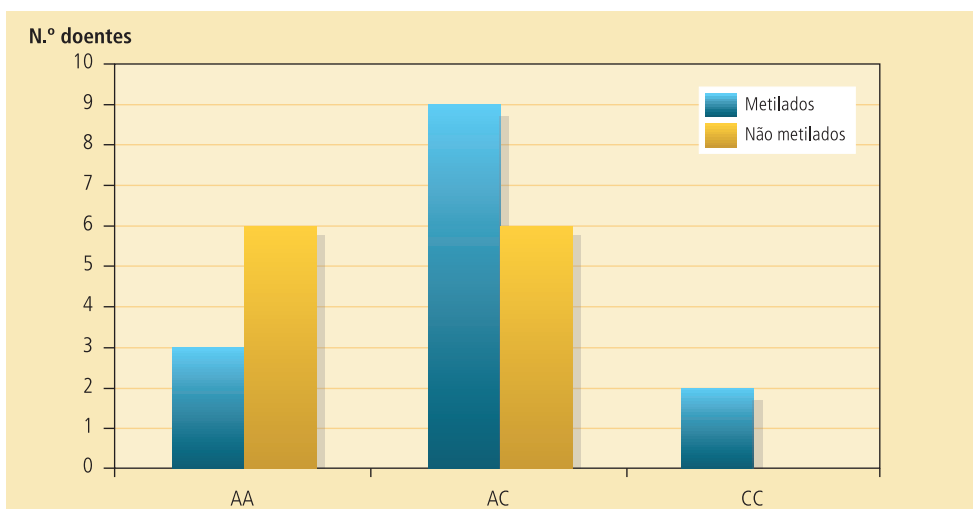
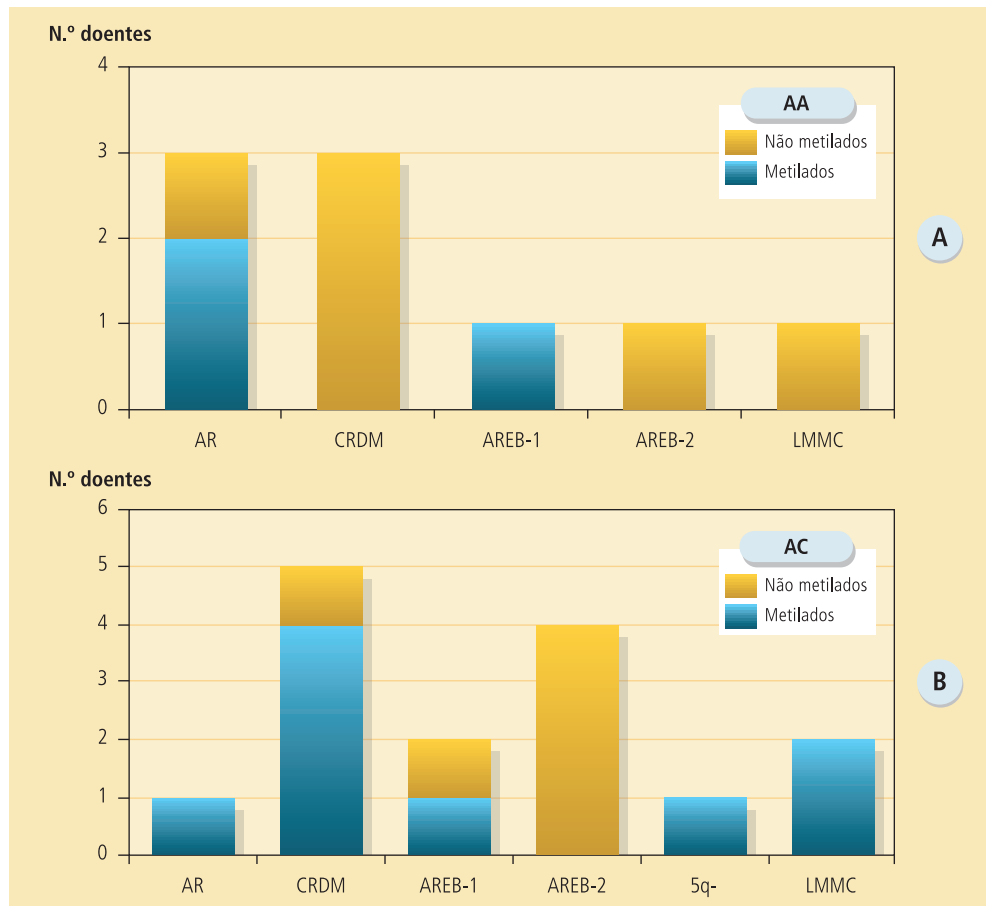


FIGURA 48

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

Apesar de não existirem diferenças significativas no perfil de metilação/desmetilação em relação com estes genótipos nos diferentes subtipos de SMD (Figura 49) verifica-se que nos doentes com o genótipo AA, apenas nos subtipos AR e AREB-1 encontrámos metilação dos genes *p15* e/ou *p16*, enquanto que todos os doentes com CRDM e genótipo AA, apresentavam os genes desmetilados. Pelo contrário, na variante em heterozigotia AC, a maior parte dos doentes com CRDM tem metilação de pelo menos 1 gene (Figura 49). Salienta-se que no subtipo AREB-2, a desmetilação dos genes é independente do genótipo, uma vez que todos os doentes deste subtipo, quer com o genótipo AA ou AC, não evidenciaram metilação em nenhum gene estudado (Figura 49).



Quanto ao genótipo CC, este está presente somente em dois doentes, um com AR e outro com CRDM, associados ambos com alteração da metilação de pelo menos um gene. O doente com AR tem os genes *p15* e *p16* metilados e o doente com CRDM apresenta metilação do *p15* (Figura 50).

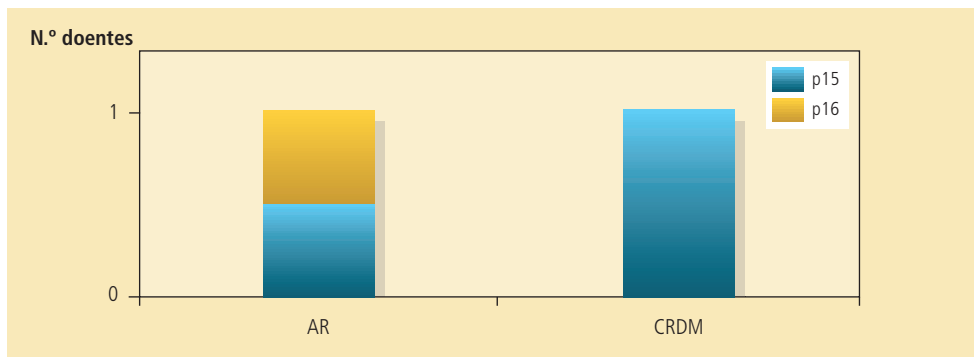


FIGURA 50

Relação do genótipo CC com os subtipos OMS e a metilação dos genes *p15* e *p16*.

Seguidamente, analisámos a relação entre os diferentes genótipos do polimorfismo A1298C da MTHFR com os grupos de IPSS. Verificámos um predomínio do genótipo em heterozigotia, AC, nos grupos intermédio-1 e -2, enquanto nas categorias de menor risco se verifica um predomínio em homozigotia, AA (Tabela 16).

TABELA 16

Genótipos do Polimorfismo A1298C	IPSS		
	Baixo	Intermédio-1	Intermédio-2
AA	4	4	1
AC	2	8	5
CC	1	1	0

Representação da frequência dos genótipos do polimorfismo A1298C da MTHFR segundo o grupo de risco do IPSS

Quando procedemos à análise do risco relativo associado aos diferentes genótipos do gene da MTHFR verificámos que os indivíduos com o polimorfismo CT apresentam um risco 3,982 vezes superior de desenvolver SMD ($p = 0,0032$) (Tabela 17).

TABELA 17

	SMD n	Controlos n	Odd's ratio IC (95%)	P
MTHFR C677T	26	289	3,982 (1,546-10,26)	0,0032

Análise do risco relativo de desenvolver SMD associado aos genótipos da MTHFR C677T do gene da MTHFR segundo o teste de Fisher

Apesar das alterações encontradas entre a metilação dos genes *p15* e *p16* e o *status* do folato e B12, e destes parâmetros com os 2 polimorfismos estudados da enzima MTHFR, nenhum destes resultados apresenta valores com significância estatística quando analisados por regressão logística multivariada, utilizando o programa SPSS.

4.3. Caracterização dos doentes com Síndrome Mielodisplásica que evoluíram para Leucemia Mieloblástica Aguda

Quando analisámos a evolução dos 26 doentes SMD incluídos no estudo, num período de *follow-up* de 28 meses, verificámos que 7 doentes (aproximadamente 27%) evoluíram para LMA. Destes doentes, quatro pertenciam ao subtipo AREB-2 com IPSS intermédio-2, dois eram do subtipo AREB-1 com IPSS intermédio-1, e um era do subtipo LMMC com IPSS intermédio-2 (Tabela 18). Nenhum doente com AR e CRDM evoluiu para LMA durante este período.

TABELA 18

Características laboratoriais dos sete doentes com SMD que evoluíram para LMA

WHO	IPSS	Metilação	Folato (grupo)	B12 (grupo)	MTHFR C 677T	MTHFR A1298C
AREB-2	Int-2	0	B	B	TT	AA
AREB-2	Int-2	0	E	A	CT	AC
AREB-2	Int-2	0	A	B	CT	AC
AREB-2	Int-2	0	B	B	CC	AC
AREB-1	Int-1	<i>p16+</i>	B	A	CT	AC
AREB-1	Int-1	0	B	A	CT	AC
LMMC	Int-2	<i>p15+</i>	B	B	CT	AC

Além disso, dos doentes que evoluíram para LMA, 71,4% apresentavam os genes *p15* e *p16* desmetilados. Apenas dois doentes, um com AREB-1 e outro com LMMC tinham metilação dos genes *p16* e *p15*, respectivamente. Por outro lado, a maioria dos doentes apresentava valores de folato e B12 abaixo da média, e os polimorfismos da MTHFR C677T e A1298C em heterozigotia, CT e AC, respectivamente.

4.4. Estudos realizados numa linha celular de Mielodisplasia humana

De modo a determinar o efeito dos moduladores epigenéticos na SMD utilizou-se a linha celular humana F36P, obtida de um doente com SMD, subtipo AREB-t e os fármacos TSA e DAC, respectivamente um inibidor das deacetilases das histonas e um hipometilante.

4.4.1. Caracterização da linha celular de Mielodisplasia humana

As células F36P expressam o antígeno comum leucocitário, CD45, e vários marcadores de células imaturas e de linhagem mielóide, respectivamente, os antígenos de superfície CD34, CD33 e CD13. No entanto, não expressam antígenos de superfície típicos de células B ou T, nem de monócitos maduros. Apresentam alguns marcadores de glicoproteínas eritróides e plaquetárias. Estas características fenotípicas levaram alguns autores a sugerir que as células F36P apresentam um fenótipo multilinhagem característico das células estaminais hematopoiéticas multipotentes (Chiba P., 1991).

As células F36P crescem em suspensão, quando mantidas em cultura num meio nutritivo apropriado (RPMI 1640), à temperatura de 37°C, em atmosfera humedecida, com 5% de CO₂, de acordo com o perfil observado e representado na figura 51. Como se pode observar nesta figura, a fase exponencial de crescimento decorre ao longo de 72h após o qual estas células entram em fase estacionária. A densidade celular observada nas células F36P durante a fase exponencial duplica a cada 36h até um máximo aproximado de 3-4 milhões de células por mL.

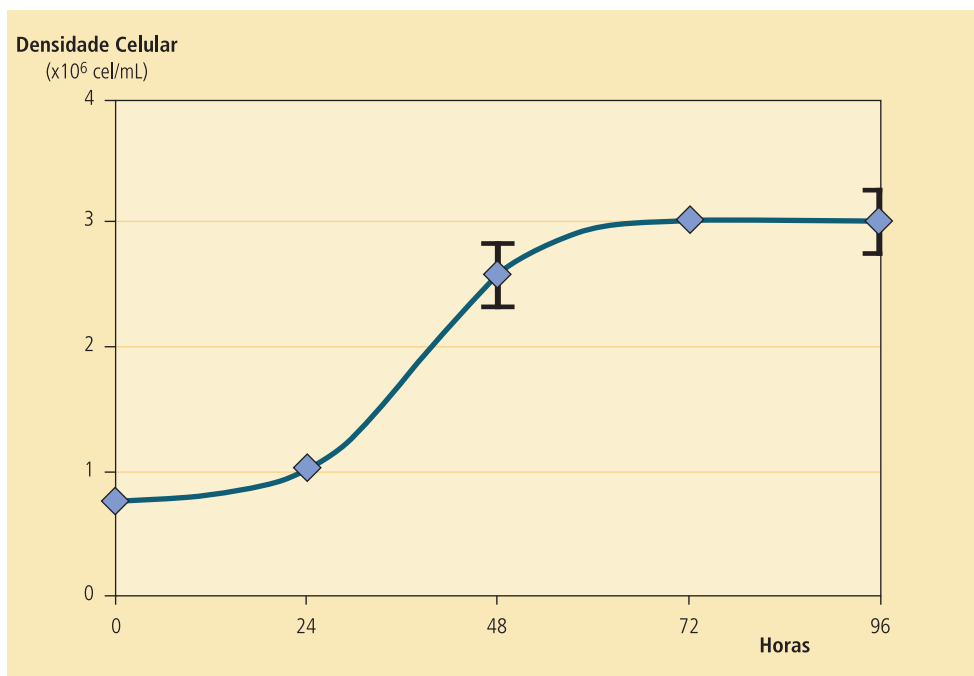


FIGURA 51

Curva de crescimento das células F36P.

