



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”

Câmpus de São José do Rio Preto

Fernanda de Souza Monteiro

Análise do Padrão de Metilação do Gene *SOX17* e Expressão de
microRNAs ao Diagnóstico de Síndrome Mielodisplásica e Citopenia
Idiopática de Significado Indeterminado

São José do Rio Preto
2018

Fernanda de Souza Monteiro

Análise do Padrão de Metilação do Gene *SOX17* e Expressão de
microRNAs ao Diagnóstico de Síndrome Mielodisplásica e Citopenia
Idiopática de Significado Indeterminado

Tese apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Genética, junto ao Programa de Pós-Graduação em Biociências - Genética, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de São José do Rio Preto.

Financiadora: CAPES

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Agnes Cristina Fett Conte

São José do Rio Preto
2018

Monteiro, Fernanda de Souza.

Análise do padrão de metilação do gene SOX17 e expressão de microRNAs ao diagnóstico de síndrome mielodisplásica e citopenia idiopática de significado indeterminado / Fernanda de Souza Monteiro. -- São José do Rio Preto, 2018
76 f. : il., tabs.

Orientador: Agnes Cristina Fett Conte

Tese (doutorado) – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas

1. Genética humana. 2. Citogenética humana. 3. Síndromes mielodisplásicas - Aspectos genéticos. 4. Epigenética. 5. Expressão gênica. 6. MicroRNAs. I. Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho". Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas.
II. Título.

CDU – 576.3:575

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca do IBILCE
UNESP - Câmpus de São José do Rio Preto

Fernanda de Souza Monteiro

Análise do Padrão de Metilação do Gene SOX17 e Expressão de
microRNAs ao Diagnóstico de Síndrome Mielodisplásica e Citopenia
Idiopática de Significado Indeterminado

Tese apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Genética, junto ao Programa de Pós-Graduação em Biociências-Genética, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de São José do Rio Preto.

Financiadora: CAPES

Comissão Examinadora

Prof^a. Dr^a. Agnes Cristina Fett Conte
FAMERP/FUNFARME – São José do Rio Preto
Orientadora

Prof^a. Dr^a. Ana Elizabeth Silva
UNESP- São José do Rio Preto

Prof^a. Dr^a Paula Rahal
UNESP- São José do Rio Preto

Profa. Dra. Ana Luiza Bossolani Martins
Universidade Federal de Mato Grosso do Sul-UFMS

Prof. Dr. Flávio Naoum
Instituto Naoum de Hematologia

São José do Rio Preto
07 de Maio de 2018

A meus pais Luiz Fernando e Rosângela, pela dedicação, compreensão e exemplo de determinação e as minhas irmãs Luiza e Julia, grandes amores da minha vida.

Desejo expressar os meus sinceros agradecimentos:

À Deus.

A todos os pacientes que aceitaram participar desse projeto o meu eterno respeito e sinceros agradecimentos pela resignação e confiança.

À minha orientadora, Dra. Agnes Cristina Fett Conte, pela paciência, confiança e oportunidade de desenvolver esta pesquisa. Foi uma honra tê-la como minha orientadora durante todos esses anos, grandes ensinamentos que servirão sempre como inspiração.

Aos meus pais, Luiz Fernando e Rosângela, pelo apoio, amor incondicional, incentivo e oportunidade de realizar mais essa conquista.

Às minhas irmãs Luiza e Júlia, pelo amor, carinho, paciência, e por acreditarem da forma mais doce e sincera na minha capacidade.

Ao meu namorado Daniel Tomasetto, e toda sua família, pelo carinho, atenção, palavras de incentivo e confiança, e todo amor dedicado a mim.

À Doutora Antonela, seu aluno Domenico Matiucci e a toda equipe do Laboratório de Medicina e Hematologia da Università Politecnica Delle Marche, Ancona-Itália, pela confiança e oportunidade de engrandecer nosso estudo com a parceria estabelecida, e em especial por contribuir com o meu crescimento profissional e pessoal. Foi uma experiência incrível.

Ao Dr. André e Dr. Daniel do Centro de Pesquisa em Oncologia Molecular (CPOM) do Hospital do Amor de Barretos, pelo auxílio no desenvolvimento de parte desse estudo, e todos os ensinamentos que foram fundamentais para o desenvolvimento do trabalho.

À Dra. Andrea Salles do laboratório de genética do Hospital de Base, pela paciência, ensinamentos durante todos esses anos, e pelas palavras de incentivo.

A todos os profissionais e alunos do Laboratório de Genética: Dante, Marina, Carla, Brasilina Maffei, Cristina Vendrame, Paula Abdala, Valéria Ferrarese, pelo carinho e compreensão.

A todos os meus amigos queridos pelos momentos inesquecíveis, experiências

compartilhadas, e toda a ajuda durante esses anos.

Ao Programa de Pós-Graduação em Genética do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas – IBILCE/UNESP, especialmente as coordenadoras.

Ao Ministério da Educação – Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES pela bolsa concedida.

À Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” e seus representantes, pelas condições para realização do curso de Pós-Graduação.

À Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto, FAMERP, ao Hospital de Base e Hemocentro, pela disponibilidade da infraestrutura laboratorial.

“O caminho que eu escolhi é o do amor. Não importam as dores, as angústias, nem as decepções que eu vou ter que encarar. Escolhi ser verdadeira. No meu caminho, o abraço é apertado, o aperto de mão é sincero, por isso não estranhe a minha maneira de sorrir e de te desejar o bem. É só assim que eu enxergo a vida, e é só assim que eu acredito que valha a pena viver.” Clarice Lispector.

RESUMO

Síndromes Mielodisplásicas (SMDs) é a denominação de um grupo de doenças neoplásicas clonais das células hematopoéticas, mais frequentemente observadas em idosos, caracterizadas por citopenias, displasia, hematopoese ineficaz e risco elevado para leucemia mielóide aguda (LMA). Citopenia(s) persistente(s), por mais de seis meses, e ausência de critérios diagnósticos para SMD, caracteriza a Citopenia Idiopática de Significado Indeterminado (ICUS). ICUS foi definida recentemente e é pouco conhecida quanto aos fatores etiológicos. Já as SMDs são consideradas protótipos de doenças epigenéticas, uma vez que distúrbios na metilação de alguns genes que regulam proliferação e diferenciação celular têm sido considerados fatores causais. O gene *SOX17*, por exemplo, é um supressor de tumor expresso em vários tecidos e alterações no seu padrão de metilação já foram observadas em tumores sólidos e neoplasias hematológicas, entretanto, foram pouco estudadas nas SMDs e não há descrições de estudos em ICUS. Do mesmo modo, alguns microRNAs vem sendo utilizados como marcadores moleculares para diagnóstico e prognóstico para diversas anormalidades hematológicas, mas seu papel na etiologia e desenvolvimento das SMDs também é pouco conhecido. Neste contexto, este estudo propôs investigar o padrão de metilação do gene *SOX17* por MSP-PCR em células da medula óssea (MO) de pacientes com SMD e ICUS ao diagnóstico, e analisar alterações no padrão de expressão de microRNAs por RT-PCR em células da MO de adultos e de crianças com SMD. Em adultos foram investigados os microRNAs miR126, miR29a, miR20a, miR181a, miR19b, miR21, miR155, miR146, miR22, miR193, miR26a e miR29b, e em crianças, os microRNAs miR193, miR29b miR22 e miR26a. O padrão de metilação do gene *SOX17* foi analisado em 26 pacientes com SMD e em 15 pacientes com ICUS. A hipermetilação da região promotora do gene foi identificada em 57,7% dos indivíduos com SMD e em 53,3% daqueles com ICUS, sugerindo que o silenciamento do *SOX17* pode ser um evento frequente e participar do curso inicial destas doenças. A análise dos microRNAs foi realizada em 55 pacientes adultos com SMD e em oito controles saudáveis. Dos 12 microRNAs testados, sete apresentaram padrão de expressão anormal em relação ao grupo controle, e dos quatro micros investigados em 28 pacientes com SMD infantil, os micros, miR193, miR29b apresentaram expressão diminuída em relação ao grupo controle em aproximadamente 70% dos pacientes analisados e a expressão do miR22 foi maior em mais da metade das amostras analisadas, enquanto uma expressão diminuída do miR26a foi observada em 28 (100%) dos pacientes analisados. Considerando-se que os microRNAs estudados podem atuar como reguladores da hematopoese, os dados revelam a importância dos microRNAs na etiologia das SMDs, sugerindo esses como possíveis biomarcadores diagnósticos para a SMD adulto e infantil.

Palavras-chave: mielodisplasia, epigenética, expressão gênica, microRNA

ABSTRACT

Myelodysplastic syndromes (MDS) denominates a group of neoplastic diseases of the hematopoietic cells, most commonly observed in elderly patients, characterized by cytopenias, dysplasia, ineffective hematopoiesis and high risk of acute myeloid leukemia (AML). Persistent cytopenia (s), for more than six months, and absence of diagnostic criteria for MDS, characterizes Idiopathic Cytopenia of Undetermined Significance (ICUS). ICUS has been recently defined, and little is known about its etiological factors. The MDSs are considered as prototypes of epigenetic diseases, due to the fact that methylation disorders of some genes that regulate cell proliferation and differentiation have been considered as causal factors. The *SOX17* gene, for example, is a tumor suppressor expressed in several tissues and changes in its methylation pattern have already been observed in solid tumors and hematological malignancy, however, these changes have been little studied in MDS and there are no descriptions of studies in ICUS. Similarly, some microRNAs are being used as molecular markers for diagnosis and prognosis for various hematological abnormalities, but its role in the etiology and development of MDS is also poorly understood. In this context, this study aimed to investigate the methylation pattern of the *SOX17* gene by MSP-PCR in bone marrow (BM) cells of patients diagnosed with MDS and ICUS, and to analyze changes in the expression pattern of microRNAs by RT-PCR in cells of BM for adults and children with MDS. In adults, the microRNAs miR29a, miR20a, miR181a, miR19b, miR21, miR155, miR146, miR22, miR193, miR26a and miR29b were tested, and in children, microRNAs miR193, miR29b miR22 and miR26a. The methylation pattern of the *SOX17* gene was analyzed in 26 patients with MDS and in 15 patients with ICUS. The hypermethylation of the *SOX17* promoter region was identified in 57.7% of the individuals with MDS and in 53.3% of those with ICUS, suggesting that the silencing of *SOX17* can be a frequent event and participate in the initial course of these diseases. MicroRNAs were analyzed in 55 adult MDS patients and in 8 healthy controls. Among the 12 microRNAs tested in MDS adults, seven presented an abnormal expression pattern in relation to the control group, and of the four microRNAs investigated in 28 children with MDS, miR193 and miR29b presented decreased expression in relation to the control group in approximately 70% of the analyzed patients and miR22 expression was higher in more than half of the analyzed samples, whereas diminished expression of miR26a was observed in 28 (100%) of the patients analyzed. Considering that the studied microRNAs may act as regulators of hematopoiesis, the data reveal the importance of microRNAs in the etiology of MDS, suggesting these as possible diagnostic biomarkers and prognostic of adult and infant MDS.

Keywords: myelodysplasia, epigenetics, gene expression, microRNA

Lista de Figuras

- Figura 1.** Classificação das SMDs segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), revisada em 2016..... **14**
- Figura 2.** MicroRNAs, entre outros elementos reguladores, já propostos como envolvidos na regulação de diferentes etapas da hematopoese, a partir das células tronco (BISSELS, 2012)..... **17**

Lista de Tabelas

Tabela 1. Função de microRNAs, de acordo com sua atuação em tecidos normais.....	18
Tabela 2. Sequência dos <i>primers</i> específicos utilizados na investigação da metilação da região promotora do gene <i>SOX17</i>	27
Tabela 3. Protocolo de reação para a síntese de cDNA. Os <i>primers RT</i> se referem à microRNAs específicos.....	29
Tabela 4: Protocolo de ciclagem da reação de síntese de cDNA.....	29
Tabela 5: Protocolo de reação para análise da expressão dos microRNAs.....	30
Tabela 6: Protocolo de ciclagem da etapa de expressão dos microRNAs.....	30

Sumário

	RESUMO.....	i
	ABSTRACT.....	ii
1	INTRODUÇÃO.....	13
2	OBJETIVOS.....	20
3	MATERIAL E MÉTODOS.....	22
3.1	Casuística.....	23
3.2	Métodos.....	24
3.2.1	Análise Citogenética.....	24
3.2.1.1	Obtenção de Células da medula óssea e cultivo celular.....	24
3.2.1.2	Bandamento GTG.....	25
3.2.2	Estudo Molecular.....	25
3.2.2.1	Extração de DNA.....	25
3.2.2.2	Conversão do DNA por bissulfito de sódio.....	26
3.2.2.3	MSP-PCR.....	27
3.2.2.4	Extração de RNA.....	28
3.2.2.5	Síntese de RNA específico.....	28
3.2.2.6	Análise da expressão dos microRNAs específicos por PCR quantitativa em Tempo Real.....	30
4	RESULTADOS.....	31
4.1	CAPÍTULO 1 Different expression pattern of miR126, miR29a, miR20a, miR19b, miR21, miR22 and miR193 in diagnoses of Myelodysplastic Syndrome.....	33
4.2	CAPÍTULO 2 Different expression pattern of miR126, miR29a, miR20a, miR19b, miR21, miR22 and miR193 in diagnoses of Myelodysplastic Syndrome.....	44
4.3	CAPÍTULO 3 Análise da Expressão dos microRNAs miR29b, miR193, miR22 e miR26a em Pacientes com SMD Infantil.....	58
5	CONCLUSÕES.....	72
6	REFERÊNCIAS.....	74

1. INTRODUÇÃO

Síndromes Mielodisplásicas (SMDs) referem-se a um grupo de doenças com alterações clonais de células hematopoéticas caracterizado por citopenias, displasia em uma ou mais linhagens celulares mielóides e hematopoese ineficaz, que conferem risco alto para o desenvolvimento de leucemia mielóide aguda (LMA). A percentagem de doentes que progridem para LMA varia substancialmente, de acordo com o subtipo da doença. A maioria das SMDs se caracteriza pela falência progressiva da medula óssea (MO), mas o curso biológico em alguns casos é prolongado e indolente, com baixa evolução para LMA (GIDARO et al., 2016; YUN et al. 2016; ARBER et al., 2018).

As SMDs mais frequentes em pacientes idosos, entre 65 e 70 anos de idade. A incidência na população em geral é de aproximadamente cinco casos por 100.000 pessoas por ano, mas após 60 anos eleva até 50 casos por 100.000. Tal incidência pode ser maior, se for considerado que a longevidade populacional está aumentando e é uma preocupação em saúde pública, associada diretamente ao índice de desenvolvimento de alguns países (GINARO et al., 2016 ; ZINI, 2017).

No entanto, as SMDs também podem afetar crianças e adolescentes até 18 anos (ZINI, 2017). Esta situação define a SMD infantil, cuja incidência é de aproximadamente 1-8 crianças por milhão, por ano. É considerada uma doença rara, que representa <5% das neoplasias hematopoéticas da infância (LOCATELLI, STRAHM, 2018).

As SMDs são divididas em subtipos e a classificação mais utilizada é a da Organização Mundial da Saúde (OMS), revisada em 2016, que considera seis subtipos: SMD com displasia de linhagem única, SMD com displasia em multilinhagem, SMD com sideroblasto em anel, que inclui os dois subtipos (displasia de linhagem única e displasia de multilinhagem), SMD com del(5q) isolada, SMD com excesso de blastos e SMD inclassificável (ARBER, 2016). A Figura 1 apresenta a classificação destas doenças segundo a revisão mais recente da OMS.

SMDs também são denominadas primárias, ou *de novo*, e secundárias. Estas últimas são originadas a partir do tratamento de outras doenças, realizado com quimioterapia e/ou radioterapia. Os fatores etiológicos são desconhecidos, mas entre os sugeridos estão exposição ao benzeno e outros solventes, óleo diesel, pesticidas, fumaças e uso de imunossupressores (GIDARO, 2016).

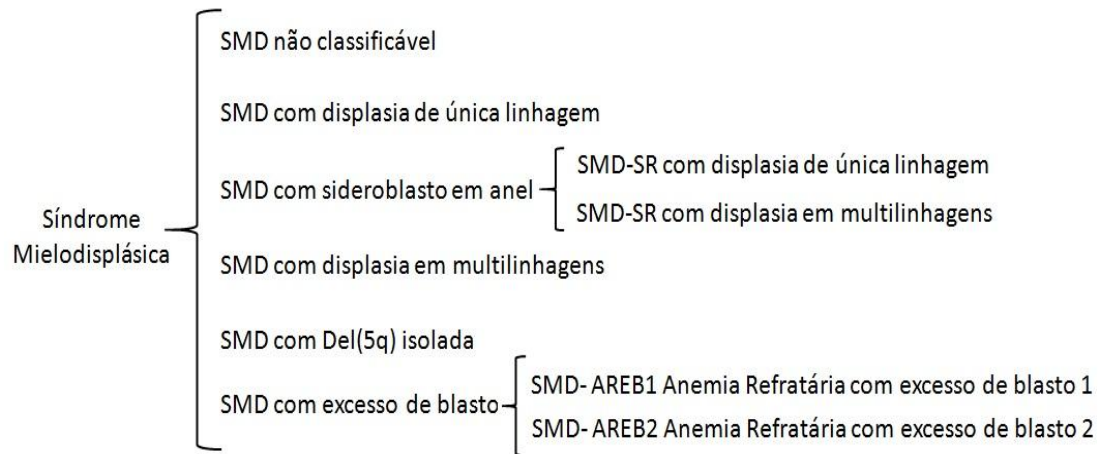


Figura 1. Classificação das SMDs segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), revisada em 2016.

SMDs também são denominadas primárias, ou *de novo*, e secundárias. Estas últimas são originadas a partir do tratamento de outras doenças, realizado com quimioterapia e/ou radioterapia. Os fatores etiológicos são desconhecidos, mas entre os sugeridos estão exposição ao benzeno e outros solventes, óleo diesel, pesticidas, fumaças e uso de imunossupressores (GIDARO, 2016).

O diagnóstico é concluído com base no estudo morfológico das células da MO, pelos achados do mielograma e da biópsia da medula, estudo citogenético e análise molecular para investigação de mutações específicas. Características como porcentagem de blastos, citopenias e anormalidades citogenéticas compõe atualmente o escore de risco denominado *International Prognostic Scoring System - IPSS*, que auxilia a categorização de risco, de acordo com as condições biológicas apresentadas pelos pacientes (GREENBERG, 2012; CIABATTI, 2017).

Alterações citogenéticas específicas podem ser observadas em 30-50% dos casos de SMDs *de novo*. As mais frequentes são as deleções e as alterações numéricas, que são observadas em cerca de 50% e de 10% dos casos, respectivamente. Nas SMDs secundárias aproximadamente 80% dos casos apresentam alterações cromossômicas de diversos tipos (MACEDO, 2015).

Nas SMD *de novo* os cromossomos 5, 7, 8, e 20 aparecem alterados com maior frequência e cada um deles influencia de maneira específica a clínica do paciente. As deleções são geralmente intersticiais e ocorrem com maior frequência em 5q, 7q, 20q, 11q, 13q, 12p e 17p. As perdas de cromossomos inteiros mais comuns envolvem os cromossomos 5, 7 e Y (MACEDO, 2015; GIDARO, 2016). As alterações podem ocorrer como anormalidades isoladas, ou combinando duas ou mais, determinando um cariótipo complexo (SCHANZ,

2012). Embora as translocações equilibradas sejam alterações relativamente comuns em doenças mielóides, como em LMA, em SMDs são raras, sendo observadas em cerca de 4% dos casos (TIAN, 2011).

Entretanto, embora a citogenética desempenhe um papel importante no diagnóstico e prognóstico de pacientes com SMD mais da metade dos pacientes apresentam cariótipos normais e, em alguns casos, pacientes com as mesmas anormalidades cromossômicas podem ser clinicamente heterogêneos (SONG, 2017).

Estudos recentes demonstram que as alterações genéticas e/ou moleculares estão presentes em mais de 80% dos pacientes diagnosticados com SMDs. Diversas mutações pontuais, deleções e alterações epigenéticas têm sido observadas envolvendo oncogenes e genes supressores de tumor. Mutações pontuais no gene *NRAS* (15-20% dos casos), duplicações em *tandem* no *FLT3* (5% dos casos), metilação do promotor do *p15* (30-50% dos casos), deleção e inativação do *TP53* (5-10% dos casos) e mutações *missense* no *RUNX1(AML1)* são frequentemente observadas em SMDs (OLIVEIRA, 2009; SHIH, LEVINE, 2011; MOYO, SAVONA, 2016).

As SMDs são consideradas exemplos de doenças epigenéticas, uma vez que se caracterizam por proliferação celular aumentada e diferenciação celular anômala, processos biológicos que dependem da metilação específica e altamente controlada de alguns genes, cuja expressão alterada resultaria na falência da MO e progressão para LMA (ISSA, 2013).

Por exemplo, a expressão alterada e o padrão de metilação anormal do gene SRY-box gene 17 (*SOX17*) já foram observados em vários tumores sólidos, entretanto, dados recentes mostraram que pacientes com LMA, com cariótipo normal e baixa expressão de *SOX17* apresentam uma sobrevida menor em relação àqueles com alta expressão deste gene (TANG et al., 2014). O *SOX17* é um supressor de tumor membro da família de genes SOX. Expressa uma proteína presente em diferentes células e tecidos, e em várias fases do desenvolvimento, com sua função associada à regulação negativa da proteína de adesão beta-catenina (BALGKOURANIDOU, 2016). Mas há apenas um estudo na literatura sobre o padrão de metilação do *SOX17* em SMD, que revelou um padrão anormal, que parece ser um dos primeiros eventos envolvidos na patogênese da doença (FAN, 2014).

A expressão alterada e o padrão de metilação do gene *SOX17* poderiam definir fatores de diagnóstico e prognóstico importantes para pacientes com SMDs e LMA, especialmente com citogenética normal, mas são necessários outros estudos para esclarecer tais propostas.

Outro aspecto atualmente muito estudado em câncer é a participação dos microRNAs (miRNAs), que atuam como reguladores epigenéticos e podem ser utilizados como biomarcadores diagnósticos ou alvos terapêuticos no câncer (KUANG, 2016; HERSHKOVITZ-ROKAH, 2018).

São pequenas moléculas de RNA, de sequências curtas, com aproximadamente 19-22 nucleotídeos, não-codificantes, capazes de regular a expressão gênica. Eles influenciam na expressão de maneira dinâmica e funcionam como importantes mediadores na diferenciação celular (NGANKEU, 2018). O micro se liga à região 3'(3'UTR) do RNA mensageiro (mRNA) e, ocorrendo complementaridade, o RNA mensageiro é clivado e degradado. Assim, é capaz de silenciar o gene alvo (HERSHKOVITZ-ROKAH, 2018).

A análise da expressão e função de microRNAs durante a hematopoese tem demonstrado detalhes complexos sobre a ação desses elementos neste processo. Desempenham papel fundamental na diferenciação, proliferação celular e apoptose, regulando a tradução de proteínas-alvo (ERDOGAN et al. 2011; KUANG, 2016). A Figura 2 mostra um esquema representativo dos miRNAs propostos como reguladores de diferentes etapas da hematopoese, identificados principalmente a partir de ensaios *in vitro* com células humanas (BISSELS, 2012).