As células foram incubadas em meio RPMI 1640 enriquecido com 10 ngr/mL de interleucina 3 recombinante e soro fetal bovino a 10% numa densidade inicial de $0,75 \times 10^6$ células/mL durante 96h. Após cada 24h de incubação recolheu-se amostras da suspensão celular e as células foram coradas com azul de tripano e contadas num hemocitómetro. A densidade celular foi calculada pelo número de células vivas por mL.

Os resultados representam a média \pm desvio padrão de 3 a 6 ensaios independentes.

As células F36P apresentam características morfológicas de SMD, como se pode observar na figura 52. Para além da displasia observada, estas células apresentam elevada relação núcleo/citoplasma, protuberâncias citoplasmáticas e nucléolos bem visíveis, característicos de células imaturas (blastos). Além disso, observaram-se outros sinais de imaturidade como a presença de células bi e trinucleadas, citoplasma basófilo e núcleo excêntrico. Por outro lado, quando as células F36P são mantidas em cultura, nas condições óptimas de crescimento, observa-se com elevada frequência células em mitose, e células com características de megacariócitos maduros e megacarioblastos.

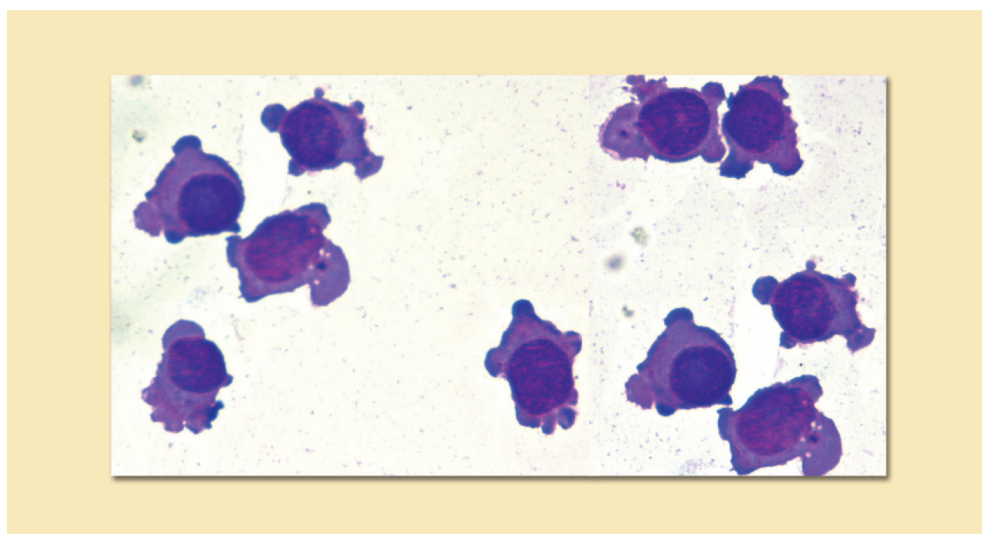


FIGURA 52

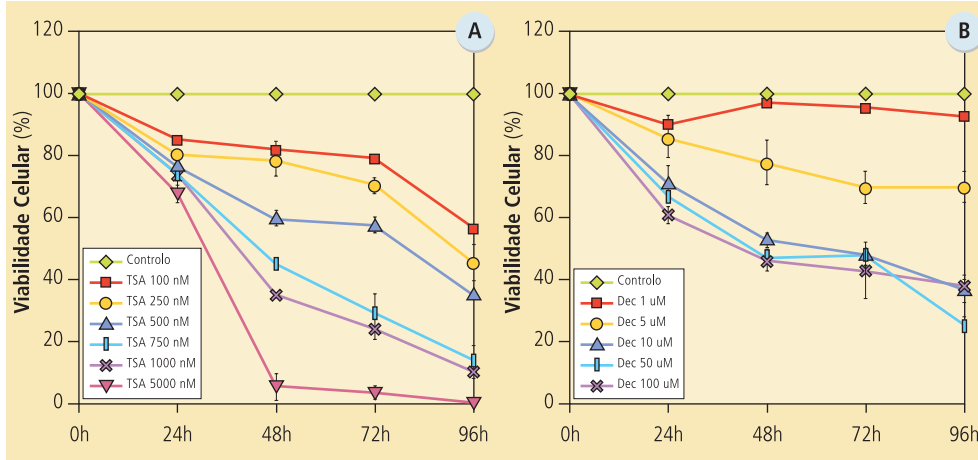
Aspectos morfológicos das células F36P.

Os esfregaços de células foram corados com solução de May-Grünwald-Giemsa e observados ao microscópio óptico. (Ampliação de x500).

4.4.2. Efeito dos fármacos decitabina e tricostatina A na proliferação e morte das células F36P da linha celular de Mielodisplasia humana

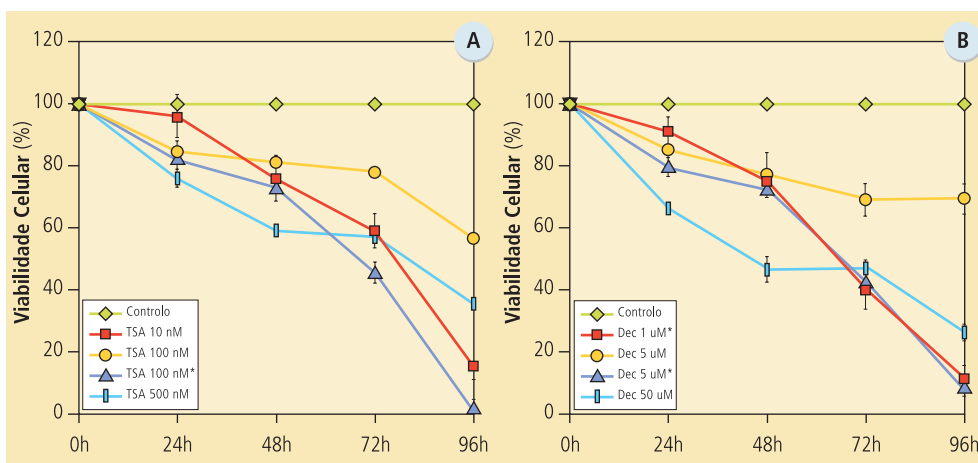
4.4.2.1. Curvas de proliferação celular

Na figura 53 estão representados os efeitos citotóxicos da TSA e da DAC nas células F36P. Como se pode observar, os efeitos citotóxicos destes compostos dependem da concentração e do tempo de exposição, sendo o seu efeito mais acentuado a partir das 48h de incubação. A redução da proliferação celular para valores próximos dos 50%, o IC_{50} , foi atingida nas células tratadas com TSA a 750 nM e DAC a 500 μ M.



De modo a avaliar se o efeito citotóxico é dependente do modo de administração dos moduladores epigenéticos, adicionou-se diariamente (a cada 24h) à cultura celular TSA e DAC, em concentrações inferiores às utilizadas em administração única, como representado na figura 54.

Assim, como se pode verificar na figura 54, a administração diária de baixas concentrações de TSA e DAC às células F36P, induz redução da proliferação celular superior à observada nas mesmas células tratadas com concentrações mais elevadas em toma única. De facto, quando se adicionou diariamente TSA a 100 nM ou DAC a 5 μ M a proliferação celular reduziu-se para valores próximos de zero, enquanto que mesmo com doses de 500nM e de 50 μ M, respectivamente com TSA e DAC, tal não foi atingido.



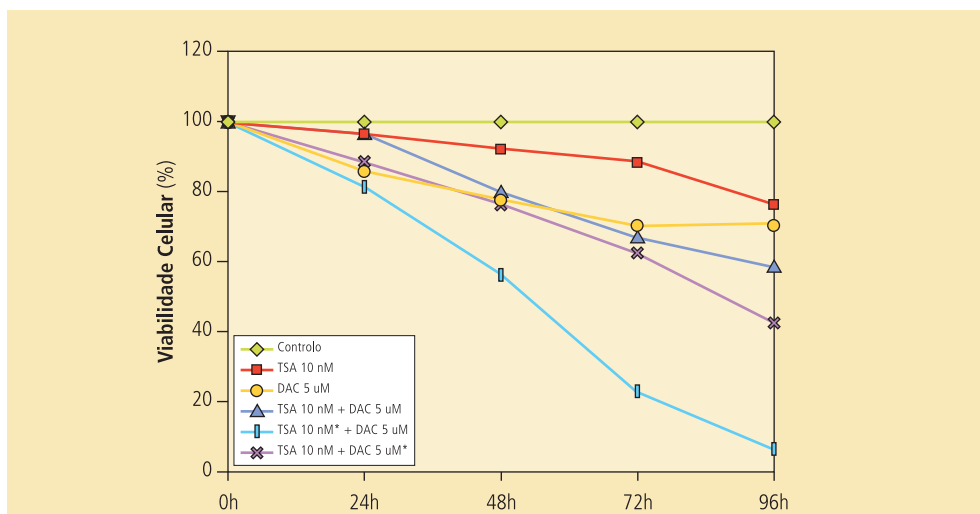
Por outro lado, foi também avaliado o possível efeito sinérgico da combinação terapêutica dos moduladores epigenéticos. Assim, as células F36P foram tratadas com os dois compostos em administração simultânea e com desfaseamento temporal de 3 horas entre a administração dos dois fármacos, em concentrações inferiores às utilizadas em monoterapia, como representado na figura 55.

FIGURA 55

Efeito da combinação terapêutica dos moduladores epigenéticos na proliferação celular das células F36P.

As células foram incubadas numa densidade inicial de $0,75 \times 10^6$ células/mL, durante 96h com as concentrações e os compostos indicados na legenda. Após incubação pelos períodos de tempo indicados avaliou-se a proliferação celular por teste de resazurina, de acordo com o descrito na secção materiais e métodos. Os resultados representam a média \pm desvio padrão de 5 ensaios independentes.

* corresponde a pré-incubação durante 3h.



Como podemos observar, na figura 54, quando as células de SMD foram tratadas com TSA a 10 nM e DAC a 5 uM em monoterapia, não se observou efeito citotóxico significativo. De facto, a viabilidade celular, após 96h de incubação, diminuiu para valores próximos dos 76% e 70%, respectivamente. No entanto, quando as células foram incubadas com os moduladores em associação observou-se potenciação do efeito citotóxico para concentrações inferiores ao IC_{50} relativamente à terapêutica em monoterapia. No entanto, este efeito foi mais acentuado quando as células F36P foram previamente incubadas com o inibidor das deacetilases das histonas, a TSA, e seguidamente com o hipometilante, a DAC (Figura 55).

4.4.2.2. Avaliação da morte celular induzida pela decitabina e tricostatina A por citometria de fluxo

A avaliação do tipo de morte celular induzida pelos moduladores epigenéticos nas células de SMD em cultura foi avaliada por citometria de fluxo com recurso

à dupla marcação com anexina V e iodeto de propídeo. Com esta técnica é possível distinguir as células viáveis das células mortas através da alteração na permeabilidade e composição membranar, possibilitando ainda a discriminação do tipo de morte celular induzida, ou seja, se esta é predominantemente por apoptose ou por necrose.

Na figura 56 estão representados diagramas de pontos representativos da viabilidade celular e do tipo de morte induzida pela TSA e pela DAC nas células de mielodisplasia humana em cultura, analisados por citometria de fluxo.

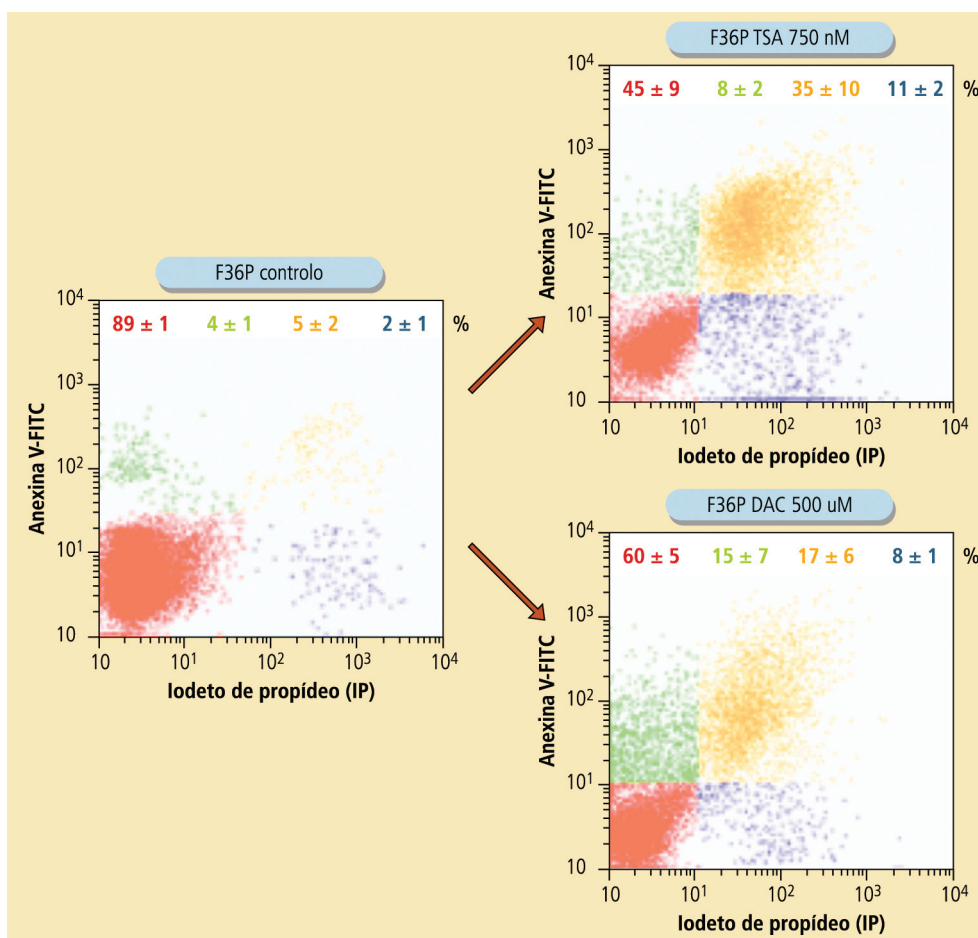


FIGURA 56

Dot-plots representativos da morte celular induzida pelos moduladores epigenéticos nas células F36P por citometria de fluxo.

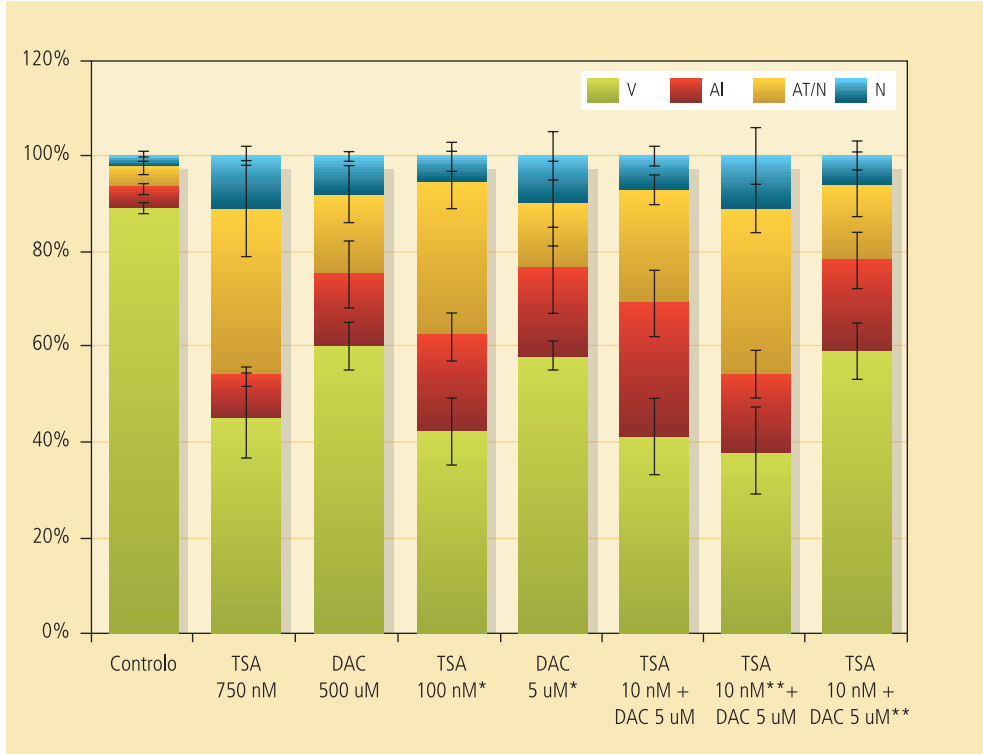
As células foram incubadas numa densidade inicial de $0,75 \times 10^6$ células/mL com os compostos em estudo nas concentrações indicadas na legenda, durante 48h, e posteriormente marcadas com anexina V-FITC e iodeto de propídeo (IP), de acordo com o descrito na secção materiais e métodos. A vermelho está representada a percentagem de células viáveis (AV-/IP-), a verde as células em apoptose inicial (AV+/IP-), a amarelo as células em apoptose tardia/necrose (AV+/IP+) e a azul as células em necrose (AV-/IP+).

Como se pode observar, os compostos testados induzem, predominantemente, morte celular por apoptose tardia e/ou necrose. A redução da viabilidade celular é dependente do modulador utilizado, assim como, do esquema terapêutico (Figura 57). Estes resultados estão de acordo com os obtidos nos testes de proliferação com rezasurina.

FIGURA 57

Avaliação do tipo de morte celular induzida pela TSA e DAC nas células F36P por citometria de fluxo.

As células F36P foram incubadas numa densidade inicial de $0,75 \times 10^6$ células/mL, durante 48h com TSA e DAC nas concentrações indicadas na legenda. Posteriormente as células foram marcadas com anexina V-FITC e iodeto de propídeo (IP), de acordo com o descrito na secção materiais e métodos.
 *, administração diária.
 **, pré-incubação durante 3h.
 V, células viáveis; A, células em apoptose inicial; A/N, células em apoptose tardia/necrose; N, células em necrose.
 Os resultados são expressos em % e representam a média \pm desvio padrão de 2 ensaios independentes. TSA, Tricostatina A; DAC, decitabina.





5.

Discussão

5.1. Análise do perfil de metilação e do metabolismo do folato/B12 na Síndrome Mielodisplásica

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 letais (Uchida T., 1997).

Os defeitos de maturação hematopoiética são a “marca” desta doença, e afectam maioritariamente a eritropoiese (Hopfer O., 2008). 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 Y., 2009).

Os padrões de metilação aberrante são um evento comum nas neoplasias e constituem um importante factor 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 S., 2008)

De facto, os genes supressores tumorais $p15^{INK4B}$ e $p16^{INK4A}$, encontram-se frequentemente hipermetilados nas neoplasias hematopoiéticas (Teofili L. *et al.*, 2001; Uchida T. *et al.*, 1997). A presença de metilação em genes específicos tem sido demonstrada em leucemias agudas, mielóides, linfóides e bifenotípicas. 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*. Enquanto, o valor prognóstico da metilação *p15/p16* nas diferentes formas de leucemia aguda é incerto, a frequente metilação do gene *p15* foi proposta como marcador molecular para monitorização clínica (Grövdal M. *et al.*, 2007).

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 atractivo (Brakensiek K., 2005). Estudos clínicos promissores utilizando agentes hipometilantes e inibidores das deacetilases 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 L. R., 2002; Wijermans P., 2000).

Como referido, 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 (Toyota M., 2005; Lehmann U., 2004; Esteller M., 2003; Singal R., 1999).

A progressão do ciclo celular é regulada pelas ciclinas e cinases dependentes de ciclinas. Por outro lado, a actividade destes complexos é regulada por proteínas, codificadas por genes supressores tumorais, nomeadamente pelas proteínas inibidoras das cinases dependentes de ciclinas (CDKI). O aumento de expressão destas proteínas é reconhecido como um mecanismo de bloqueio do ciclo celular. Consequentemente, a inativação destes genes por mecanismos epigenéticos, como a hipermetilação da região promotora, pode ser um alvo terapêutico importante no cancro (Brakensiek K., 2005).

Os padrões de metilação do ADN, frequentemente alterados nas neoplasias humanas, incluem a hipometilação global do genoma e a hipermetilação regional das ilhas CpG (Jones P., 1999). Por outro lado, a interacção do epigenoma com o ambiente, incluindo a nutrição, pode alterar o perfil de metilação e, desta forma, o padrão de expressão dos genes (Bull C., 2008; Ulrey C., 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. Como já foi referido, 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 reactivação 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. Nas células tumorais, as ilhas CpG localizadas na região promotora de determinados genes supressores tumorais sofrem hipermetilação, o que em alguns casos leva ao silenciamento de genes. 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. 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 H., 2005).

Por outro lado, vários estudos têm mostrado que os polimorfismos de enzimas envolvendo o ciclo do folato e os genes envolvidos na metilação do ADN estão associados à neoplasia do cólon (Mokarram P., 2008). Além disso, o *pool* de folato pode estar associado à hipermetilação do ADN em tumores colórectais (Kawakami K., 2003). Outros estudos, associam as alterações do folato e da vitamina B12 a neoplasias do pâncreas (Eva S., 2007) e da próstata (Johansson M., 2008).

O papel do código genético na determinação da estabilidade genómica está bem estabelecido e, conseqüentes alterações do estado de saúde, como os defeitos de desenvolvimento e doenças degenerativas como o cancro.

Para além deste facto, é evidente que o metabolismo e reparação do ADN são dependentes de uma variedade de factores dietéticos que actuam como cofactores ou substratos nas vias metabólicas fundamentais (Bull C., 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.

Neste contexto, no nosso estudo avaliámos o perfil de metilação dos genes *p15* e *p16* em doentes com vários subtipos de SMD e em controlos não neoplásicos, e a sua relação com o *status* do folato e vitamina B12, e com os polimorfismos da MTHFR. Todos os parâmetros foram depois correlacionados com a clínica, incluindo a evolução para LMA, sobrevivência e grupos de risco prognóstico.

Para o efeito, estudámos uma população de 26 doentes com o diagnóstico de SMD, classificados segundo a OMS e o IPSS, com distribuição etária e por sexos sobreponível ao que se encontra descrito na literatura para esta patologia. Na nossa amostra de doentes existe um predomínio dos subtipos menos agressivos, nomeadamente AR e CRDM, o que se reflecte depois em valores de IPSS de risco baixo e intermédio-1. Os oito controlos apresentam um predomínio do sexo masculino e uma média de idades 10 anos inferior à dos doentes com SMD.

Apesar das células constituintes da medula óssea serem heterogéneas, podem ser identificadas através de múltiplas alterações na expressão de antigénios membranares, e/ou intercelulares, que resultam normalmente de alterações genéticas/epigenéticas correspondentes (Loken M. R., 2008). Como mencionado, a SMD é considerada uma doença clonal das células estaminais hematopoiéticas (Liesveld J.L., 2004). Contudo, enquanto estas células podem ser relativamente bem caracterizadas na LMA com base no fenótipo e na expressão de mediadores de vias de transdução de sinal, existe muito pouca informação consensual em termos de imunofenotipagem das células na SMD (Liesveld J.L., 2004). No entanto, as populações maioritárias na medula óssea destes doentes são CD34+.

A hipermetilação das ilhas CpG pode ser detectada quer nas células CD34+ quer no total de células mononucleares da medula, as quais possuem padrões de metilação semelhantes (Aggerholm A., 2006). Estas observações sugerem que a hipermetilação da região promotora envolve as células hematopoiéticas imaturas e em estádios mais avançados (Aoki E., 2000). Por este motivo, não fizemos separação das células CD34+ para o estudo do perfil de metilação dos genes *p15* e *p16*.

A avaliação do perfil de metilação dos genes *p15* e *p16* demonstrou que 50% dos doentes apresenta metilação de pelo menos um gene ao diagnóstico. Vários estudos mostram que 50% dos doentes SMD apresentam metilação do gene *p15* (Lubbert M., 2003; Uchida T., 1997), enquanto para a metilação do *p16* ainda não há dados sólidos.