A expressão alterada de vários microRNAs e, conseqüentemente, do produto do seu gene alvo, já foi verificada em alguns tipos de câncer e neoplasias hematológicas. Os micros se expressam no tecido neoplásico diferentemente do tecido normal. Entre os candidatos estão incluídos: miR126, miR29a, miR29b, miR20a, miR181a, miR19b, miR21, miR155, miR146, miR22, miR193 e miR26a (FU, 2013; SONG, 2013; KIRIMURA, 2016; CHOI, 2017; HERSHKOVITZ-ROKAH, 2018; LIU, 2018; NGANKEU, 2018). A expressão de miR19b e miR193 já foi investigada em malignidades hematológicas, mas não em SMD (GAO, 2011; LI, 2013; ZHANGA, 2018). A Tabela 1 apresenta as funções destes microRNAs em células normais.

Atualmente são considerados elementos que podem contribuir para o desenvolvimento da SMD, podendo ser utilizados como biomarcadores de diagnóstico e prognóstico, direcionamento terapêutico, esclarecimento da etiologia e evolução dessas afecções. Inclusive, muitos trabalhos tem analisado o prognóstico de pacientes com cariótipo normal das células da medula óssea, com objetivo de buscar fatores prognósticos independentes, entre os quais microRNAs específicos (HERSHKOVITZ-ROKAH, 2018).

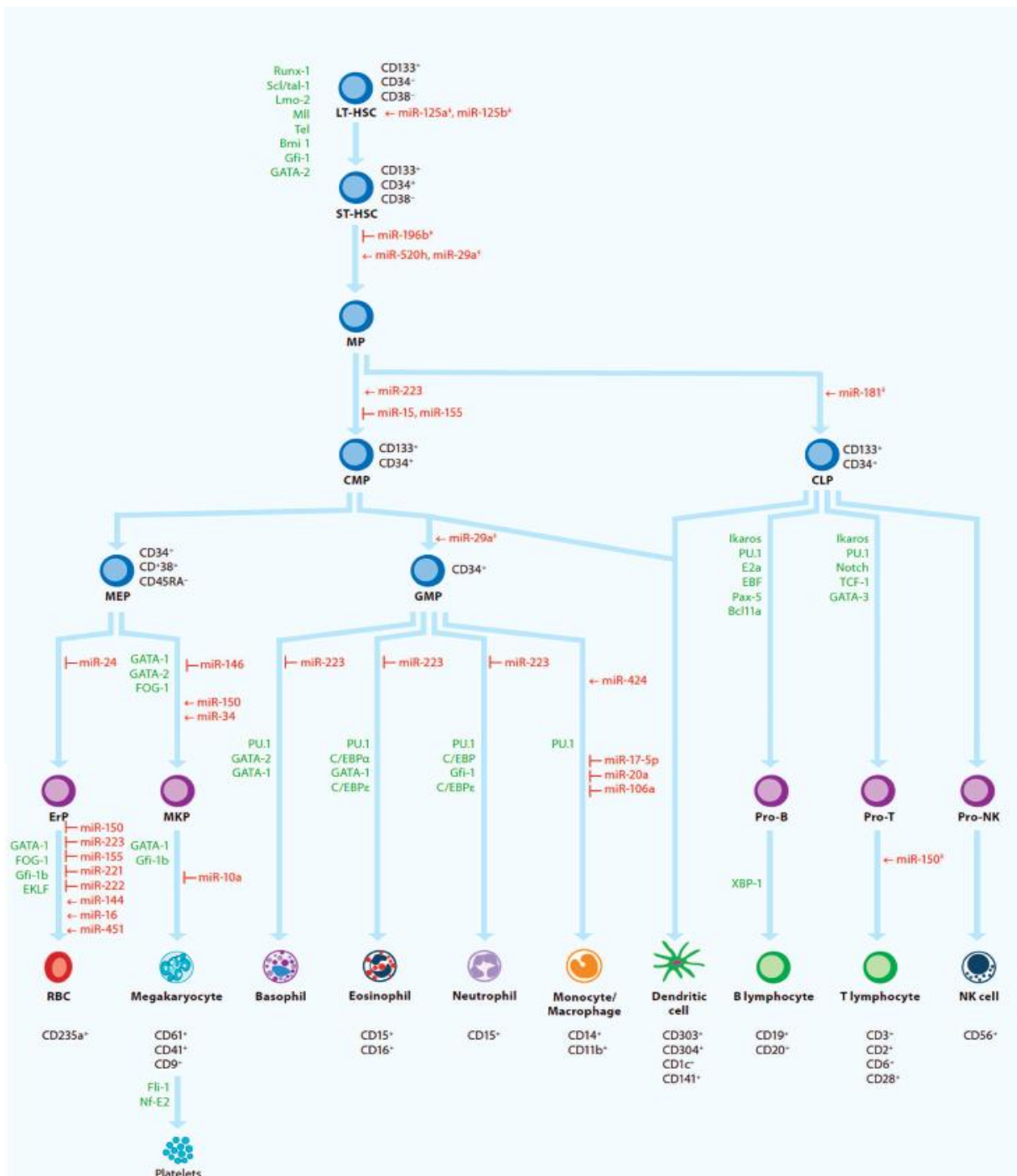


Figura 2. MicroRNAs, entre outros elementos reguladores, já propostos como envolvidos na regulação de diferentes etapas da hematopoese, a partir das células tronco (BISELIS, 2012).

Tabela 1. Função de microRNAs, de acordo com sua atuação em tecidos normais.

microRNA	Gene alvo	Função	Localização	Referência
miR126	<i>HOXA9</i>	Angiogênese e megacariocitopoese.	9q34.3	<i>Choi, 2017</i>
miR29a	<i>DNMTs</i> e <i>KIT</i>	Diferenciação e viabilidade celular.	7q32.3	<i>Kirimural, 2016</i>
miR29b	<i>DNMTs</i> e <i>KIT</i>	Crescimento, proliferação e apoptose.	7q32.3	<i>Kirimural, 2016;</i> <i>Ngankeu, 2018</i>
miR20a	<i>E2F1</i>	Regulação do ciclo celular	13q31.3	<i>Hershkovitz-Rokah, 2018</i>
miR181a	<i>LC3</i> e <i>ATG5</i>	Diferenciação mielóide	1q32.1	<i>Liu, 2018</i>
miR19b	<i>PTEN</i>	Oncogene	13q31.3	<i>Zhanga, 2018</i>
miR21	<i>PDCD4</i>	Ativa o fator de crescimento β	17q23.1	<i>Choi, 2017</i>
miR155	<i>SHIP-1</i>	Oncogene	21q21.3	<i>Choi, 2017</i>
miR146	Receptor α	Regulador da eritropoese	5q33.3	<i>Choi, 2017</i>
miR22	<i>Tet2</i>	Hematopoese	17p13.3	<i>Song, 2013</i>
miR193	<i>DNMT3A</i> e <i>PTEN</i>	Diferenciação celular	17q11.2	<i>Gao, 2011;</i> <i>Li, 2013</i>
miR26a	<i>Tet2</i> e <i>PTEN</i>	Tumor supressor	3p22.2	<i>Fu, 2013</i>

Além disso, recentemente, os pacientes com citopenia(s) persistente(s), com duração maior do que seis meses, e ausência de critérios diagnósticos para SMD, estão sendo classificados como portadores de Citopenia Idiopática de Significado Indeterminado (ICUS). ICUS foi definida como uma anormalidade hematológica não clonal e os fatores etiológicos, especialmente genéticos, não estão esclarecidos (MOYO, 2016). Mas alguns estudos já mostraram que a presença de mutações somáticas adicionais pode estar associada à progressão dos pacientes diagnosticados com ICUS para uma neoplasia mielóide, no entanto, os processos intermediários entre a ocorrência da citopenia e a progressão neoplásica não estão esclarecidos.

Neste contexto, a hipótese científica que foi testada neste trabalho é de que o padrão de metilação do gene *SOX17* em indivíduos adultos com SMD e ICUS, o padrão de expressão de miR126, miR29a, miR29b, miR20a, miR181a, miR19b, miR21, miR155, miR146, miR22, miR193 e miR26a em adultos com SMD, e dos micros miR22, miR193, miR26a e miR29b

em SMD infantil, ao diagnóstico, estão alterados. Além disso, que os achados podem estar potencialmente envolvidos com a origem da doença, classificação prognóstica e evolução para LMA.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Investigar em células da medula óssea, ao diagnóstico, o padrão de metilação do gene *SOX17* em indivíduos com SMD e ICUS e a presença de alterações na expressão de microRNAs específicos em SMD manifestada na fase adulta e infantil, na tentativa de estabelecer uma possível associação dos achados com a etiologia e o risco para desenvolvimento de leucemia aguda.

2.2 Objetivos específicos:

- 1- Avaliar o padrão de metilação da região promotora do gene *SOX17*, por MSP-PCR, em células da medula óssea de indivíduos com SMD, ao diagnóstico, sem tratamento prévio;
- 2- Investigar o padrão de metilação da região promotora do gene *SOX17*, por MSP-PCR, em células da medula óssea de indivíduos com ICUS, ao diagnóstico, sem tratamento prévio;
- 3- Estudar a expressão dos microRNAs miR126, miR29a, miR29b, miR20a, miR181a, miR19b, miR21, miR155, miR146, miR22, miR193 e miR26a, por RT-PCR, em células da medula óssea de indivíduos com SMD ao diagnóstico, sem tratamento prévio, comparados com controles saudáveis;
- 4- Analisar a expressão dos microRNAs miR29, miR193, miR22 e miR26a, por RT-PCR, em indivíduos diagnosticados com SMD infantil, comparados com controles saudáveis;
- 5- Obter dados dos doentes, pela análise de prontuários médicos, na tentativa de tentar estabelecer uma possível associação entre a classificação de risco e os achados do presente estudo.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Casuística

Este estudo, descritivo e prospectivo, foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto – CEP/FAMERP (nº 37509814.4.0000.5415).

Para atingir os objetivos propostos foram estudadas células da MO de indivíduos que compuseram quatro grupos: um de pacientes com SMD, para análise do padrão de metilação do gene *SOX17*; um com pacientes que apresentavam ICUS, para análise do padrão de metilação do gene *SOX17*; um de adultos com SMD, para análise da expressão de microRNAs e outro composto por pacientes diagnosticados com SMD infantil, para análise da expressão de microRNAs. Os indivíduos foram investigados ao diagnóstico, antes da realização de qualquer tipo de tratamento.

Para análise do padrão de metilação do gene *SOX17* foram estudados 26 indivíduos com SMD (14 do sexo masculino e 12 do sexo feminino, com média de idade de 57, 82 - 8 a 83 anos) e 15 pacientes com ICUS (10 do sexo masculino e 5 do sexo feminino, com média de idade de 53,41 - 9 a 79 anos), todos atendidos no Serviço de Hematologia e Hemoterapia do Hospital de Base de São José do Rio Preto (Hemocentro), onde foi realizado o estudo molecular e citogenético.

O estudo dos microRNAs foi realizado em 55 pacientes adultos com SMD (35 do sexo masculino e 20 do sexo feminino, com média de idade de 79,86 – 62 a 98 anos) e em oito amostras de controles saudáveis, todos atendidos no Serviço de *Hematologia da Università Politecnica Delle Marche (Ancona, Itália)*, sob supervisão da Dra. Antonella Polloni, de acordo com Bolsa Programa Doutorado Sanduiche no Exterior, no período de Abril a Setembro. Os pacientes deste grupo foram classificados quanto ao escore de risco de acordo com o IPSS-R (GREENBERG, 2012) - 36 pacientes obtiveram classificação de SMD de baixo risco e 19 de SMD de alto risco.

Além disso, o estudo de microRNAs em crianças e adolescentes incluiu amostras de 28 pacientes diagnosticados com SMD infantil (13 do sexo masculino e 15 do sexo feminino, com média de idade de 8,28 – 01 a 15 anos) e de 10 controles saudáveis atendidos no Hospital do Câncer de Barretos, sob supervisão do Dr. Daniel Onofre Vidal.

Foram incluídos no estudo indivíduos com diagnóstico concluído de ICUS e de SMD primária (*de novo*), de qualquer subtipo, de acordo com a classificação da OMS, ao

diagnóstico, sem tratamento quimio e/ou radioterápico prévio. Pacientes que não assinaram o termo de consentimento, que apresentaram SMD secundária a tratamento ou que apresentavam outras neoplasias, foram excluídos.