Um dos eventos epigenéticos mais estudados em SMD é o silenciamento do inibidor da cinase dependente ciclina *p15^{INK4B}*, que controla a progressão do ciclo celular da fase G1 para a fase S. A hipermetilação da região promotora do gene *p15* ocorre mais frequentemente nas SMD de alto risco, e tem sido reportada como adquirida durante a progressão da doença (Quesnel B., 1998; Uchida T., 1997), estando associada a transformação leucêmica (Tien H. F., 2001) e, por conseguinte, a mau prognóstico.

No nosso estudo, a metilação do gene *p15* foi encontrada apenas em 38% dos doentes SMD, ou seja numa percentagem um pouco inferior à descrita na literatura (Lubbert M., 2003; Uchida T., 1997). Tal discrepância pode ser justificado por um predomínio na nossa amostra de doentes SMD dos subtipos de baixo risco, como já foi referido. Por outro lado, sabemos que a metilação deste gene está associada à progressão da doença, pelo que seria de esperar que este se encontrasse metilado nos subtipos AREB ou no decurso da evolução da doença, durante o *follow-up*. No entanto, nestes doentes, o estudo da metilação foi efectuado somente ao diagnóstico, não se tendo efectuado a reavaliação na altura da agudização. Curiosamente, verificámos que somente um dos doentes com AREB 1 e 2 apresenta metilação de um dos genes avaliados ao diagnóstico e, foram precisamente estes doentes com o subtipo AREB (4 em 5 AREB-2 e 2 em 3 AREB-1) que evoluíram para LMA, juntamente com um doente com LMMC e metilação do *p15*. Portanto, nos 10 doentes em que identificámos metilação do gene *p15* estão incluídos os subtipos AR, CRDM, LMMC e Síndrome 5q-. Destes, só o doente com LMMC e *p15* metilado apresenta um IPSS intermédio-2. Os restantes nove doentes têm IPSS baixo ou intermédio-1.

Relativamente ao gene *p16* os resultados são sobreponíveis, ou seja 35% dos doentes têm o *p16* metilado, os quais correspondem aos subtipos menos agressivos e, portanto com IPSS baixo. Apenas um destes doentes com IPSS baixo (AREB-1 e *p16+*) evoluiu para LMA.

De salientar que em 19% dos doentes com SMD estudados se verificou metilação dos 2 genes. Estes doentes têm diagnóstico de AR (3 doentes) e CRDM (1 doente). De igual modo, o único doente com Síndrome 5q- estudado apresenta metilação dos 2 genes, sem no entanto ter ocorrido progressão de

doença até à data, dado este também inconsistente com a literatura (Jiang Y., 2009). No entanto, não podemos tirar ilações uma vez que se trata de um único doente. Apesar disso, não deixa de ser curioso e pouco esperado neste subtipo de SMD, sugerindo outros mecanismos envolvidos.

Por outro lado, o grupo de doentes que não apresenta metilação de nenhum dos genes estudados tem diagnóstico de AREB-2 (n=5), embora em 4 dos 9 doentes com o subtipo CRDM também se tenha verificado desmetilação dos referidos genes. Como já foi referido, embora se trate de um número pequeno de doentes, não era esperado que todos os doentes com este subtipo tivessem este perfil de metilação, sobretudo porque 4 dos 5 doentes evoluíram para LMA. Salienta-se, no entanto, que não sabemos o perfil de metilação destes genes à data da progressão da doença nos doentes estudados, uma vez que o estudo foi efectuado somente ao diagnóstico. Por outro lado, as alterações da metilação poderão ocorrer noutros genes (Greco M., 2010; Follo M. Y., 2009; Lin J., 2008; Wu S. J., 2006) e/ou outros mecanismos poderão estar envolvidos.

De facto, a patogénese da SMD e a sua frequente progressão para LMA envolvem um processo multifactorial onde a ocorrência de várias alterações genéticas e epigenéticas nas células progenitoras hematopoiéticas representa um papel fundamental. Podem estar envolvidas múltiplas vias genéticas na formação do clone SMD e, por vezes, estão mesmo presentes clones distintos (Mufti G. J., 2004).

Verificámos também que os doentes com os subtipos AR, CRDM e Síndrome 5q- apresentam, como seria de esperar, IPSS de baixo risco. Por outro lado, nenhum destes grupos de doentes evoluiu para LMA, o que está de acordo com o IPSS de baixo risco que lhes foi atribuído. Curiosamente foi nestes grupos de doentes que encontramos uma maior percentagem de genes metilados.

Como referido, o folato apresenta um papel importante no risco de desenvolvimento de determinadas neoplasias. Deste modo, sendo as reacções que envolvem o metabolismo do folato essenciais nos processos de metilação, fomos analisar nos doentes SMD e controlos os níveis de folato, de vitamina B12 e os polimorfismos da enzima MTHFR, uma enzima essencial no metabolismo do folato.

A MTHFR catalisa a reacção química de 5,10-metilenotetrahidrofolato em 5-metiltetrahidrofolato, o primeiro dador de grupos metilo para a remetilação de homocisteína em metionina. O 5-metiltetrahidrofolato é a forma predominante do folato no plasma e fornece o grupo metilo para a síntese da metionina e SAM, o dador universal dos grupos metilo. Após a transferência do grupo

metilo, o SAM é convertido em s-adenosilhomocisteína (SAH) que tem grande afinidade para metiltransferases, actuando como um inibidor potente da maioria das metiltransferases SAM-dependentes (Jang H., 2005).

Os nossos resultados mostram que, no grupo de doentes, o valor médio de folato é sobreponível ao valor médio no grupo dos indivíduos controlo. No entanto, se analisarmos os resultados tendo em conta a gama de concentrações de folato obtida, podemos distribuir os doentes em 3 grupos, os que têm baixa (B), alta (A) e elevada (E) concentração, de acordo com o definido na secção de materiais e métodos. Fazendo esta análise verificamos que a maioria dos doentes (62%) se encontram no grupo B, ou seja, apresenta valores de folato abaixo da média. Nove destes doentes apresentam metilação de pelo menos um gene, com predomínio da metilação do *p16*. Dos cinco doentes com valores de folato na gama de concentrações do grupo A, 3 não apresentam nenhum gene metilado (doentes com CRDM). Estes resultados sugerem que o folato em baixa concentração pode estar relacionado com a metilação de genes, sobretudo do gene *p16*. No entanto, estes resultados não têm significado estatístico, provavelmente devido à pequena amostra do estudo.

Relativamente à vitamina B12, os doentes SMD apresentam em média valores de vitamina B12 inferiores aos indivíduos controlo, uma vez que a maior parte dos doentes (65%) apresenta níveis séricos de B12 inferiores à média, ou seja, estão no grupo B (210-555 pg/mL). Estes doentes são sobretudo do subtipo CRDM, os quais, apresentam metilação de pelo menos um gene, predominantemente do gene *p15*, sugerindo que a diminuição da concentração sérica de vitamina B12 poderá estar relacionada com a metilação de genes. Por outro lado, os doentes AREB-1 apresentam valores de B12 intermédios (grupo A).

Existem poucos estudos que relacionem os doseamentos da vitamina B12 com a metilação em doentes SMD. No entanto, existem alguns estudos em neoplasias sólidas, embora contraditórios. Assim, um estudo efectuado por Eva Schernhammer (2007) em doentes com cancro do pâncreas mostrou existir uma relação inversa entre os doseamentos séricos de folato, vitamina B12 e homocisteína e o risco de cancro. Pelo contrário, Mattias Johansson (2008) num estudo efectuado em doentes com cancro da próstata em estádios avançados, refere que as concentrações de B12 elevadas se relacionam com o aumento de risco.

Os nossos resultados sugerem que os níveis de vitamina B12 e folato poderão influenciar a metilação dos genes, e deste modo, regular a sua expressão, o que poderá constituir um factor importante na etiopatogenia da SMD.

No entanto, apesar de se evidenciar uma tendência para a associação entre a metilação dos genes estudados e a baixa concentração de folato e vitamina B12, não sabemos em que medida se estabelece esta associação ou se constitui um factor predisponente ou de risco para a patologia SMD. Embora o doseamento sérico tenha sido efectuado à altura do diagnóstico, trata-se de um doseamento único e pode não traduzir os valores no início da doença. Para esse efeito teríamos que ter vários doseamentos antes e após o diagnóstico de SMD. Além disso, necessitamos de aumentar o tamanho da nossa amostra para obtermos resultados mais conclusivos.

Um dos factores que pode influenciar os níveis de folato e vitamina B12 é a enzima MTHFR. Esta enzima apresenta 2 polimorfismos, C677T e A1298C, que quando presentes estão associados a uma diminuição da actividade da enzima.

Assim, a caracterização genotípica das variantes polimórficas da enzima MTHFR poderá esclarecer algumas das questões anteriormente colocadas.

Vários polimorfismos em genes que codificam enzimas do metabolismo do folato têm sido associados a susceptibilidade a neoplasias hematológicas. Assim, um estudo efectuado por Hee Nam Kim e colaboradores (2008) 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 (Kim H. N., 2008). O nosso estudo não demonstrou existir uma associação significativa entre a SMD, o perfil de metilação dos genes *p15* e *p16* e o risco de evolução para LMA. No entanto, o genótipo CT do polimorfismo C677T da MTHFR foi considerado um factor de risco para SMD.

Por outro lado, um estudo efectuado por Christine F Skibola (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.

Como referido, o nosso estudo permitiu constatar que a maioria dos doentes (77%), sobretudo do subtipo CRDM, é portadora do genótipo CT do polimorfismo C677T, o qual constitui um factor de risco para SMD (OD ratio 3,982). Além disso, é de salientar que onze dos vinte doentes com a variante polimórfica CT apresentam metilação de pelo menos um gene.

Quando avaliamos o polimorfismo A1298C da MTHFR verificámos que a maioria dos doentes de todos os subtipos OMS, com excepção do subtipo AR,

apresenta o genótipo AC. No entanto, não encontramos nenhuma relação estatisticamente significativa entre a presença deste polimorfismo e a SMD, o padrão de metilação ou os níveis de folato e de vitamina B12.

Além disso, durante o *follow-up* verificámos que aproximadamente 26,9% dos doentes SMD estudados evoluiu para LMA maioritariamente do subtipo AREB (80% dos doentes AREB-2 e 66,7% dos doentes com AREB-1). Apenas um terço dos doentes com LMMC evoluiu para leucemia aguda. Por outro lado, só em 29% dos doentes com LMA secundária se identificou metilação de genes, em particular do gene *p16* na AREB-1 e do gene *p15* na LMMC. De salientar que a maioria destes doentes apresenta doseamentos séricos de folato/B12 abaixo da média e um predomínio claro dos genótipos da MTHFR em heterozigotia: CT para o 677 e AC para o 1298.

Estes resultados sugerem uma associação entre valores baixos de folato/B12 e SMD, e entre o polimorfismo 677CT e SMD.

5.2. Análise do potencial terapêutico da decitabina e tricostatina A na Síndrome Mielodisplásica

O principal objectivo da maioria das estratégias terapêuticas na doença neoplásica é o aumento da sobrevivência. Habitualmente utilizamos fármacos dirigidos a alterações que sabemos estarem presentes na SMD, como a desregulação apoptótica, o silenciamento de genes necessário à diferenciação da célula hematopoiética, ou excesso de sinalização angiogénica. No entanto, nenhuma modalidade terapêutica é aceite como *standard* para a SMD, uma vez que poucas estratégias provaram alterar a história natural da doença. Na SMD, a única opção terapêutica associada a um aumento apreciável da sobrevivência livre de doença é o transplante alogénico, que sendo altamente tóxico só está disponível para uma minoria destes doentes, devido à idade e *performance status*.

O reconhecimento de que o fenótipo maligno, que caracteriza a SMD, pode derivar de diversos processos biológicos, permitiu o crescimento de novas estratégias terapêuticas adequadas à fisiopatologia da doença. A terapêutica dirigida a alvos pode alterar a história natural da doença.

O paradigma que envolve a definição de alvos moleculares através da análise bioquímica das células de SMD primária ou secundária, e o desenvolvimento de inibidores/moduladores contra esses alvos seguido da monitorização dos efeitos bioquímicos, levou à criação de novas estratégias terapêuticas na SMD. A inibição das DNMT e HDAC são exemplos importantes destas novas formas de tratamento de neoplasias.

Os primeiros relatos sobre alterações da metilação do ADN no cancro descreviam uma perda global da metilação, que poderia levar à tumorigénese através da activação de oncogenes ou induzindo a instabilidade cromossómica. Neste contexto, a hipometilação foi vista como um evento promotor do cancro e não como terapêutica para o cancro. A ideia de inibir a metilação do ADN por fármacos surgiu de estudos subsequentes, mostrando que, paralelamente à hipometilação global do genoma, existiam genes com ganho de hipermetilação das regiões promotoras durante a tumorigénese, processo este associado ao silenciamento epigenético da expressão génica com perda da função da proteína. Estes factos levaram a um novo interesse em fármacos com capacidade de inibir as ADN metiltransferases, os hipometilantes.