A coleta do material foi realizada pela própria equipe médica de cada um dos serviços de hematologia, de acordo com seus critérios, em procedimento de rotina aos quais os pacientes são necessária e rotineiramente submetidos para diagnóstico hematológico. Os estudos foram realizados com parte das amostras coletadas. Portanto, nenhum procedimento extra foi realizado para atender apenas aos objetivos deste trabalho.

Os dados clínicos laboratoriais e de ocorrência de leucemia na evolução das doenças foram obtidos por consulta aos prontuários médicos dos pacientes dos três hospitais de onde os mesmos eram procedentes.

O diagnóstico e a classificação das SMD foram realizados sob responsabilidade da equipe de hematologistas que acompanhavam os pacientes. Todas as dúvidas sobre o curso clínico ou interpretação de exames foram sanadas com pelo menos dois hematologistas das equipes colaboradoras.

A partir dos dados clínicos laboratoriais, os pacientes foram classificados em SMD de alto ou baixo risco, de acordo com os critérios do escore denominado *International Prognostic Scoring System - IPSS*, que auxilia a categorização de risco, de acordo com as condições biológicas apresentadas pelos pacientes (GREENBERG, 2012).

3.2 Métodos

3.2.1 Análise Citogenética

3.2.1.1 Obtenção de células da medula óssea e cultivo celular

Uma vez que a presença de alterações cromossômicas clonais nas células da MO foi um critério de exclusão neste estudo, todas as amostras foram submetidas ao estudo citogenético prévio.

As células da MO (do osso esterno ou ilíaco) foram obtidas por punção aspirativa com seringa, de acordo com procedimento médico padronizado.

Para cada paciente foram realizadas culturas de curta duração (24 horas) de células da MO sem estimulação mitogênica (sem fito-hemaglutinina – PHA), e montados pelo menos dois frascos de cultura, cada um contendo 5,0 ml de meio RPMI 1640, 2,0 ml de soro fetal

bovino, 02 gotas de estreptomicina (100U/ml), 04 gotas de penicilina (100U/ml) e de 03 a 10 gotas do material biológico. Os frascos foram mantidos em estufa a 37°C por cerca de 24 horas e aproximadamente 20 minutos antes do término deste tempo, foram adicionados 100µl de Colchicina (5µl/ml).

Após o cultivo, o material foi centrifugado por 08 minutos a 1.000rpm e o sobrenadante foi retirado. Em seguida, foi realizada a hipotonização com a adição lenta de 10ml de solução hipotônica de KCl (0,075M), a 37°C. Após 20 minutos, o material foi novamente centrifugado, o sobrenadante removido e, então, foi realizada a fixação com metanol:ácido acético (3:1) em três etapas de 20, 10 e de 05 minutos. Na primeira etapa foram adicionados 10ml de fixador e nas demais 5ml, alternadas com centrifugações a 1.000rpm por 08 minutos.

Finalmente, parte do material obtido dos pacientes ao diagnóstico foi gotejada em lâminas úmidas e geladas, envelhecidas por 20 minutos em estufa a 87°C e, posteriormente, submetidas à técnica de bandamento GTG para ser analisada.

3.2.1.2 Bandamento GTG

A análise citogenética foi realizada em metáfases submetidas à técnica convencional de bandamento GTG segundo GROUCHY & TURLEAU (1984), com modificações, de acordo com protocolo do Laboratório de Genética (FAMERP/FUNFARME). O material fixado nas lâminas foi tratado em solução de tripsina (60mL de PBS e, aproximadamente, 0,12g de tripsina), por um tempo variável de 02 a 15 segundos. Em seguida, foi lavado em PBS por 01 minuto, corado com solução tamponada de Giemsa a 2% por 05 minutos e lavado em água.

As metáfases foram analisadas em microscópio com aumento de 1.200 vezes e todas as análises foram conferidas pela orientadora do projeto.

Os cariótipos foram descritos conforme normas contidas na An International System for Human Cytogenomic Nomenclature (ISCN, 2016) e fotografados.

3.2.2. Estudo Molecular

3.2.2.1 Extração de DNA

O DNA genômico de cada indivíduo foi obtido a partir das células da MO, segundo a técnica descrita por Miller, et al (1998), com modificações. O volume de 1-3ml de MO foi

coletado em tubo *vacutainer* com EDTA. Em um tubo de polipropileno de 15ml foram adicionados 3,5ml de FICOLL PAQUE e 1-3ml de MO, transferido com pipeta Pasteur descartável, pela parede do tubo.

O material foi centrifugado por 30 minutos a 3.500rpm. O sobrenadante foi retirado e desprezado, o material foi transferido com pipeta Pasteur descartável para outro tubo e o volume de 15ml foi completado com PBS1X. Nova centrifugação foi realizada a 3.500rpm por 12 minutos. O sobrenadante foi retirado com pipeta Pasteur descartável, o “pellet” foi ressuspenso e novamente completado o volume de 15ml com PBS1X. O material foi centrifugado a 3.500rpm por 12 minutos e o sobrenadante recolhido com pipeta descartável.

O “pellet” foi ressuspenso novamente e em seguida foram adicionados 1ml de PBS1X, 3ml de Lysis Buffer, 0,2ml de SDS 10%, 50µl de proteinase K (20mg/ml) e 40µl de RNase (20mg/ml). O material foi agitado e incubado à 37°C *overnight*.

Ao “pellet” foi acrescentado 1ml de NaCl 6M saturado. O tubo foi agitado vigorosamente até formar espuma e colocado no gelo por 15 minutos. O material foi novamente agitado e centrifugado a 3.500rpm por 15 minutos. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo de 15ml e completado com 10ml de etanol absoluto gelado, para a precipitação do DNA.

O tubo foi invertido delicadamente até a visualização do DNA precipitado, em forma de fios brancos enovelados. O DNA foi “pescado” e colocado em um *eppendorf* de 1,5ml com 500µl de etanol 70% gelado. O material foi centrifugado a 14.000rpm por três minutos, o etanol 70% descartado e o tubo deixado em repouso por 15 minutos. O DNA foi diluído em água estéril e incubado a 37°C por três a quatro dias para diluição. Após este período, o material foi dividido em alíquotas e estocado a -20°C.

A estimativa da concentração de DNA foi realizada pela leitura em espectrofotômetro *NanoDrop ND 1000*.

3.2.2.2 Conversão do DNA por bissulfito de sódio

Após a determinação da concentração por espectrofotometria, as amostras de DNA foram submetidas ao tratamento com bissulfito de sódio, para ocorrer a conversão de citosina em uracila.

Dessa forma, o DNA (2µg) de cada amostra foi desnaturado pela adição de 1µL de Herring Sperm DNA (10mg/mL) e 2µL de NaOH (3M), e incubado a 50°C por 20 minutos.

Subsequentemente, o DNA foi tratado pela adição de 500µL da solução de bissulfito de sódio (2,5M)/hidroquinona (1M) e aquecido a 70°C durante 03 horas em ambiente escuro. Após este tratamento, foi utilizado o kit Wizard clean up (Promega) para purificação do DNA.

Na etapa seguinte, o DNA foi precipitado com 5µL de NaOH (3M), 75µL de acetato de amônio (5M), 350µL de etanol absoluto gelado e 1µL de glicogênio (20mg/mL), e incubado a -20°C durante 16 horas. Após a precipitação, as amostras foram centrifugadas por 15 minutos a 15.000 rpm em centrífuga refrigerada. O sobrenadante foi descartado e a ele foram adicionados 500µL de etanol a 70% gelado. O DNA foi centrifugado novamente, o etanol removido e os tubos devidamente invertidos, na bancada, para secar o “pellet”. O DNA foi, então, ressuspendido em 40µL de água MilliQ autoclavada.

3.2.2.3 MSP-PCR

Após a conversão por bissulfito de sódio e purificação do DNA, foi realizada uma PCR em duas reações separadas, com dois pares de oligonucleotídeos diferentes, um par para sequência metilada e um par para sequência não metilada.

Os *primers* específicos utilizados, descritos previamente (ZHANG et al, 2008; Balgkouranidou et al, 2013), os genes alvo e sua função estão apresentados na Tabela 2.

Tabela 2: Sequência dos *primers* específicos utilizados na investigação da metilação da região promotora do gene *SOX17*.

Gene	Sequências de oligonucleotídeos
<i>SOX17-M forward</i>	5'CAAAAACGAATCCCGTATCCGACG-3'
<i>SOX17-M reverse</i>	5'-ACTCACGTACATAATAACGAAAATCCG-3'
<i>SOX17-U forward</i>	5'-CAAACCAAAAACAAATCCCATATCCAACA-3'
<i>SOX17-U reverse</i>	5'-GATTTTGTGTTAGTTGTTTGTGTTT-3'

Os produtos de amplificação foram submetidos à eletroforese em gel de poliacrilamida a 8%, para verificar o tamanho do produto amplificado e avaliar o padrão de metilação do gene *SOX17*. Após a corrida eletroforética, o gel foi corado com nitrato de prata.

Em uma primeira etapa, o gel foi fixado em uma solução contendo etanol a 10% e ácido acético glacial 0,75%, por 10 minutos, sob agitação leve e constante. Em seguida foi

adicionada solução de nitrato de prata por 10 minutos, também sob agitação constante, e realizada uma lavagem com água destilada, para a retirada do excesso de prata. Por fim, uma solução contendo hidróxido de sódio a 3% e 0,3% de formaldeído foram adicionadas sob agitação constante do gel, por tempo suficiente para que as bandas fossem visualizadas.

O estado de metilação foi inferido pela presença e ausência de produtos de amplificação obtidos com os *primers* específicos, respectivamente, para a condição metilado e não metilado.

O DNA de linfócitos normais foi utilizado como controle positivo na análise da metilação.

3.2.2.4 Extração de RNA

A extração de RNA foi realizada utilizando-se o reagente TRIzol® (Invitrogen), na proporção de 1mL de TRIzol® por 5-8x o volume de plasma. Nos procedimentos de manipulação de RNA, as devidas e fundamentais precauções foram tomadas para evitar a contaminação e degradação por RNAses.

O plasma em TRIzol foi agitado em um vórtex e incubado entre 3-5 minutos à temperatura ambiente. Para separar as fases orgânica e aquosa foram adicionados 200ml de clorofórmio e realizada incubação por 03 minutos à temperatura ambiente após agitação manual. A amostra foi centrifugada a 12.000 rpm por 10 minutos, a 4°C.

A fase aquosa foi transferida para um tubo novo e o RNA foi precipitado mediante a adição de 500ml de álcool isopropílico. A amostra foi incubada por 1-12 horas a -20°C, seguida da centrifugação a 12.000rpm por 10 minutos, a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o RNA, em forma de pellet, foi lavado com 1,0ml de etanol a 75% gelado. A amostra foi, então, centrifugada a 7.500rpm por 10 minutos, a 4°C. Em seguida, o RNA foi colocado para “descansar” por 10 a 20 minutos à temperatura ambiente e em seguida foi solubilizado em 12ml de H₂O ultrapura.

A avaliação quantitativa foi feita por leitura espectrofotométrica e em seguida o RNA foi armazenado a -70°C.

3.2.2.5 Síntese de RNA específico

Após a extração do RNA foi realizada a etapa de síntese do cDNA com a utilização do kit *High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit* (Applied Biosystems), seguindo as recomendações do fabricante quanto ao protocolo de reação e ciclagens.

Os *mixes* de reação continham, além dos reagentes necessários para processo de síntese de cDNA, os *primers* específicos para as sondas TaqMan de microRNAs. A Tabela 3 apresenta o protocolo de reação utilizado na etapa de síntese de cDNA e a Tabela 4 refere-se à ciclagem da reação. Após a ciclagem, as amostras de cDNA foram armazenadas em freezer -20°C para posterior utilização nas análises de expressão dos microRNAs.

Tabela 3: Protocolo de reação para a síntese de cDNA. Os *primers RT* se referem a microRNAs específicos.

Reagentes	Volume (uL)
Água <i>Nuclease free</i>	14,274uL
Tampão (10x RT)	2,5uL
dNTPs	0,25uL
Inibidor de RNase	0,316uL
Primer RT	1,0uL
<i>MultiScribe Reverse Trnascriptase</i>	1,66uL
RNA (50ng/uL)	1,0uL
Volume da reação	25uL

Tabela 4: Protocolo de ciclagem da reação de síntese de cDNA.

Etapa	Temperatura (°C)	Tempo (minutos)
Hold	16°C	30 min
Hold	42°C	30 min
Hold	85°C	5 min
Hold	4°C	∞

3.2.2.6 Análise da expressão dos microRNAs específicos por PCR quantitativa em Tempo Real (qRT-PCR)

Para a análise de expressão dos microRNAs, as reações foram feitas em duplicata e triplicata, utilizando-se como sistema de detecção o sistema TaqMan[®] MiRNA assay (Invitrogen, Life Technologies), que apresenta uma sonda que reconhece sequências específicas em fragmentos de PCR. Durante a RT-PCR a sonda TaqMan foi hibridizada com a sequência da fita simples complementar ocorrendo a amplificação. O equipamento utilizado foi o 7500 Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems). A Tabela 5 apresenta o protocolo de reação utilizado para a análise da expressão dos microRNAs selecionados e a Tabela 6 mostra a ciclagem referente ao processo.

Tabela 5: Protocolo de reação para análise da expressão dos microRNAs.

Reagente	Volume (uL)
<i>TaqMan Universal PCR Master Mix</i>	5,0uL
<i>Água Nuclease free</i>	2,5uL
<i>TaqMan[®] microRNA assay</i>	0,5uL
cDNA	2,0uL
Volume da reação	10,0uL

Tabela 6: Protocolo de ciclagem da etapa de expressão dos microRNAs.

Etapa	Temperatura (°C)	Tempo
Início	95 °C	10 min
40 ciclos	95 °C	15 seg
	60 °C	1 min

Os resultados da expressão foram analisados a partir da curva de amplificação gerada pela emissão de fluorescência, utilizando os valores de CT (*threshold cycle*). O valor de CT é a intersecção entre uma curva de amplificação e uma linha de limiar (*threshold*), que corresponde a uma medida relativa da concentração da sequência alvo na reação de PCR, sendo CT inversamente proporcional ao nível de expressão relativa original do fragmento de interesse.

4. RESULTADOS

Os resultados obtidos resultaram em três artigos científicos, aqui apresentados como capítulos.

O artigo intitulado “Abnormal methylation pattern of *SOX17* in myelodysplastic syndromes and in idiopathic cytopenia of undetermined significance”, apresentado no Capítulo 1, refere-se aos achados correspondentes ao estudo da metilação do *SOX17* em SMD e em ICUS, relacionados aos objetivos específicos 1 e 2.

Os resultados vinculados aos objetivos específicos 3 e 5 estão apresentados no Capítulo 2, também na forma de um artigo que foi intitulado “Abnormal Expression of miR126, miR29a, miR20a, miR19b, miR21, miR22 and miR193 in Myelodysplastic Syndrome”.

A investigação do padrão de expressão de microRNAs em SMD infantil resultou no artigo intitulado “Análise da Expressão dos microRNAs miR29b, miR193, miR22 e miR26a em Pacientes com SMD Infantil” que atende ao objetivo 4 e está apresentado no Capítulo 3.

As discussões e conclusões específicas de cada assunto também constam nos artigos referidos.

Original Article

Abnormal methylation pattern of *SOX17* in myelodysplastic syndromes and in idiopathic cytopenia of undetermined significance

Fernanda de Souza Monteiro¹; Andrea Borduchi Carvalho-Salles²; Otávio Ricci Junior³;
Agnes Cristina Fett-Conte⁴

1Biology Department, Institute of Biosciences, Language and Exact Sciences, Paulista State University (IBILCE/UNESP), São José do Rio Preto, São Paulo, Brazil.

2Laboratory of Genetics, Hospital de Base (FUNFARME), São José do Rio Preto, São Paulo, Brazil

3Medicine Department, Medical School in São José do Rio Preto (FAMERP/FUNFARME), São Paulo, Brazil.

4Molecular Biology Department, Medical School in São José do Rio Preto (FAMERP/FUNFARME), São Paulo, Brazil

E-mail: fernandasmonteiorbio@gmail.com

Phone number: (017) 98111-9415

Address: Prof. Francisco Felipe Caputo, 980

Jd Nazareth, São José do Rio Preto, SP, CEP: 15054-030

Abstract

Myelodysplastic syndromes (MDS) are a group of genetic diseases of clonal bone marrow (BM) neoplasms. Persistent cytopenia for more than six months without diagnostic criteria for MDS is classified as idiopathic cytopenia of undetermined significance (ICUS). It is currently known that hematological diseases as involves epigenetic alterations and mutations in genes that control cell. The *SOX17*, a tumor suppressor gene involved in several biological processes. Hypermethylation of its promoter region in a variety of cancers, including acute myeloid leukemia, is associated with poor prognosis. The methylation pattern of this gene has been little studied in MDS and has never been investigated in ICUS. The methylation pattern of *SOX17* in the bone marrow of 41 patients (26 with MDS and 15 with ICUS) with normal cytogenetics was investigated using methylation-specific (MSP) PCR. Methylation of the *SOX17* promoter region was observed in 57.7% of the patients with MDS and in 53.3% of the patients with ICUS (p-value = 0.435). The methylation observed in most patients of both groups suggests that *SOX17* participates in several abnormal hematopoietic processes, including ICUS. This should be better studied because it may be useful as prognostic and predictive biomarkers in hematological diseases.

Keywords: Myelodysplasia, ICUS, SRY-box containing gene 17, Hypermethylation

Introduction

Myelodysplastic syndromes (MDS) are a group of genetic diseases of clonal bone marrow (BM) neoplasms, characterized by stem cell disorders such as peripheral cytopenias, dysplasia in one or more myeloid cell lines, ineffective hematopoiesis and susceptibility for acute myeloid leukemia (AML) (1,2). The median age of MDS patients at diagnosis is 70–75 years; the incidence in patients in this age group is approximately 30 cases per 100,000 people per year, with 30% of the patients with conclusive diagnoses of MDS progressing to AML (1, 2). The pathogenesis is heterogeneous and so an accurate diagnosis requires a complete analysis, including cytomorphological evaluations of the peripheral blood (PB) and BM, BM biopsy, cytogenetics and an investigation of molecular genetics (3, 4).

Patients with persistent cytopenia but without diagnostic criteria for MDS are classified as idiopathic cytopenia of undetermined significance (ICUS) (5). ICUS is a recent definition; it is not a clonal disorder and little is understood about etiologic factors and specific treatments. ICUS is common in the elderly population and receives this classification when cytopenia persists for more than six months and the diagnostic criteria for MDS are absent (5, 6). It is considered a diagnostic and therapeutic challenge (7).

Although mutations are well understood in MDS, aberrant DNA methylation is one of the most common molecular abnormalities in the pathogenesis and evolution of MDS. This process consists in silencing the gene by adding a methyl group in the promoter region with an important aspect of this processes being its reversibility (8, 9).

The Sry-related high mobility group box (Sox) is a group of transcriptional regulators with a DNA-binding domain (the HMG box). There are approximately 30 members of the Sox gene family expressed in different tissues at different stages during development. One of them, *SOX17* (SRY-box containing gene 17), is located at 8q11.23 and has two exons (10, 11). It is involved in several biological processes and is expressed during the G1/S cell cycle phase of apoptosis and angiogenesis. Furthermore, *SOX17* is an important tumor suppressor, as it is able to regulate tumor cell development by inhibiting Wnt/ β -catenin signaling. The Wnt/ β -catenin pathway is a highly conserved pathway with implications in the self-renewal, differentiation and maintenance of normal adult stem cells (12, 13).

Therefore, an understanding about the action of *SOX17* on the Wnt/ β -catenin signaling pathway is of great interest in several types of cancer. Studies have reported a low expression

of *SOX17* in hepatocellular carcinoma, colorectal cancer, lung cancer, and other solid tumors (10, 11). Downregulation of *SOX17* also was associated with poor prognosis in AML and in MDS and the abnormal methylation pattern of this gene seems to be one of the first events in the pathogenesis of MDS (14, 13). However, the methylation of *SOX17* has not been studied in respect to ICUS.

The aim of this study was to investigate the methylation pattern of *SOX17* in MDS and ICUS patients to understand better the role of this gene in these hematological abnormalities.

Materials and Methods

Patients

The study group consisted of 25 male and 16 female patients with a median age 55.95 (range: 8-88 years) treated in the Hematology Service of Hospital de Base in São José do Rio Preto, SP, Brazil. The diagnoses were made according to the World Health Organization (WHO) 2008 classification with DNA being extracted from bone marrow cells and maintained frozen (-20°C). Twenty-six patients had conclusive diagnoses of MDS and 15 had persistent cytopenia for more than six months without diagnostic criteria for MDS, and therefore they had conclusive diagnoses of ICUS. Eight of the MDS patients had refractory anemia with excess blasts (RAEB) and 18 had refractory cytopenia with multilineage dysplasia (RCMD).

Cytogenetic analysis

Bone marrow cells were added to RPMI1640 medium with 20% fetal cow serum and cultured for 24 hours without stimulation. At least 20 GTG-banded metaphases were analyzed per patient with the results being described according to the International System for Human Cytogenetic Nomenclature (ISCN 2016). Only patients with normal karyotypes were studied.

Isolation of DNA, sodium bisulfite modification and methylation-specific PCR

The genomic DNA was extracted from the BM cells of each patient to analyze DNA methylation with bisulfite conversion using the EpiTect Bisulfite kit (Qiagen GmbH) according to the manufacturer's instructions. After conversion, the DNA was applied to an EpiTect spin column using optimized buffers. Subsequently, it was washed to remove all

traces of sodium bisulfite, and eluted and methylation-specific PCR (MSP-PCR) was performed with specific primers for the unmethylated and methylated promoter sequences:

SOX17-M forward, GGGGCGTTCGTAGTGTTATTAGGTC

SOX17-M reverse, AAACACTAAAATACCCCGAAAACACTACG

SOX17-U forward, TTAGGGGTGTTTGTAGTGTTATTAGGTT

SOX17-U reverse, TAAAACACTAAAATACCCCAAAAACACTACA

The amplified MSP-PCR products were run on agarose gel (2%) and analyzed under ultraviolet light (Enduro GDS).

Results

Hypermethylation of the CpG promoter region was identified by MSP-PCR in 15 (57.7%) of the 26 patients with conclusive diagnosis of MDS and in eight (53.3%) of the 15 patients with ICUS. Representative results of MSP-PCR for *SOX17* methylation are shown in Figure 1. Figure 2 shows the percentage of methylated *SOX17* in both groups. Using the chi-square and Person statistics tests, no significant difference was found (p -value = 0.435) in the observed frequencies of abnormal methylation of *SOX17* between the MDS and ICUS groups.