Para além das modificações da metilação do ADN, as modificações bioquímicas das histonas (código das histonas) também fazem parte das alterações epigenéticas relacionadas com o cancro. Enquanto, a metilação do ADN está relacionada com o silenciamento de genes, as alterações das histonas são mais dinâmicas e podem estar associadas a uma configuração da cromatina mais aberta ou fechada. Deste modo, o silenciamento aberrante de genes no cancro pode ocorrer por metilação do ADN ou por desacetilação das histonas. Assim, a combinação de agentes hipometilantes com HDACi promove, frequentemente, efeitos sinérgicos associados com a reactivação de genes aberrantemente silenciados. Esta associação tem mostrado actividade clínica significativa em doentes com SMD e LMA. (Grant S., 2007)

Neste sentido, avaliou-se o potencial terapêutico *in vitro* de moduladores epigenéticos, um hipometilante, a decitabina (DAC), e um HDACi, a tricostatina A (TSA), numa linha celular humana obtida de um doente com SMD, subtipo AREB-t, as células F36P.

Nesta linha celular encontrámos características morfológicas típicas de células de SMD, nomeadamente displasia, blastos multinucleados com nucléolos bem visíveis e elevado número de células em proliferação (mitose), com elevado número de células com elevada expressão de antigénio membranar CD34.

As diferenças de intensidade de fluorescência observadas para os antigénios membranares CD34 e CD45, permitem a discriminação de diferentes subtipos de células com base nos níveis de expressão destes marcadores, indicando que as células F36P são, possivelmente, células estaminais hematopoiéticas multipotentes que entram em diferenciação durante o processo de cultura celular.

Os resultados obtidos neste trabalho mostram que a TSA e DAC induzem diminuição da proliferação das células F36P de modo dependente da concentração e do tempo de exposição, sendo o seu efeito mais acentuado a partir das 48h de incubação. Para além do efeito anti-proliferativo observado, este é acompanhado de um efeito citotóxico mediado preferencialmente por apoptose.

Neste trabalho foi também avaliado se o modo de administração e/ou a associação dos fármacos influencia o seu efeito citostático e citotóxico.

Assim, quando as células F36P foram tratadas com baixas concentrações TSA e DAC em administração diária, a redução da proliferação celular foi superior à observada nas mesmas células tratadas com concentrações mais elevadas em administração única. Estes resultados sugerem que o esquema de administração dos fármacos é importante na obtenção da eficácia terapêutica. Por outro lado, ao permitir a redução da dose poderá contribuir para a diminuição dos efeitos adversos.

Quando as células foram primeiro incubadas com os dois compostos em administração simultânea e posteriormente com um desfasamento temporal de 3 horas, em concentrações inferiores às utilizadas em monoterapia (inferiores ao IC_{50}), em associação simultânea, observou-se potenciação do efeito citotóxico. No entanto, este efeito foi mais acentuado quando as células F36P foram pré-incubadas com o inibidor das deacetilases das histonas, a TSA, e seguidamente com o hipometilante, a DAC. Estes resultados estão de acordo com os observados noutros estudos em células de LLA (Sarmiento-Ribeiro A. B., 2008; Costa C., 2009).

Posteriormente, analisámos o tipo de morte celular por citometria de fluxo com recurso à dupla marcação com anexina V e iodeto de propídeo. Com esta técnica é possível distinguir as células viáveis das células mortas através da alteração na permeabilidade e composição membranares, possibilitando ainda a discriminação do tipo de morte celular induzida por um composto, se esta é predominantemente por apoptose ou por necrose. Como mencionado, os compostos testados induzem, predominantemente, morte celular por

apoptose tardia e/ou necrose. No entanto, a redução da proliferação celular é dependente do modulador utilizado, assim como, do esquema terapêutico. Estes resultados estão de acordo com os obtidos nos testes de proliferação com rezasurina.

Em conclusão, este estudo sugere que a TSA e/ou DAC 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.



6. Conclusão

Seguidamente, apresentam-se as principais conclusões que foram obtidas a partir da análise do presente trabalho, envolvendo a epigenética e a nutrição na Síndrome Mielodisplásica e o potencial terapêutico dos moduladores epigenéticos.

- A amostra de doentes SMD incluídos no nosso estudo tem um predomínio de subtipos menos agressivos, nomeadamente AR e CRDM, o que se reflecte em valores de IPSS de risco baixo e intermédio-1.

- Os resultados mostram que 50% dos doentes apresentam pelo menos um gene metilado. A metilação do *p15* está presente em 38% dos doentes, enquanto a do gene *p16* ocorre em 35% dos doentes. No entanto, 4 dos 5 doentes com AR o doente com Síndrome 5q- apresentam metilação da região promotora do *p15*. Por outro lado, a metilação do *p16* ocorre em todos os subtipos com excepção dos doentes com LMMC e AREB-2. Estes resultados sugerem que a metilação pode constituir um mecanismo precoce na etiopatogenia da SMD.

- Embora sem significado estatístico, os doentes com genes metilados têm tendência para níveis baixos de ácido fólico e vitamina B12 (*p16* para o folato e *p15* para a B12), reforçando o papel destas vitaminas na metilação, tal como tem sido observado em tumores sólidos nomeadamente colo-rectais.

- Por outro lado, o genótipo da MTHFR parece influenciar a metilação, uma vez que 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 factor de risco para SMD (OR 3,982).

- Os doentes que evoluíram para LMA foram os esperados em termos clínicos, mas, ao contrário do que está descrito na literatura, não apresentam metilação dos genes estudados.

- Os estudos efectuados em linhas celulares de SMD mostram que os moduladores epigenéticos, hipometilantes e inibidores das deacetilases das histonas (DAC e TSA, respectivamente) induzem diminuição da proliferação e viabilidade das células F36P 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 a TSA e/ou DAC 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.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abrahamson, G. [et al.] (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.
- Aggerholm, A. [et al.] (2006). *Promoter hypermethylation of p15INK4B, HIC1, CDH1, and ER is frequent in myelodysplastic syndrome and predicts poor prognosis in early-stage patients*. Eur J Haematol. 76(1): 23-32.
- Albitar, M. (2001). *Angiogenesis in acute myeloid leukemia and myelodysplastic syndrome*. Acta Haematol. 106(4): 170-6.
- Alexandrakis, M. G. [et al.] (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*. J Mol Histol. 35(8-9): 857-63.
- Alexandrakis, M. G. [et al.] (2005). *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*. Int J Immunopathol Pharmacol. 18(2): 287-95.
- Alexandrakis, M. G. [et al.] (2005). *Relation between bone marrow angiogenesis and serum levels of angiogenin in patients with myelodysplastic syndromes*. Leuk Res. 29(1): 41-6.
- Al-Nasiry, S. [et al.] (2007). *The use of Alamar Blue assay for quantitative analysis of viability, migration and invasion of choriocarcinoma cells*. Hum Reprod. 22(5): 1304-9.
- Andersen, M. H. [et al.] (2005). *Regulators of apoptosis: suitable targets for immune therapy of cancer*. Nat Rev Drug Discov. 4(5): 399-409.
- Aoki, E. [et al.] (2000). *Methylation status of the p15INK4B gene in hematopoietic progenitors and peripheral blood cells in myelodysplastic syndromes*. Leukemia. 14(4): 586-93.
- Asimakopoulos, F.A. [et al.] (1994). *Molecular analysis of chromosome 20q deletions associated with myeloproliferative disorders and myelodysplastic syndromes*. Blood. 84(9): 3086-94.

- Attwood, J. T. [et al.] (2002). *DNA methylation and the regulation of gene transcription*. Cell Mol Life Sci. 59(2): 241-57.
- Aubry, J.P. [et al.] (1999). *Annexin V used for measuring apoptosis in the early events of cellular cytotoxicity*. Cytometry. 37(3): 197-204.
- Aul, C. [et al.] (1992). *Age-related incidence and other epidemiological aspects of myelodysplastic syndromes*. Br J Haematol. 82(2): 358-67.
- Aul, C. [et al.] (1998). *Increasing incidence of myelodysplastic syndromes: real or fictitious?* Leuk Res. 22(1): 93-100.
- Aul, C. [et al.] (1998). *Pathogenesis, etiology and epidemiology of myelodysplastic syndromes*. Haematologica. 83(1): 71-86.
- Aul, C. [et al.] (2001). *Epidemiological features of myelodysplastic syndromes: results from regional cancer surveys and hospital-based statistics*. Int J Hematol. 73(4): 405-10.
- Ayton, P. M. & Cleary, M. L. (2001). *Molecular mechanisms of leukemogenesis mediated by MLL fusion proteins*. Oncogene. 20(40): 5695-707.
- Azevedo, C. (1999). *Biologia Celular e Molecular*. 3.^a Edição, Lidel, Portugal.
- Bacher, U. [et al.] (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.
- Backx, B. [et al.] (1996). *Erythropoiesis in myelodysplastic syndrome: expression of receptors for erythropoietin and kit ligand*. Leukemia. 10(3): 466-72.
- Badawi, M. A. [et al.] (2010). *Red blood cell transfusion independence following the initiation of iron chelation therapy in myelodysplastic syndrome*. Adv Hematol. 2010:164045.
- Badran, A. [et al.] (2003). *Expression of the anti-apoptotic gene survivin in myelodysplastic syndrome*. Int J Oncol. 22(1): 59-64.
- Barrett, J. (2000). *Myelodysplastic syndrome and aplastic anemia-diagnostic and conceptual uncertainties*. Leuk Res. 24(7): 595-6.
- Barrett, J. [et al.] (2000). *Myelodysplastic syndrome and aplastic anemia: distinct entities or diseases linked by a common pathophysiology?* Semin Hematol. 37(1): 15-29.
- Baylin, S. B. [et al.] (2000). *Aberrant methylation of gene promoters in cancer-concepts, misconcepts, and promise*. J Natl Cancer Inst. 92(18): 1460-1.
- Beaupre, D. M. & Kurzrock, R. (1999). *RAS inhibitors in hematologic cancers: biologic considerations and clinical applications*. Invest New Drugs. 17(2): 137-43.
- Beaupre, D. M. & Kurzrock, R. (1999). *RAS and leukemia: from basic mechanisms to gene-directed therapy*. J Clin Oncol. 17(3): 1071-9.
- Bernas, T. [et al.] (2006). *Integrating cytomics and proteomics*. Mol Cell Proteomics. 5(1):2-13.
- Borkhardt, A. [et al.] (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*. Proc Natl Acad Sci U S A. 97(16): 9168-73.

- Bouscary, D. [et al.] (1997). *Fas/Apo-1 (CD95) expression and apoptosis in patients with myelodysplastic syndromes*. *Leukemia*. 11(6):839-45.
- Bowen, D. T. [et al.] (1993). *Two new polymorphisms but no mutations of the KIT gene in patients with myelodysplasia at positions corresponding to human FMS and murine W locus mutational hot spots*. *Leukemia*. 7(11): 1883-5.
- Bowen, D. T. [et al.] (1998). *Poor response rate to a continuous schedule of Amifostine therapy for 'low/intermediate risk' myelodysplastic patients*. *Br J Haematol*. 103(3): 785-7.
- Brakensiek, K. [et al.] (2005). *Hypermethylation of the suppressor of cytokine signaling-1 (SOCS-1) in myelodysplastic syndrome*. *Br J Haematol*. 130(2): 209-17.
- Buijs, A. [et al.] (1995). *Translocation (12;22) (p13;q11) in myeloproliferative disorders results in fusion of the ETS-like TEL gene on 12p13 to the MN1 gene on 22q11*. *Oncogene*. 10(8): 1511-9.
- Bull, C. & Fenech, M. (2008). *Genome-health nutrigenomics and nutrigenetics: nutritional requirements or 'nutriomes' for chromosomal stability and telomere maintenance at the individual level*. *Proc Nutr Soc*. 67(2): 146-56.
- Buonamici, S. [et al.] (2004). *EVI1 induces myelodysplastic syndrome in mice*. *J Clin Invest*. 114(5): 713-9.
- Caligiuri, M. A. [et al.] (1996). *Partial tandem duplication of ALL1 as a recurrent molecular defect in acute myeloid leukemia with trisomy 11*. *Cancer Res*. 56(6): 1418-25.
- Cameron, E. E. [et al.] (1999). *Synergy of demethylation and histone deacetylase inhibition in the re-expression of genes silenced in cancer*. *Nat Genet*. 21(1): 103-7.
- Campioniet, D. [et al.] (2005). *Evidence for a Role of TNF-Related Apoptosis-Inducing Ligand (TRAIL) in the Anemia of Myelodysplastic Syndromes*. *Am J Pathol*. 166: 557-56.
- Catenacci, D. V. (2005). *Myelodysplastic Syndromes: A comprehensive review*. *Blood Rev* 19; 301-19.
- Chen, H. (1996). *The role of NADPH oxidase in brain ischemia*. Society for Experimental Stroke.
- Chiba, P. [et al.] (1991). *Determination of pyrimidine deoxynucleoside triphosphates in leukaemia cell extracts containing 1-beta-D-arabinofuranosylcytosine triphosphate*. *Eur J Clin Chem Clin Biochem*. 29(6): 385-9.
- Chim, C. S. [et al.] (2007). *Frequent epigenetic inactivation of Rb1 in addition to p15 and p16 in mantle cell and follicular lymphoma*. *Hum Pathol*. 38(12): 1849-57.
- Chinnaiyan, A. M. [et al.] (1995). *FADD, a novel death domain-containing protein, interacts with the death domain of Fas and initiates apoptosis*. *Cell*. 81(4): 505-12.
- Cooper, G. M. & Hausman, R. E. (2006). *The Cell: A Molecular Approach* 4th ed. Amer. Soc. Microbiol., Washington and Sinauer Assoc., Sunderland, MA.
- Dae Young [et al.] (2001). *Expression of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand, Apo2L, and its receptors in myelodysplastic syndrome: effects on in vitro hemopoiesis*. *Blood*. 98: 3058-3065.