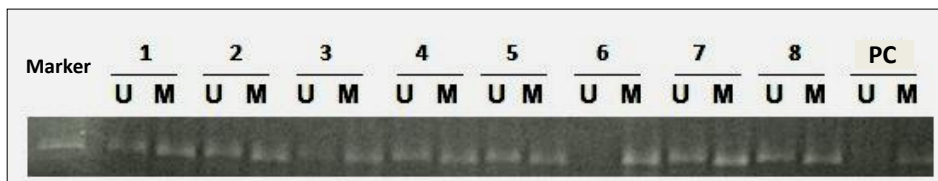


Figure 1: Representative results of MSP-PCR. Methylation status of the *SOX17* promoter in MDS patients. Marker- 100 pb, M = methylated, PC = positive control, U= unmethylated

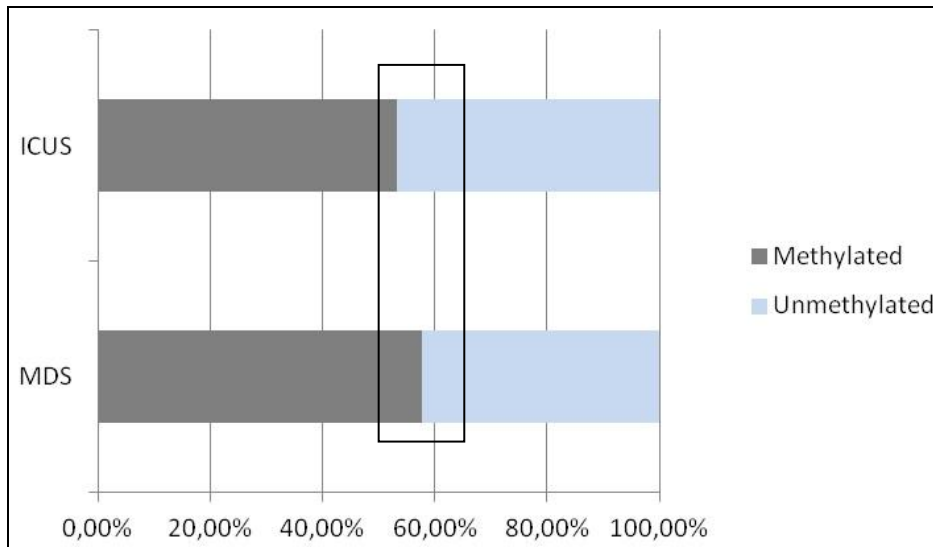


Figure 2: Percentages of methylated *SOX17* in patients with ICUS and with MDS – the frequencies of the methylation patterns were very similar.

Discussion and Conclusion

Several studies report MDS as a heterogeneous disease in which specific genetic factors are important for accurate diagnosis and therapeutic strategies. Genetic alterations can be found in both MDS and ICUS making it possible to understand the biologic mechanisms involved in the disease pathology and progression. Even so, and with all the advances in molecular diagnostic techniques, their true significance is unclear in the majority of cases of both diseases.

Some molecular and cytogenetic alterations may alter the clinical course and adversely affect the prognosis in different subtypes of MDS (15). Although few genetic studies have been performed in ICUS, it is known that the acquisition of mutations is associated with progression to myeloid neoplasms (4, 6, 16).

A recent study detected mutations in 62% of the patients with ICUS and, of these, 95% carried a mutation in the *TET2*, *ASXL1*, *SRSF2*, or *DNMT3A* genes. However, the risk of progression to MDS, chronic myelomonocytic leukemia (CMML) or AML was not significantly associated with mutational status (6). Interestingly, the four genes are commonly reported as mutated in MDS (17).

Molecular abnormalities are found in more than 90% of MDS patients; epigenetic alterations of genes that control hematologic processes, including the methylation of tumor suppressor genes, are the most common (17). However, as far as we know there are no published investigations about methylation patterns in ICUS patients.

This study set out to investigate *SOX17* because it is a tumor suppressor gene associated with tumorigenesis in several biological processes. Hypermethylation of the *SOX17* promoter is associated with poor prognosis in different types of cancer. For example, in breast cancer the *SOX17* promoter was found methylated in 72.9% of malignant tissues and was not methylated in any of the control samples. Moreover, the frequencies of abnormal methylation patterns were similar in tumor tissue and plasma samples, suggesting that *SOX17* methylation may be a good marker in the peripheral blood for this tumor (11).

It has been proposed that the abnormal methylation pattern of this gene may also be a marker of poor prognosis in hematological malignancies. The epigenetic inactivation and aberrant expression of *SOX17* have been investigated in MDS and AML and it seems to be important in the processes involving these diseases (13). Rong Fan et al. (2014) found *SOX17* gene methylation in 58.5% of patients with MDS and in none of the control group. The authors proposed that the hypermethylation of the *SOX17* promoter may be one of the first events in the development of MDS and may predict a poor prognosis (14). Chun-yan Tang et al. (2014) observed aberrant expressions of *SOX17* in 60% of AML patients, and associated this with unfavorable overall survival in cytogenetically normal AML patients (13).

In this study, the abnormal pattern of *SOX17* methylation was observed in more than half of the patients diagnosed with ICUS and MDS. Specific studies about Sox17-binding sites showed that *SOX17* activates the transcription of key regulator genes for hematopoiesis directly implicating it in the regulation of cell survival, proliferation, and maturation of hematopoietic precursors (16, 18).

Not only has the methylation pattern not been studied in ICUS, to the best of our knowledge the *SOX17* gene has never been studied in this disease.

The frequency that we observed for *SOX17* methylated in patients with MDS (57.7%) was similar to the frequency obtained by Rong Fan et al. (2014) (58.5%). The results of this study showed no significant difference between the percentages of *SOX17* promoter methylation in patients with ICUS and in those with MDS. These results suggest that silencing of *SOX17* by methylation is a frequent event in hematological diseases, including ICUS.

This study shows that because of the tumor suppressor function of the *SOX17* gene, its abnormal methylation is an important event in both MDS and ICUS. This may be a useful marker to diagnose and monitor the evolution of these diseases.

Funding: This study was funded by Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior- CAPES.

Conflict of Interest: The authors declare that there are no conflicts of interest, either real or perceived. There are no sponsors involved in the study design, the collection, analysis, or interpretation of the data, the writing of the report, or the decision to submit the manuscript for publication.

References

1. Moyo T K, Savona M R. Molecular Testing in Patients with Suspected Myelodysplastic Syndromes. *Current Hematologic Malignancy Reports*, (2016) 1-8 DOI 10.1007/s11899-016-0356-8.
2. Gangat N, Patnaik M M , Tefferi A. Myelodysplastic syndromes: Contemporary review and how we treat. *American Journal of Hematology*, 91 (2016) 76-89.
3. Ciabatti E, et al. Myelodysplastic syndromes: advantages of a combined cytogenetic and molecular diagnostic workup. *Oncotarget*, (2017) 1-13.
4. Macedo L C, et al. Genetics factors associated with myelodysplastic syndromes. *Blood Cells, Molecules and Diseases*, 55 (2015) 76–81.
5. Steensma D P, et al. Connect MDS/AML: design of the myelodysplastic syndromes and acute myeloid leukemia disease registry, a prospective observational cohort study. *BMC Cancer*, 16 (2016) 1-10 DOI 10.1186/s12885-016-2710-6.
6. Hansen J W, et al. Mutations in idiopathic cytopenia of undetermined significance assist diagnostics and correlate to dysplastic changes. *American Journal of Hematology*. 91, n° 12 (2016) 1234-1238 DOI :10.1002/ajh.24554.
7. Jain M, Tripathi A. ICUS/CCUS/CHIP: basics & beyond. *Expert Review of Hematology*. (2017) DOI 10.1080/17474086.2017.1371588.
8. Zaker F. Gene Expression and Methylation Pattern in HRK Apoptotic Gene in Myelodysplastic Syndrome. *International Journal of Molecular and Cellular Medicine*, 5 n° 2 (2016) 90-99.
9. Seongseok Yun, et al. Targeting epigenetic pathways in acute myeloid leukemia and myelodysplastic syndrome: a systematic review of hypomethylating agents trials. *Clinical Epigenetics*, 68 (2016) 1- 9 DOI 10.1186/s13148-016-0233-2.
10. Fu D, et al. Decreased expression of *SOX17* is associated with tumor progression and poor prognosis in breast cancer. *Tumor Biology*, 36 (2015) 8025–8034.
11. Fu D, et al. Sox17 Promoter Methylation in Plasma DNA Is Associated With Poor Survival and Can Be Used as a Prognostic Factor in Breast Cancer. *Medicine Journal*, 94 (2015) 1-8.

12. Ysebaert L, et al Expression of b-catenin by acute myeloid leukemia cells predicts enhanced clonogenic capacities and poor prognosis. *Leukemia Research*, 20 (2006) 1211–1216.
13. Tang C, et al. Low *SOX17* expression: prognostic significance in de novo acute myeloid leukemia with normal cytogenetics. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*, 52 (2014) 1843–1850.
14. Fan R, et al. Abnormal methylation of the sex-determining region Y-box 17 (*SOX17*) promoter predicts poor prognosis in myelodysplastic syndrome. *Clinical Laboratory*, 60 (2014) 1465- 1474.
15. Taylor J, et al. Diagnosis and classification of hematologic malignancies on the basis of genetics. *Blood*, 130 (2017) 410-423.
16. Song Q, et al. Identify latent chromosomal aberrations relevant to myelodysplastic syndromes. *Scientific Reports* (2017) DOI:10.1038/s41598-017-10551-3
17. Zini, G. Diagnostics and Prognostication of Myelodysplastic Syndromes. *Annals of Laboratory Medicine*, 37 (2017) 465-474.
18. Anani M, et al. *SOX17* as a candidate regulator of myeloid restricted differentiation potential. *Development, Growth & Differentiation*, 56 (2014) 469–479.

Original Article

Altered expression pattern of miR126, miR29a, miR20a, miR19b, miR21, miR22 and miR193 in Myelodysplastic Syndrome and a novel proposal to use miR19b and miR193 as biomarkers of the disease

Fernanda de Souza Monteiro¹; Domenico Mattiucci; Antonella Poloni; Agnes Cristina Fett-Conte⁴

1Biology Department, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Paulista State University (IBILCE/UNESP), São José do Rio Preto, São Paulo, Brazil.

2 Dipartimento Scienze Cliniche e Molecolari, Università Politécnica Delle Marche, Ancona, Italy.

3 Faculta di Medicina e Chirurgia, Clinica di Ematologia, Università Politécnica Delle Marche, Ancona, Italy.

3Molecular Biology Department, Medicine School in São José do Rio Preto (FAMERP/FUNFARME), Sao Paulo, Brazil.

E-mail: fernandasmonteirobio@gmail.com

Phone number: (017) 98111-9415

Address: Prof. Francisco Felipe Caputo, 980

Jd Nazareth, São Paulo-Brasil. CEP: 15054-03

Abstract

Myelodysplastic syndromes (MDS) have complex etiologies requiring an accurate molecular analysis. Alterations in microRNA expressions have been described among the molecular changes. In the present study we investigated the expression pattern of 12 microRNAs (miR126, miR29a, miR20a, miR181a, miR19b, miR21, miR155, miR146, miR22, miR193, miR26a and miR29b) in bone marrow cells from 55 patients newly diagnosed with MDS and in eight normal controls. Seven microRNAs (miR126, miR29a, miR20a, miR19b, miR21, miR22 and miR193) had higher expressions in the patients than in controls. The overexpression of miR126, miR29a, miR20a, miR21 and miR22 has been described previously in MDS, but not of miR19b and miR193 observed in more than half of the patients classified with low-risk MDS. This study provides more evidence of abnormal expressions of miRNAs in MDS, confirming their importance in understanding the etiopathogenesis of the disease and provides evidence that these patterns could be considered in future prognostic scoring systems for MDS.

Keywords. microRNA, myelodysplasia, gene expression

Introduction

Myelodysplastic syndromes (MDS) constitute a group of neoplasms that have a risk of progression to acute myeloid leukemia (AML). MDS mainly affect the elderly population with a median age at diagnosis of 65–70 years and an incidence in the general population estimated at five cases per 100,000 people per year; in over 60-year olds this rate increases to up to 50 cases per 100,000 people annually (1, 2, 3).

The clinical heterogeneity of this group of hematological neoplasms requires an accurate diagnosis with quantitative and qualitative evaluations of the cytological and morphological composition, differential blast count, and genetic analysis with conventional karyotyping, fluorescent in situ hybridization (FISH) and molecular analysis (1).

Some studies have shown that about 30% of MDS cases present epigenetic abnormalities and aberrant DNA hypermethylation, associated with poor prognosis and rapid progression to AML (4). In addition to the changes involving cell cycle regulation genes, alterations in the expression patterns of microRNAs (miRNAs) have been identified (5, 6, 7). The miRNAs regulate gene expression by inhibiting the translation of messenger RNA or degrading some target mRNAs related to the compatibility of the 3' region of the gene (8, 9).