- Dale, M. C. (2005). *DNA Methylation, Genomic Silencing, and Links to Nutrition and Cancer Nutrition*. 183-195.
- Deeg, H. J. [et al.] (2004). *Hematologic responses of patients with MDS to antithymocyte globulin plus etanercept correlate with improved flow scores of marrow cells*. *Leuk Res*. 28(11): 1177-80.
- Del Canizo, M. [et al.] (2000). *Incidence and characterization of secondary myelodysplastic syndromes following autologous transplantation*. *Haematologica*. 85(4): 403-9.
- Delforge, M. (2003). *Understanding the pathogenesis of myelodysplastic syndromes*. *Hematol J*. 4(5): 303-9.
- Desagher, S. [et al.] (1999). *Bid-induced conformational change of Bax is responsible for mitochondrial cytochrome c release during apoptosis*. *J Cell Biol*. 144(5): 891-901.
- Du, Y. [et al.] (2010). *Smoking and alcohol intake as risk factors for myelodysplastic syndromes (MDS)*. *Leuk Res*. Jan;34(1):1-5.
- Egger, G. [et al.] (2004). *Epigenetics in human disease and prospects for epigenetic therapy*. *Nature*. 429(6990): 457-63.
- Engeland, M. [et al.] (2003). *Effects of dietary folate and alcohol intake on promoter methylation in sporadic colorectal cancer: the Netherlands cohort study on diet and cancer*. *Cancer Res*. 63(12): 3133-7.
- Engelhardt, M. [et al.] (2004). *Telomeres and telomerase in normal and leukemic hematopoietic cells*. *Leuk Res*. 28(10): 1001-4.
- Eskes, R. [et al.] (2000). *Bid induces the oligomerization and insertion of Bax into the outer mitochondrial membrane*. *Mol Cell Biol*. 20(3): 929-35.
- Esteller, M. & Herman, J. G. (2002). *Cancer as an epigenetic disease: DNA methylation and chromatin alterations in human tumours*. *J Pathol*. 196(1): 1-7.
- Esteller, M. (2002). *CpG island hypermethylation and tumor suppressor genes: a booming present, a brighter future*. *Oncogene*. 21(35): 5427-40.
- Esteller, M. [et al.] (2002). *Cancer epigenetics and methylation*. *Science*. 297(5588): 1807-8; discussion 1807-8.
- Esteller, M. (2003). *Relevance of DNA methylation in the management of cancer*. *Lancet Oncol*. 4(6): 351-8.
- Esteller, M. (2003). *Cancer epigenetics: DNA methylation and chromatin alterations in human cancer*. *Adv Exp Med Biol*. 532: 39-49.
- Esteller, M. (2003). *Profiling aberrant DNA methylation in hematologic neoplasms: a view from the tip of the iceberg*. *Clin Immunol*. 109(1): 80-8.
- Esteller, M. (2008). *Epigenetics in cancer*. *N Engl J Med*. Mar 13;358(11):1148-59.
- Faderl, S. & Kantarjian, H. M. (2004). *Novel therapies for myelodysplastic syndromes*. *Cancer*. 101(2): 226-41.
- Farquhar, M. J. & Bowen, D. T. (2003). *Oxidative Stress and the Myelodysplastic Syndromes*. *Int J Hematol*. 77: 342-350.
- Feinberg, A. P. (2004). *The epigenetics of cancer etiology*. *Semin Cancer Biol*. 14(6): 427-32.

- Feinberg, A. P. & Tycko, B. (2004). *The history of cancer epigenetics*. Nat Rev Cancer. 4(2): 143-53.
- Feinberg, A. P. (2007). *Phenotypic plasticity and the epigenetics of human disease*. Nature. 447(7143): 433-40.
- Feinberg, A. P. (2007). *An epigenetic approach to cancer etiology*. Cancer J. 13(1): 70-4. Review.
- Fischle, W. [et al.] (2003). *Histone and chromatin cross-talk*. Curr Opin Cell Biol. 15(2): 172-83.
- Fischle, W. [et al.] (2003). *Binary switches and modification cassettes in histone biology and beyond*. Nature. 425(6957): 475-9.
- Folkman, J. (1995). *Angiogenesis inhibitors generated by tumors*. Mol Med. 1(2): 120-2.
- Follo, M. Y. [et al.] (2009). *Phosphoinositide-phospholipase C beta1 mono-allelic deletion is associated with myelodysplastic syndromes evolution into acute myeloid leukemia*. J Clin Oncol. 27(5): 782-90.
- Fontenay-Roupie, M. [et al.] (1999). *Ineffective erythropoiesis in myelodysplastic syndromes: correlation with Fas expression but not with lack of erythropoietin receptor signal transduction*. Br J Haematol. 106(2): 464-73.
- Frosst, P. [et al.] (1995). *A candidate genetic risk factor for vascular disease: a common mutation in methylenetetrahydrofolate reductase*. Nat Genet. 10(1): 111-3.
- Fulda, S. (2009). *Inhibitor of apoptosis (IAP) proteins: novel insights into the cancer-relevant targets for cell death induction*. ACS Chem Biol. Jul 17;4(7):499-501.
- Galm, O. [et al.] (2005). *The fundamental role of epigenetics in hematopoietic malignancies*. Blood Rev. 20(1): 1-13.
- Gal-Yam, E. N. [et al.] (2008). *Cancer epigenetics: modifications, screening, and therapy*. Annu Rev Med. 59: 267-80.
- Garcia-Manero, G. [et al.] (2007). *Evaluating new treatment options for MDS*. Clin Adv Hematol Oncol. 5(11): 1-9; quiz 10-2.
- Garcia-Manero, G. (2007). *Modifying the epigenome as a therapeutic strategy in myelodysplasia*. Hematology Am Soc Hematol Educ Program. 2007:405-11.
- Gatterman, N. (1999). *From sideroblastic anemia to the role of mitochondrial DNA mutations in myelodysplastic syndromes*. Leukemia Research 24: 141-151.
- Germing, U. [et al.] (2004). *No increase in age-specific incidence of myelodysplastic syndromes*. Haematologica. 89(8): 905-10.
- Gersuk, G. M. [et al.] (1998). *A role for tumour necrosis factor-alpha, Fas and Fas-Ligand in marrow failure associated with myelodysplastic syndrome*. Br J Haematol. 103(1): 176-88.
- Golub, T. R. [et al.] (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.
- Gonçalves, A. C. [et al.] (2009). *Influência do polimorfismo ALA(9)VAL da MnSOD na SMD*. Sociedade Portuguesa de Hematologia.

- Gorman, A.M. [et al.] (1997). *Use of flow cytometry techniques in studying mechanisms of apoptosis in leukemic cells*. *Cytometry*. 29(2): 97-105.
- Goto, T. [et al.] (2009). *Aberrant methylation of the p16 gene is frequently detected in advanced colorectal cancer*. *Anticancer Res*. 29(1): 275-7.
- Grant, S. & Dent, P. (2007). *Simultaneous interruption of signal transduction and cell cycle regulatory pathways: implications for new approaches to the treatment of childhood leukemias*. *Curr Drug Targets*. 8(6): 751-9.
- Greco, M. [et al.] (2010). *Promoter methylation of DAPK1, E-Cadherin and Thrombospondin-1 in de novo and Therapy-related Myeloid Neoplasms*. *Blood Cells Mol Dis*. Jul 22. [Epub ahead of print].
- Greenberg, P. L. (1998). *Apoptosis and its role in the myelodysplastic syndromes: implications for disease natural history and treatment*. *Leuk Res*. 22(12): 1123-36.
- Greenberg, P. L. (1998). *Risk factors and their relationship to prognosis in myelodysplastic syndromes*. *Leuk Res*. 22 Suppl 1: S3-6.
- Grövdal, M. [et al.] (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*. *Clin Cancer Res*. 13(23): 7107-12.
- Hake, S. B. [et al.] (2004). *Linking the epigenetic 'language' of covalent histone modifications to cancer*. *Br J Cancer*. 90(4): 761-9.
- Harada, H. [et al.] (2003). *Implications of somatic mutations in the AML1 gene in radiation-associated and therapy-related myelodysplastic syndromelacute myeloid leukemia*. *Blood*. 101(2): 673-80.
- Harada, H. [et al.] (2004). *High incidence of somatic mutations in the AML1/RUNX1 gene in myelodysplastic syndrome and low blast percentage myeloid leukemia with myelodysplasia*. *Blood*. 103(6): 2316-24.
- Hellström-Lindberg, E. [et al.] (1997). *Morphological changes and apoptosis in bone marrow from patients with myelodysplastic syndromes treated with granulocyte-CSF and erythropoietin*. *Leuk Res*. May;21(5):415-25.
- Hellström-Lindberg, E. (2008). *Myelodysplastic syndromes: an historical perspective*. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 42.
- Herman, J. G. [et al.] (1996). *Hypermethylation-associated inactivation indicates a tumor suppressor role for p15INK4B*. *Cancer Res*. 56(4): 722-7.
- Herman, J. G. & Baylin, S. B. (2003). *Gene silencing in cancer in association with promoter hypermethylation*. *N Engl J Med*. 349(21): 2042-54.
- Hirai, H. (2003). *Molecular mechanisms of myelodysplastic syndrome*. *Jpn J Clin Oncol*. 33(4): 153-60.
- Hoefsloot, L. H. [et al.] (1997). *Erythropoietin-induced activation of STAT5 is impaired in the myelodysplastic syndrome*. *Blood*. 89(5): 1690-700.
- Hopfer, O. [et al.] (2008). *Aberrant promotor methylation in MDS hematopoietic cells during in vitro lineage specific differentiation is differently associated with DNMT isoforms*. *Leuk Res*. 33(3): 434-42.

- Hsu, Y. T. [et al.] (1997). *Cytosol-to-membrane redistribution of Bax and Bcl-X(L) during apoptosis*. Proc Natl Acad Sci U S A. 94(8): 3668-72.
- Hu, Q. (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. Volume 100, Issue 9, pages 1884-1891.
- Hu, Y. [et al.] (1998). *Bcl-XL interacts with Apaf-1 and inhibits Apaf-1-dependent caspase-9 activation*. Proc Natl Acad Sci U S A. Apr 14;95(8):4386-91.
- Issa, J. P. (2007). *DNA methylation as a therapeutic target in cancer*. Clin Cancer Res. Mar 15;13(6):1634-7.
- Iwabuchi, A. [et al.] (1992). *Trisomy of chromosome 8 in myelodysplastic syndrome. Significance of the fluctuating trisomy 8 population*. Cancer Genet Cytogenet. 62(1): 70-4.
- Izutsu, K. [et al.] (2001). *The corepressor CtBP interacts with Evi-1 to repress transforming growth factor beta signaling*. Blood. 97(9): 2815-22.
- Jang, H. [et al.] (2005). *Genetic and epigenetic interactions between folate and aging in carcinogenesis*. J Nutr. 135(12 Suppl): 2967S-2971S.
- Jawad, M. [et al.] (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.
- Jiang, Y. [et al.] (2009). *Aberrant DNA methylation is a dominant mechanism in MDS progression to AML*. Blood. 113(6): 1315-25.
- Johansson, M. (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 Epidemiol Biomarkers Prev. 17(2): 279-85.
- Johansson, M. & Persson, J. L. (2008). *Cancer therapy: targeting cell cycle regulators*. Anticancer Agents Med Chem. 8(7): 723-31.
- Johnson, E. J. [et al.] (1996). *Molecular definition of a narrow interval at 7q22.1 associated with myelodysplasia*. Blood. 87(9):3579-86.
- Jonasova, A. [et al.] (1998). *Cyclosporin A therapy in hypoplastic MDS patients and certain refractory anaemias without hypoplastic bone marrow*. Br J Haematol. 100(2): 304-9.
- Jones, P. A. & Laird, P. W. (1999). *Cancer epigenetics comes of age*. Nat Genet. 21(2): 163-7.
- Jones, P. A. (2002). *DNA methylation and cancer*. Oncogene. 21(35): 5358-60.
- Jones, P. A. & Baylin, S. B. (2002). *The fundamental role of epigenetic events in cancer*. Nat Rev Genet. 3(6): 415-28. Review.
- Jones, P. A. (2002). *Death and methylation*. Nature. 409(6817): 141, 143-4.
- Jotterand Bellomo, M. [et al.] (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 Genet Cytogenet. 59(2): 138-60.
- Kamb, A. [et al.] (1994). *A cell cycle regulator potentially involved in genesis of many tumor types*. Science. 264(5157): 436-40.

- Kanchan, K. & Loughran, T. P. Jr. (2003). *Antigen-driven clonal T cell expansion in disorders of hematopoiesis*. *Leuk Res.* 27(4): 291-2.
- Kawakami, K. [et al.] (2003). *The folate pool in colorectal cancers is associated with DNA hypermethylation and with a polymorphism in methylenetetrahydrofolate reductase*. *Clin Cancer Res.* 9(16 Pt 1): 5860-5.
- Killick, S. B. [et al.] (2003). *A pilot study of antithymocyte globulin (ATG) in the treatment of patients with 'low-risk' myelodysplasia*. *Br J Haematol.* 120(4): 679-84.
- Kim, H. N. [et al.] (2009). *Association between polymorphisms of folate-metabolizing enzymes and hematological malignancies*. *Leuk Res.* 33(1): 82-7.
- Kim, H. N. [et al.] (2008). *Association between folate-metabolizing pathway polymorphism and non-Hodgkin lymphoma*. *Br J Haematol.* 140(3): 287-94.
- Kim, H. N. [et al.] (2009). *Polymorphisms of drug-metabolizing genes and risk of non-Hodgkin lymphoma*. *Am J Hematol.* 84(12): 821-5.
- Kitagawa, M. [et al.] (1998). *Localization of Fas and Fas ligand in bone marrow cells demonstrating myelodysplasia*. *Leukemia.* 12(4): 486-92.
- Kitagawa, M. [et al.] (1997). *Overexpression of tumor necrosis factor (TNF)-alpha and interferon (IFN)-gamma by bone marrow cells from patients with myelodysplastic syndromes*. *Leukemia.* 11(12): 2049-54.
- Kochenderfer, J. N. [et al.] (2002). *Loss of T-lymphocyte clonal dominance in patients with myelodysplastic syndrome responsive to immunosuppression*. *Blood.* 100(10): 3639-45.
- Kraemer, D. [et al.] (1994). *The human CAN protein, a putative oncogene product associated with myeloid leukemogenesis, is a nuclear pore complex protein that faces the cytoplasm*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 91(4): 1519-23.
- Lai, J. L. [et al.] (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.
- Langemeijer, S. M. [et al.] (2009). *Acquired mutations in TET2 are common in myelodysplastic syndrome*. *Nat Genet.* 41(7): 838-42.
- Lehmann, U. [et al.] (2004). *Role of epigenetic changes in hematological malignancies*. *Ann Hematol.* 83(3): 137-52.
- Lepelley, P. [et al.] (1996). *Is apoptosis a massive process in myelodysplastic syndromes?* *Br J Haematol.* Nov;95(2):368-71.
- Li, H. [et al.] (2004). *A prospective study of plasma selenium levels and prostate cancer risk*. *J Natl Cancer Inst* 96: 696-703.
- Liesveld, J. L. [et al.] (2004). *The hematopoietic stem cell in myelodysplasia*. *Stem Cells.* 22(4): 590-9.
- Lin, J. [et al.] (2008). *Methylation status of fragile histidine triad (FHIT) gene and its clinical impact on prognosis of patients with myelodysplastic syndrome*. *Leuk Res.* 32(10): 1541-5.
- Liu, X. [et al.] (1996). *Induction of apoptotic program in cell-free extracts: requirement for dATP and cytochrome c*. *Cell.* 86(1): 147-57.

- Lodish, H. F. [et al.] (1995). *The erythropoietin receptor: biogenesis, dimerization, and intracellular signal transduction*. Cold Spring Harb Symp Quant Biol. 60: 93-104.
- Loken, M. R. & Wells, D. A. (2008). *The role of flow cytometry in myelodysplastic syndromes*. J Natl Compr Canc Netw. 6(9): 935-41.
- Loken, M. R. [et al.] (2008). *Flow cytometry in myelodysplastic syndromes: report from a working conference*. Leuk Res. 32(1): 5-17.
- Lubbert, M. (2003). *Gene silencing of the p15/INK4B cell-cycle inhibitor by hypermethylation: an early or later epigenetic alteration in myelodysplastic syndromes?* Leukemia. 17(9): 1762-4.
- Lund, A. H. & van Lohuizen, M. (2004). *Epigenetics and cancer*. Genes Dev. 18(19): 2315-35.
- Ma, X. [et al.] (2007). *Clustering in the incidence of myelodysplastic syndromes*. Leuk Res. 31(12): 1683-6.
- Ma, X. [et al.] (2007). *Myelodysplastic syndromes: incidence and survival in the United States*. Cancer. 109(8): 1536-42.
- Maciejewski, J. P. [et al.] (1995). *Increased expression of Fas antigen on bone marrow CD34+ cells of patients with aplastic anaemia*. Br J Haematol. Sep;91(1):245-52.
- Martin, G. A. [et al.] (1990). *The GAP-related domain of the neurofibromatosis type 1 gene product interacts with ras p21*. Cell.;63(4): 843-9.
- Matsuda, A. [et al.] (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*. Eur J Haematol. 60(4): 260-1.
- Maurer, A. B. [et al.] (1993). *Restoration of impaired cytokine secretion from monocytes of patients with myelodysplastic syndromes after in vivo treatment with GM-CSF or IL-3*. Leukemia. 7(11): 1728-33.
- Mhaweche, P. & Saleem, A. (2001). *Myelodysplastic syndrome: review of the cytogenetic and molecular data*. Crit Rev Oncol Hematol. 40(3): 229-38.
- Mihara, K. [et al.] (2007). *Genetic and epigenetic alterations in myelodysplastic syndrome*. Cytogenet Genome Res. 118(2-4): 297-303. Review.
- Mitani, K. [et al.] (1994). *Generation of the AML1-EVI-1 fusion gene in the t(3;21)(q26;q22) causes blastic crisis in chronic myelocytic leukemia*. EMBO J. 13(3): 504-10.
- Mochizuki, N. [et al.] (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. Nov 1;96(9):3209-14.
- Mokarram, P. [et al.] (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 J Gastroenterol. 14(23): 3662-71.
- Molldrem, J. J. [et al.] (2002). *Antithymocyte globulin for treatment of the bone marrow failure associated with myelodysplastic syndromes*. Ann Intern Med. 137(3): 156-63.

- Molnár, L. [et al.] (2000). *Detection of TNFalpha expression in the bone marrow and determination of TNFalpha production of peripheral blood mononuclear cells in myelodysplastic syndrome*. *Pathol Oncol Res.* 6(1): 18-23.
- Mufti, G. J. (2004). *Emerging therapeutic and supportive care approaches for the myelodysplastic syndromes*. *Rev Clin Exp Hematol.* 8(2):E4.
- Mufti, G. J. (2004). *Pathobiology, classification, and diagnosis of myelodysplastic syndrome*. *Best Pract Res Clin Haematol.* 17(4): 543-57.
- Mulero-Navarro, S. & Esteller, M. (2008). *Epigenetic biomarkers for human cancer: the time is now*. *Crit Rev Oncol Hematol.* 68(1): 1-11.
- Mullighan, C. G. (2009). *TET2 mutations in myelodysplasia and myeloid malignancies*. *Nat Genet.* 41(7): 766-7.
- Nagata, S. & Golstein, P. (1995). *The Fas death factor*. *Science.* 267(5203): 1449-56.
- Nakayama, M. [et al.] (1998). *Hypomethylation status of CpG sites at the promoter region and overexpression of the human MDR1 gene in acute myeloid leukemias*. *Blood.* 92(11): 4296-307.
- Niemeyer, C. M. (2002). *Nanotechnology. Tools for the biomolecular engineer*. *Science.* 297(5578): 62-3.
- Nilsson, L. [et al.] (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.
- Nimer, S. D. (2008). *MDS: a stem cell disorder-but what exactly is wrong with the primitive hematopoietic cells in this disease?* *Hematology Am Soc Hematol Educ Program.* 2008: 43-51.
- Nimer, S. D. (2008). *Myelodysplastic syndromes*. *Blood.* 111(10): 4841-51.
- Nishino, H. T. & Chang, C. C. (2005). *Myelodysplastic syndromes: clinicopathologic features, pathobiology, and molecular pathogenesis*. *Arch Pathol Lab Med.* 129(10): 1299-310.
- Nobori, T. [et al.] (1994). *Deletions of the cyclin-dependent kinase-4 inhibitor gene in multiple human cancers*. *Nature.* 368(6473): 753-6.
- Norman, H. A. [et al.] (2004). *Review of the International Research Conference on Food, Nutrition, and Cancer, 2004*. *J Nutr.* 134(12 Suppl): 3391S-3393S.
- O'Brien, J. [et al.] (2000). *Investigation of the Alamar Blue (resazurin) fluorescent dye for the assessment of mammalian cell cytotoxicity*. *Eur J Biochem.* 267(17): 5421-6.
- Oh, S. T. & Gotlib, J. (2008). *Antiangiogenic therapy in myelodysplastic syndromes: is there a role?* *Curr Hematol Malig Rep.* 3(1):10-8.
- Ohyashiki, J. H. [et al.] (1994). *Telomere shortening associated with disease evolution patterns in myelodysplastic syndromes*. *Cancer Res.* 54(13): 3557-60.
- Oltvai, Z. N. [et al.] (1993). *Bcl-2 heterodimerizes in vivo with a conserved homolog, Bax, that accelerates programmed cell death*. *Cell.* 74(4): 609-19.
- Ortega, J. & List, A. (2007). *Immunomodulatory drugs in the treatment of myelodysplastic syndromes*. *Curr Opin Oncol.* 19(6): 656-9.

- Padro, T. [et al.] (2000). *Increased angiogenesis in the bone marrow of patients with acute myeloid leukemia*. Blood. 95(8): 2637-44.
- Padua, R. A. [et al.] (1998). *RAS, FMS and p53 mutations and poor clinical outcome in myelodysplasias: a 10-year follow-up*. Leukemia. 12(6): 887-92.
- Paquette, R. L. [et al.] (1993). *N-ras mutations are associated with poor prognosis and increased risk of leukemia in myelodysplastic syndrome*. Blood. 82(2): 590-9.
- Parcells, B. W. [et al.] (2006). *FMS-like tyrosine kinase 3 in normal hematopoiesis and acute myeloid leukemia*. Stem Cells. 24(5): 1174-84.
- Parker, J. E. & Mufti, G. J. (2000). *Excessive apoptosis in low risk myelodysplastic syndromes (MDS)*. Leuk Lymphoma. 40(1-2): 1-24.
- Parker, J. E. [et al.] (2000). *The role of apoptosis, proliferation, and the Bcl-2-related proteins in the myelodysplastic syndromes and acute myeloid leukemia secondary to MDS*. Blood. 2000 Dec 1;96(12):3932-8. PMID: 11090080
- Parker, J. E. & Mufti, G. J. (2004). *The myelodysplastic syndromes: a matter of life or death*. Acta Haematol. 111(1-2): 78-99.
- Pedersen-Bjergaard, J. [et al.] (2007). *Genetic pathways in the pathogenesis of therapy-related myelodysplasia and acute myeloid leukemia*. Hematology Am Soc Hematol Educ Program. 2007:392-7.
- Pfeilstöcker, M. [et al.] (2007). *Myelodysplastic syndromes, aging, and age: correlations, common mechanisms, and clinical implications*. Leuk Lymphoma. 48(10): 1900-9.
- Preisler, H. D. [et al.] (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.
- Pruneri, G. [et al.] (1999). *Angiogenesis in myelodysplastic syndromes*. Br J Cancer. 81(8): 1398-401.
- Quesnel, B. [et al.] (1998). *Methylation of the p15(INK4b) gene in myelodysplastic syndromes is frequent and acquired during disease progression*. Blood. 91(8): 2985-90.
- Quina, A. S. [et al.] (2006). *Chromatin structure and epigenetics*. Biochem Pharmacol. 72(11): 1563-9.
- Radu, A. [et al.] (1995). *The peptide repeat domain of nucleoporin Nup98 functions as a docking site in transport across the nuclear pore complex*. Cell. 81(2): 215-22.
- Rajapaksa, R. [et al.] (1996). *Altered oncoprotein expression and apoptosis in myelodysplastic syndrome marrow cells*. Blood. 88(11): 4275-87.
- Raza, A. [et al.] (1995). *Apoptosis in bone marrow biopsy samples involving stromal and hematopoietic cells in 50 patients with myelodysplastic syndromes*. Blood. 86(1): 268-76.
- Raza, A. [et al.] (1995). *Simultaneous assessment of cell kinetics and programmed cell death in bone marrow biopsies of myelodysplastics reveals extensive apoptosis as the probable basis for ineffective hematopoiesis*. Am J Hematol. 48(3): 143-54.