There are more than 2,000 mature miRNAs in humans (10) of which more than 70% are located in regions of recurrent copy-number alterations and important cancer-associated genomic regions. The miRNAs regulate a variety of hematopoietic stem cell processes including pathological processes; they can be classified as oncogenes or tumor suppressors depending on the gene modulated by the specific microRNA. (7, 11) Aberrant up- or down-regulated expressions of different miRNAs have been described in solid tumors thus demonstrating their intense participation in tumorigenesis. Some are involved in the pathogenesis of hematological malignancies, including leukemias and lymphomas, and may be associated with particular subtypes of these diseases (12).

There is a growing number of studies designed to improve our knowledge about microRNAs in the pathogenesis of MDS in respect to associations between circulating miRNA expression and target genes (such as *TET2*, *DNMTs* and *KIT*), correlated with del(5q) and those that only seek to associate abnormal expression of microRNAs with the occurrence of the disease (11,13).

Hence, because of their significant participation in hematopoietic differentiation and the dysregulated miRNA expression in MDS, it has been suggested that microRNAs may be promising as biomarkers in the diagnosis and prognosis of hematological diseases (14).

However, though the number of miRNAs with aberrant expression is significant in MDS, the field of microRNAs is extremely vast and should be better investigated.

Thus, in the present study we investigated the expression pattern of twelve microRNAs in patients with MDS in an attempt to establish an association between the expression pattern and the onset of the disease.

Materials and Methods

Patients

The present study evaluated bone marrow cell (BMC) samples obtained at the conclusive diagnosis of MDS in 55 patients classified as high- or low-risk according to the Revised International Prognostic Scoring System (IPSS-R) (15). Moreover, BMC samples were collected from eight healthy donors as controls all of whom were attended in the Hematology Service of the Università Politecnica Delle Marche (Ancona, Italy). Informed consent was obtained from all participants.

RNA extraction and miRNAs quantification by Reverse transcription polymerase chain reaction

Twelve miRNAs (miR126, miR29a, miR20a, miR181a, miR19b, miR21, miR155, miR146, miR22, miR193, miR26a, miR29b) were analyzed. The miRNA hsa-miR192 was chosen as an endogenous control because it does not discriminate between MDS and control samples and it is considered abundant and stable (14).

Total RNA was extracted from BMC samples using Norgen's Total RNA Purification Kit according to the manufacturer's instructions.

The synthesis of cDNA was pre-amplified prior to performing real-time polymerase chain reaction (RT-PCR) using TaqMan Advanced MicroRNA Assay (Applied Biosystems) according to the manufacturer's instructions. Subsequently, the expression was evaluated by RT-PCR using TaqMan MicroRNA Assay.

The reaction was carried out in a StepOne Real-Time PCR system (Applied Biosystems). The amplification process involved incubation at 50°C for 2 min, polymerase activation at 95°C for 10 min, and 40 cycles of denaturing at 95°C for 15 sec and extension/annealing at 60°C for 1 min.

The analysis of the results (expression of miRNAs) was quantified using the comparative Ct ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) method, in which $\Delta Ct = \text{mean Ct}_{\text{miRNA}} - \text{mean Ct}_{\text{internal control}}$.

Statistical Analysis

The relative expression of each miRNA was compared between MDS patients and controls using the Student t-test. The chi-square hypothesis test was used to investigate any possible association between the expression observed and classification as high-risk or low-risk according to the IPSS-R. *P*-values less than 0.05 denoted statistical significance.

Results

The study group consisted of 35 males and 20 females with a median age of 79.86 years (range: 62-98 years). Thirty-seven patients were classified as low-risk and 18 as high-risk MDS. The characterization of the patients is presented in Table 1.

Table 1: Characterization of the patients with MDS

Characteristic	
N°	55
Age (years) - Median (range)	79.86 (62-98)
Age < 70 years – n (%)	14 (25.45)
Age >70 years – n (%)	38 (69.09)
Male – n (%)	35 (63.63)
Female – n (%)	20 (36.36)
Low-risk – n (%)	37 (67.27)
High-risk – n (%)	18 (32.73)

The relative expressions of the miR126, miR29a, miR20a, miR181a, miR19b, miR21, miR155, miR146, miR22, miR193, miR26a and miR29b of the patients compared to controls is presented in Figure 1.

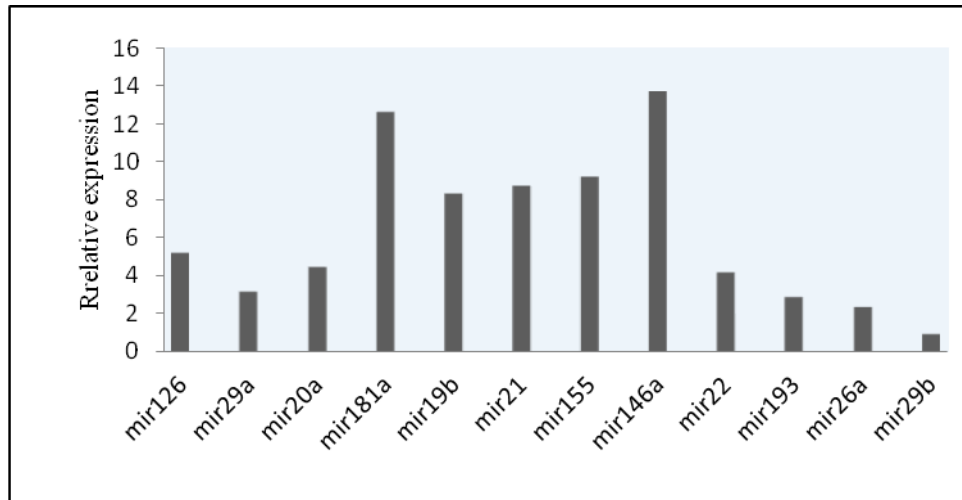


Figure 1 - Relative expression of miRNAs in MDS patients using the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method.

A comparison of the relative expressions demonstrated statistical differences between MDS patients to control subjects for the expression patterns of seven miRNAs. The results of analysis using the Student t-test to compare MDS patients and controls are presented in Table 2.

Table 2: *P*-values obtained on comparing the expression of 12 miRNAs between MDS patients and control subjects

miRNA	<i>P</i> -value	miRNA	<i>P</i> -value
mir126	0.023*	mir155	0.077
mir29a	0.011*	mir146a	0.170
mir20a	0.023*	mir22	0.018*
mir181a	0.095	mir193	0.035*
mir19b	0.009*	mir26a	0.079
mir21	0.005*	mir29b	0.627

*: *P*-value less than 0.05 denoting statistical significance

All the tested miRNAs presented elevated expression patterns in more than half of the MDS patients in relation to the control subjects however there were significant differences in seven (miR126, miR29a, miR20a, miR19b, miR21, miR22 and miR193). In contrast, the

expression of miR29b was lower in 58.18% of the patients albeit without significant difference between patients and controls.

The patients were subdivided according to the IPSS-R into high-risk and low-risk groups. No significant correlation was observed (chi square test) between the risk stratifications and expression patterns of microRNAs (Figure 2). However, even though non-significant, increased expressions of miR19b and miR193 were observed in more than half of the patients classified as low risk.

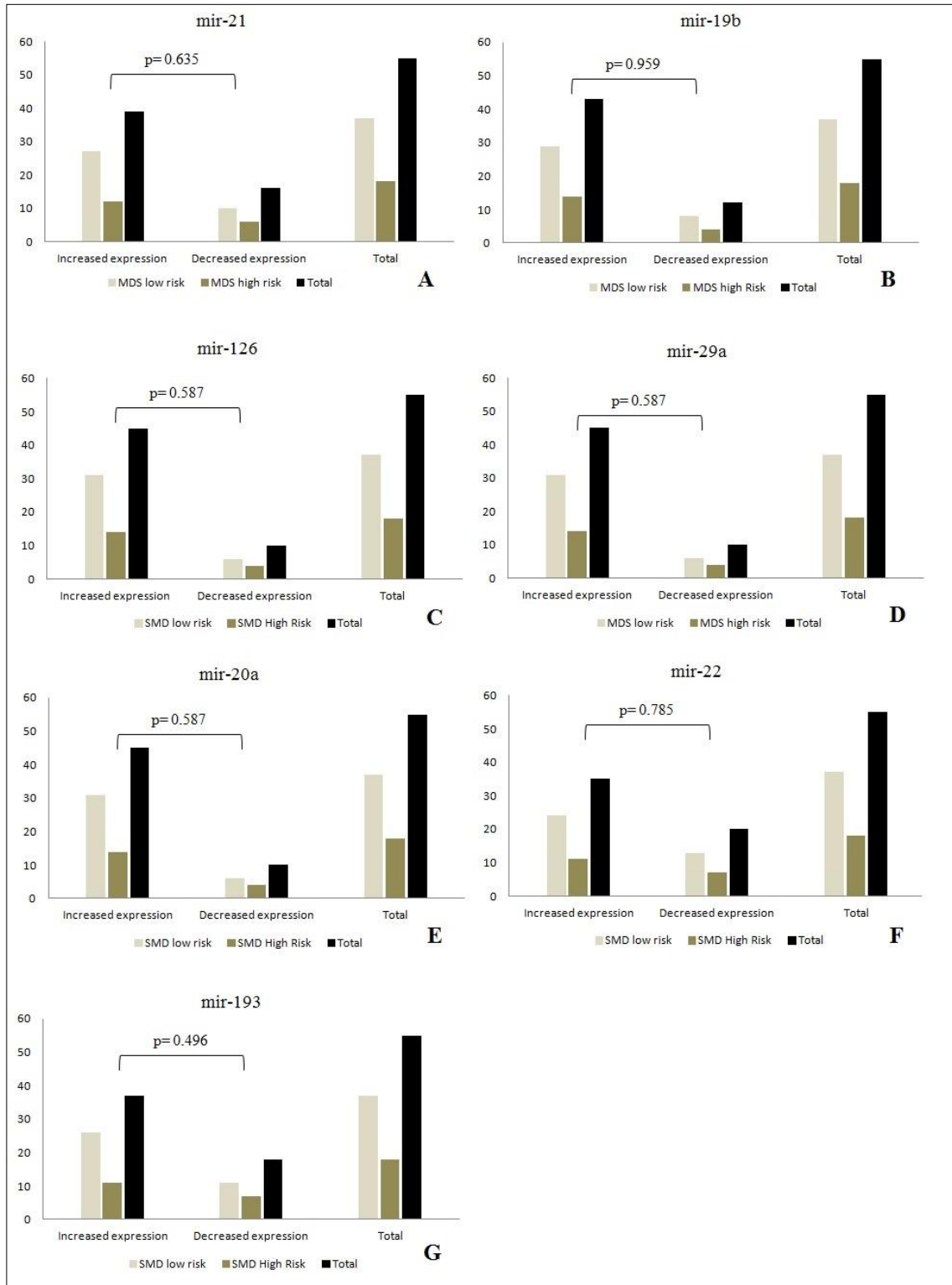


Figure 2: Correlation between risk stratifications and expression patterns of microRNAs (miR126, miR29a, miR20a, miR19b, miR21, miR22 and miR193).

Discussion

This study investigated a cohort of patients for which the distribution of gender and age were as expected. MDS is mainly a disease of the elderly and the majority of studies reported more males than females (16). MDS are heterogeneous diseases and so specific diagnostic criteria are necessary with genetic alterations being considered important biomarkers used to reach accurate diagnoses, as well as contributing to the choice of therapeutic strategies (17).

The small noncoding RNAs that act at the posttranscriptional level to regulate protein expression have an important role in hematopoietic processes; abnormal expressions have clinical implications in the etiopathogenesis of MDS. Some microRNAs have specific functions in hematopoietic processes and have specific target genes in this kind of cell (8).