- Reizenstein, P. & Dabrowski, L. (1991). *Increasing prevalence of the myelodysplastic syndrome. An international Delphi study.* Anticancer Res. 11(3): 1069-70.
- Ridge, S. A. & Wiedemann, L. M. (1994). *Chromosome 11q23 abnormalities in leukaemia.* Leuk Lymphoma. Jun;14(1-2):11-7.
- Rodeghiero, F. [et al.] (2009). *Standardization of terminology, definitions and outcome criteria in immune thrombocytopenic purpura of adults and children: report from an international working group.* Blood. 113(11): 2386-93.
- Roman, J. [et al.] (2001). *Hypermethylation of the calcitonin gene in acute lymphoblastic leukaemia is associated with unfavourable clinical outcome.* Br J Haematol. May;113(2):329-38.
- Rosenfeld, C. & Bedell, C. (2002). *Pilot study of recombinant human soluble tumor necrosis factor receptor (TNFR:Fc) in patients with low risk myelodysplastic syndrome.* Leuk Res. 26(8): 721-4.
- Rothman, N. [et al.] (1997). *Benzene poisoning, a risk factor for hematological malignancy, is associated with the NQO1 609C-->T mutation and rapid fractional excretion of chlorzoxazone.* Cancer Res. 57(14): 2839-42.
- Roulston, D. [et al.] (1993). *Molecular genetics of myeloid leukemia: identification of the commonly deleted segment of chromosome 20.* Blood. 82(11): 3424-9.
- Saif, M. W. [et al.] (2002). *Autoimmune phenomena in patients with myelodysplastic syndromes and chronic myelomonocytic leukemia.* Leuk Lymphoma. 43(11): 2083-92.
- Salomon-Nguyen, F. [et al.] (2000). *The t(1;12)(q21;p13) translocation of human acute myeloblastic leukemia results in a TEL-ARNT fusion.* Proc Natl Acad Sci U S A. 97(12): 6757-62.
- Santos-Rosa, H. & Caldas, C. (2005). *Chromatin modifier enzymes, the histone code and cancer.* Eur J Cancer. 41(16): 2381-402.
- Sarmiento-Ribeiro, A. B. (2000). *Alterações fenotípicas da célula tumoral e a sua relação com a resistência à quimioterapia.* Tese de Doutorado
- Sarmiento-Ribeiro, A. B. [et al.] (2008). *Epigenetic modulation - A new therapeutic approach to lymphoid malignancies.* Haematologica – The hematology Journal. 93 (s1): 538.
- Sauntharajah, Y. [et al.] (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.
- Schendel, S. L. [et al.] (1997). *Channel formation by antiapoptotic protein Bcl-2.* Proc Natl Acad Sci U S A. 94(10): 5113-8.
- Schernhammer, E. [et al.] (2007). *Plasma folate, vitamin B6, vitamin B12, and homocysteine and pancreatic cancer risk in four large cohorts.* Cancer Res. 67(11): 5553-60.
- Sekeres, M. A. (2009). *Treatment of MDS: something old, something new, something borrowed...* Hematology Am Soc Hematol Educ Program. 656-63.

- Sekeres, M. A. & Steensma, D. P. (2009). *Defining prior therapy in myelodysplastic syndromes and criteria for relapsed and refractory disease: implications for clinical trial design and enrollment*. *Blood*. 114(13): 2575-80.
- Sgonc, R. & Gruber, J. (1998). *Apoptosis detection: an overview*. *Exp Gerontol*. 33(6): 525-33.
- Shannon, K. M. [et al.] (1994). *Loss of the normal NF1 allele from the bone marrow of children with type 1 neurofibromatosis and malignant myeloid disorders*. *N Engl J Med*. 330(9): 597-601.
- Silverman, L. R. [et al.] (2002). *Randomized controlled trial of azacitidine in patients with the myelodysplastic syndrome: a study of the cancer and leukemia group B*. *J Clin Oncol*. 20(10): 2429-40.
- Singal, R. & Ginder, G. D. (1999). *DNA methylation*. *Blood*. 93(12): 4059-70.
- Skibola, C. F. [et al.] (1999). *Polymorphisms in the methylenetetrahydrofolate reductase gene are associated with susceptibility to acute leukemia in adults*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 96(22): 12810-5.
- Small, D. (2006). *FLT3 mutations: biology and treatment*. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 178-84.
- Smith, M. T. [et al.] (2002). *Low NAD(P)H:quinone oxidoreductase activity is associated with increased risk of leukemia with MLL translocations in infants and children*. *Blood*. 100(13): 4590-3.
- Smith, M. T. (2001). *Chromosome damage from biological reactive intermediates of benzene and 1,3-butadiene in leukemia*. *Adv Exp Med Biol*. 500: 279-87.
- Smith, M. T. [et al.] (2001). *Low NAD(P)H:quinone oxidoreductase 1 activity is associated with increased risk of acute leukemia in adults*. *Blood*. 97(5): 1422-6.
- Smith, M. T. & Rothman, N. (2000). *Biomarkers in the molecular epidemiology of benzene-exposed workers*. *J Toxicol Environ Health A*. 61(5-6): 439-45.
- Srivastava, A. [et al.] (1988). *KRAS2 oncogene overexpression in myelodysplastic syndrome with translocation 5;12*. *Cancer Genet Cytogenet*. 35(1): 61-71.
- Stempak, J. M. [et al.] (2005). *Cell and stage of transformation-specific effects of folate deficiency on methionine cycle intermediates and DNA methylation in an in vitro model*. *Carcinogenesis*. 26(5): 981-90.
- Stephenson, J. [et al.] (1995). *Possible co-existence of RAS activation and monosomy 7 in the leukaemic transformation of myelodysplastic syndromes*. *Leuk Res*. 19(10):741-8.
- Stirewalt, D. L. & Radich, J. P. (2003). *The role of FLT3 in haematopoietic malignancies*. *Nat Rev Cancer*. 3(9): 650-65.
- Stover, P.J. & Caudill, M. A. (2008). *Genetic and epigenetic contributions to human nutrition and health: managing genome-diet interactions*. *J Am Diet Assoc*. 108(9): 1480-7.
- Strom, S. S. [et al.] (2005). *Risk factors of myelodysplastic syndromes: a case-control study*. *Leukemia*. 19(11): 1912-8.
- Strom, S. S. [et al.] (2008). *Epidemiology of myelodysplastic syndromes*. *Semin Hematol*. 45(1): 8-13.

- Swerdlow, S. H. (2008). *WHO classification of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues*. 4th edition.
- Tefferi, A. & Vardiman, J. W. (2009). *Myelodysplastic syndromes*. *N Engl J Med*. 361(19): 1872-85.
- Teodoridis, J. M. [et al.] (2008). *CpG island methylator phenotype (CIMP) in cancer: causes and implications*. *Cancer Lett*. 268(2): 177-86.
- Teofili, L. [et al.] (2001). *Expression of p15(ink4b) gene during megakaryocytic differentiation of normal and myelodysplastic hematopoietic progenitors*. *Blood*. 98(2): 495-7.
- Tien, H. F. [et al.] (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*. *Br J Haematol*. 112(1): 148-54.
- Tong, N. [et al.] (2010). *Methylenetetrahydrofolate reductase polymorphisms, serum methylenetetrahydrofolate reductase levels, and risk of childhood acute lymphoblastic leukemia in a Chinese population*. *Cancer Sci*. 101(3): 782-6.
- Toyokuni, S. [et al.] (1995). *Persistent oxidative stress in cancer*. *FEBS Lett*. 358(1): 1-3. Review.
- Toyota, M. & Issa, J. P. (2005). *Epigenetic changes in solid and hematopoietic tumors*. *Semin Oncol*. 32(5): 521-30.
- Tsukamoto, N. [et al.] (1992). *Methylation status of c-myc oncogene in leukemic cells: hypomethylation in acute leukemia derived from myelodysplastic syndromes*. *Exp Hematol*. 20(9): 1061-4.
- Uchida, T. [et al.] (1997). *Hypermethylation of the p15INK4B gene in myelodysplastic syndromes*. *Blood*. 90(4): 1403-9.
- Ulrey, C. L. [et al.] (2005). *The impact of metabolism on DNA methylation*. *Hum Mol Genet*. 14 Spec No 1: R139-47.
- Valko, M. [et al.] (2007). *Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease*. *Int J Biochem Cell Biol*. 39(1): 44-84.
- Vallian, S. [et al.] (2009). *Methylation status of p16 INK4A tumor suppressor gene in Iranian patients with sporadic breast cancer*. *J Cancer Res Clin Oncol*. 135(8): 991-6. Epub 2009 Jan 6.
- Verhoef, G. E. [et al.] (1992). *Recombinant human erythropoietin for the treatment of anemia in the myelodysplastic syndromes: a clinical and erythrokinetic assessment*. *Ann Hematol*. 64(1): 16-21.
- Vogel, S. [et al.] (2008). *Associations of dietary methyl donor intake with MLH1 promoter hypermethylation and related molecular phenotypes in sporadic colorectal cancer*. *Carcinogenesis*. 29(9): 1765-73.
- Vogel, S. [et al.] (2008). *Dietary folate, methionine, riboflavin, and vitamin B-6 and risk of sporadic colorectal cancer*. *J Nutr*. 138(12): 2372-8.
- Walker, N. I. [et al.] (1988). *Patterns of cell death*. *Methods Achiev Exp Pathol*. 13: 18-54.

- Weber, M. [et al.] (2007). *Distribution, silencing potential and evolutionary impact of promoter DNA methylation in the human genome*. Nat Genet. 39(4): 457-66.
- Weisberg, I. [et al.] (1998). *A second polymorphism in methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) associated with decreased enzyme activity*. Mol Genet Metab. Jul;64(3):169-72.
- Wijermans, P. [et al.] (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*. J Clin Oncol. 18(5): 956-62.
- Williamson, P. J. [et al.] (1994). *Establishing the incidence of myelodysplastic syndrome*. Br J Haematol. 87(4): 743-5.
- Wu, S. J. [et al.] (2006). *Clinical implications of SOCS1 methylation in myelodysplastic syndrome*. Br J Haematol. 135(3): 317-23.
- Yagasaki, F. [et al.] (1999). *Fusion of TEL/ETV6 to a novel ACS2 in myelodysplastic syndrome and acute myelogenous leukemia with t(5;12)(q31;p13)*. Genes Chromosomes Cancer. 26(3): 192-202.
- Yang, J. [et al.] (1997). *Prevention of apoptosis by Bcl-2: release of cytochrome c from mitochondria blocked*. Science. 275(5303): 1129-32.
- Yeh, K.T. [et al.] (2003). *Epigenetic changes of tumor suppressor genes, P15, P16, VHL and P53 in oral cancer*. Oncol Rep. 10(3): 659-63.
- Yoneda-Kato, N. [et al.] (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.
- Yoo, C. B. & Jones, P. A. (2006). *Epigenetic therapy of cancer: past, present and future*. Nat Rev Drug Discov. 5(1): 37-50.
- Zang, D. Y. [et al.] (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.
- Zha, H. [et al.] (1996). *Proapoptotic protein Bax heterodimerizes with Bcl-2 and homodimerizes with Bax via a novel domain (BH3) distinct from BH1 and BH2*. J Biol Chem. 271(13): 7440-4.
- Ziemann, C. [et al.] (1999). *Reactive oxygen species participate in mdrlb mRNA and P-glycoprotein overexpression in primary rat hepatocyte cultures*. Carcinogenesis. 20(3): 407-14.