There is a growing number of studies that aim to interpret the role of microRNA expression in the pathogenesis and prognosis of MDS. A study of Erdogan et al. (6, 18) identified eight microRNAs differentially expressed in MDS patients compared to controls. In particular, hsa-miR378, hsa-miR632, and hsa-miR636 demonstrated significant differences between the two groups. These and the results of several other studies suggest that the aberrant expression of microRNAs must be related to the MDS phenotype. Dysregulated microRNAs may be able to provide a link between normal and malignant hematopoietic cells (6, 18).

Hence, this study sought to analyze the expression patterns of a large number of microRNAs for which studies had reported dysregulated expressions in solid tumors and malignant hematological diseases but that had been little investigated in MDS. Seven of these microRNAs (miR126, miR29a, miR20a, miR19b, miR21, miR22 and miR193) presented expressions significantly different in MDS patients compared to the control group. The overexpression of miR126, miR29a, miR20a, miR21 and miR22 had already been described in MDS.

MiR22 was described as having an anti-tumor function and it had been identified as a promising therapeutic target in the treatment of AML. It also seems to have an oncogenic role since its aberrant expression is upregulated in MDS. In patients with leukemia, the expression of miR22 was also correlated with poor survival (19, 20). The results of this study are in agreement with published data as miR22 was expressed at a significantly higher level, nearly 7.5 times more in MDS than in the control group.

MiR21 and miR126 have been studied little in respect to MDS but they appear to play an important role in the disease. miR21 is an oncogenic microRNA that has prognostic significance in many cancers and was proposed as a prognostic marker in MDS (7). miR126, with the ability to inhibit cellular apoptosis and increase cell viability, appears to be associated with particular subtypes of AML (7).

The expressions of miR21 and miR126 that were previously studied in only a small number of patients with MDS (26 patients), were higher in the patients compared to the control group (7). The analysis of the current study corroborates these data; herein we investigated a larger number of patients (55 patients) and both microRNAs presented significantly higher relative expressions, strongly suggesting that these microRNAs are important signaling factors in hematological malignancies.

miR29a and miR29b contribute directly or indirectly to myeloid leukemogenesis because both participate in normal myeloid differentiation by regulating transcription factors and are involved in anti-apoptotic effects. A reduced expression of miR29a has been reported in AML (21). Only one study investigated the expression pattern of these microRNAs in a small number (nine) of patients diagnosed with MDS and showed that the downregulation of miR29b causes anti-apoptotic effects in myeloid blast cells resulting in the development of leukemia (22). The present study found that more than a half of the patients had miR29b downregulated and an increased expression of miR29a, approximately 3-fold higher, in MDS patients, suggesting that both these microRNAs are of great importance in MDS (23).

Another microRNA that had a statistically significant difference in the expression pattern between MDS patients and the control group in the present study was miR20a. This microRNA is believed to participate in the development and progression of some types of tumors (18). One study did not find any significant difference in the expression pattern of miR20a between MDS patients and a control group (18). In contrast, the current study found a significantly higher expression of this microRNA in MDS, suggesting that it may be a potential diagnostic marker and should be better investigated (18).

From what we know, there are no other reports about the expression pattern of the miR19b and miR193 in respect to MDS; this study found significant differences in the expression of both.

It is interesting that, although no significant correlations between the risk stratifications and the abnormal expression levels of the microRNAs were observed, increased

expressions of miR19b and miR193 were detected in more than half of the low-risk MDS patients; this may have occurred because most of the patients were low risk.

In relation to the increased expression of miR19b (~8x) our result corroborates with previous studies about the influence of this microRNA in hematological malignancies. miR19b has an oncogenic potential in several types of human cancers especially lung cancer, colorectal cancer, and lymphocytic leukemia. Furthermore, upregulation of miR19b expression was found correlated with recurrence and poor prognosis in AML (24). The increased expression of miR19b could also be related to the evolution of MDS to AML, a premise that deserves to be investigated.

Several studies have proved the association of the expression pattern of miR193a with the staging, severity, response to chemotherapy and even survival related to cancer. This microRNA can be used to differentiate some types of cancer and can act as a tumor suppressor or as an oncogene (25). In previous studies, a low expression was found in several cancers, including AML (26). However, in the present study, we found it upregulated by approximately 2.8-fold in MDS patients compared to the control group. As this is a first description of this microRNA in MDS, other studies need to be performed to clarify its role in the etiopathogenesis of this disease.

Currently the great challenge for MDS is the search for biomarkers that help define the diagnosis and prognosis. The current study shows that microRNAs are promising signaling factors in MDS and they should be better investigated especially miR126, miR29a, miR20a, miR19b, miR21, miR22 and miR193.

Furthermore, this study reports on a finding that is as yet unpublished, the significant difference in the expressions of miR193 and miR19b in MDS patients compared to the control group, suggesting that these two microRNAs may be possible biomarkers for the disease. However, this is just one more unanswered question related to how microRNAs lead to MDS in a specific individual.

Funding: This study was funded by Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior- CAPES.

Conflict of Interest: The authors declare that there are no conflicts of interest, either real or perceived. There are no sponsors involved in the study design, the collection, analysis, or interpretation of the data, the writing of the report, or the decision to submit the manuscript for publication.

References

- 1- Zini G. Diagnostics and Prognostication of Myelodysplastic Syndromes [published online ahead of print August 2016]. *Annals of laboratory medicine*. doi.org/10.3343/alm.2017.37.6.465.
- 2- Yun S, Vincelette ND, Abraham V, et al. Targeting epigenetic pathways in acute myeloid leukemia and myelodysplastic syndrome: a systematic review of hypomethylating agents trials. *Clinical Epigenetic*. 2016; 8 (68): 1-9.
- 3- Gidarò A, Deliliers GL, Gallipoli P, et al. Laboratory and clinical risk assessment to treat myelodysplastic syndromes [published online ahead of print August 2016]. *Clin Chem Lab Med*. doi10.1515/cclm-2015-0789
- 4- Issa JJ. The myelodysplastic syndrome as a prototypical epigenetic disease. *Blood*. 2013;121:3811-3817.
- 5- Visconte V, et al. Molecular Pathogenesis of Myelodysplastic Syndromes. *Translational Medicine- ISSN* 2239-9747. 2014; 8(4): 19-30.
- 6- Erdogan B, et al. Diagnostic microRNAs in myelodysplastic syndrome. *Experimental Hematology*. 2011; 39: 915–926.
- 7- Choi Y, et al. Expression and prognostic significance of microRNAs in Korean patients with myelodysplastic syndrome [published online ahead of print Nov 2017]. *The Korean Journal of Internal Medicine*. doi10.3904/kjim.2016.239.
- 8- Chung SS, Hu W, Park CY. The role of microRNAs in hematopoietic stem cell and leukemic stem cell function. *Therapeutic Advances in Hematology*. 2011; 2(5): 317-334.
- 9- Choia J, Nama M, Yoona S, Kangb S. MicroRNA-194-5p could serve as a diagnostic and prognostic biomarker in myelodysplastic syndromes. *Leukemia Research*. 2015; 39: 763–768.
- 10- Lewis BP, Burge CB, Bartel DP. Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets. *Cell*. 2005;120(1):15–20.
- 11- Kuang X, Chi J, Wang Li. Deregulated microRNA expression and its pathogenetic implications for myelodysplastic syndromes [published online ahead of print Aug 2016]. *Hematology*. doi10.1080/10245332.2016.1193962.
- 12- Hershkovitz-Rokah O, Geva1 P, Salmon-Divon M, Shpilberg O, Liberman-Aronov S. Network analysis of microRNAs, genes and their regulation in diffuse and follicular B-cell lymphomas *Oncotarget*. 2018; 9(8): 7928-7941.
- 13- Diego F, et al. TET2 expression level and 5-hydroxymethylcytosine are decreased in refractory cytopenia of childhood [published online ahead of print July 2015]. *Leukemia Research*. doi:10.1016/j.leukres.2015.07.005.
- 14- Kim Y, et al. Serum microRNA-21 as a Potential Biomarker for Response to Hypomethylating Agents in Myelodysplastic Syndromes. *Plos One*. 2014; 9: 1-9.
- 15- Greenberg PL, Tuechler H, Schanz J, et al. Revised international prognostic scoring system for myelodysplastic syndromes. *Blood*. 2012; 120(12): 2454-2465.
- 16- Grabska J, Shah B, Reed D, et al. Myelodysplastic Syndromes in Adolescent Young Adults: One Institution’s Experience [published online ahead of print Aug 2016]. *Clin Lymphoma Leukimia*. doi: 10.1016/j.cml.2016.02.022.
- 17- Moyo TK, Savona MR. Molecular Testing in Patients with Suspected Myelodysplastic Syndromes. *Current Hematologic Malignancy Reports*. doi 10.1007/s11899-016-0356-8.

- 18- Vasilatou D, Papageorgiou SG, Kontsioti F, et al. Expression analysis of miR17-5p, miR20a and let-7a microRNAs and their target proteins in CD34+ bone marrow cells of patients with myelodysplastic syndromes. *Leukemia Research*. 2013; 37: 251– 258.
- 19- Jiang X, Hu C, Arnovitz S, et al. MiR22 has a potent anti-tumour role with therapeutic potential in acute myeloid leukaemia [published online ahead of print Apr 2016]. *Nature Communication*. doi: 10.1038/ncomms11452
- 20- Song SJ, Ito K, Ala U, et al. The Oncogenic MicroRNA miR22 Targets the TET2 Tumor Suppressor to Promote Hematopoietic Stem Cell Self-Renewal and Transformation. *Cell Stem Cell*. 2013;13: 87–101.
- 21- Ngankeu A, Ranganathan P, Havelange V, et al. Discovery and functional implications of a miR29b-1/miR29a cluster polymorphism in acute myeloid leukemia. *Oncotarget*. 2018; 9(4): 4354-4365.
- 22- Kirimura S, Kurata M, Nakagawa Y, et al. Role of microRNA-29b in myelodysplastic syndromes during transformation to overt leukaemia. *Pathology*. 2016 ; 48(3): 233–241.
- 23- Weng H, Huang H, Dong B, et al. Inhibition of miR17 and miR20a by Oridonin Triggers Apoptosis and Reverses Chemoresistance by Derepressing BIM-S [published online ahead of print May 2018]. *Cancer Research*. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-13-1748.
- 24- Zhanga T, Linb J, Zhoua J, et al. High bone marrow miR19b level predicts poor prognosis and disease recurrence in de novo acute myeloid leukemia. *Gene*. 2018; 640: 79–85.
- 25- Mamoori A, Gopalan V, Lam AK. Role of miR193a in cancer: complexity and factors control the pattern of its expression [published online ahead of print Mar 2018]. *Current Cancer Drug Targets*. doi: 10.2174/1568009618666180308105727.
- 26- Gao X, Lin J, Li Y, et al. MicroRNA-193a represses c-kit expression and functions as a methylation-silenced tumor suppressor in acute myeloid leukemia. *Oncogene*. 2011; 30: 3416–3428.

Artigo Original

Análise da Expressão dos microRNAs miR29b, miR193, miR22 e miR26a em Pacientes com SMD Infantil

Fernanda de Souza Monteiro¹; André van Helvoort Lengert²; Daniel Onofre Vidal³; Luiz Fernando Lopes³; Agnes Cristina Fett-Conte⁴

1 Departamento de Biologia, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista (IBILCE / UNESP), São José do Rio Preto, São Paulo, Brasil.

2 Centro de Pesquisa em Oncologia Molecular (CPOM), Hospital do Amor, Barretos, São Paulo, Brasil.

3 Laboratório de Oncologia Pediátrica do Centro de Pesquisa em Oncologia Molecular do Hospital do Câncer de Barretos, Barretos, São Paulo, Brasil.

4 Departamento de Biologia Molecular da Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto (FAMERP/FUNFARME), São Paulo, Brasil.

E-mail: fernandasmonteirobio@gmail.com

Telefone: (017) 98111-9415

Endereço: Prof. Francisco Felipe Caputo, 980

Jd Nazareth, São José do Rio Preto, SP, CEP: 15054-030

Resumo

Síndrome mielodisplásica (SMD) é a designação dada um grupo de neoplasias hematológicas que afetam mais frequentemente indivíduos adultos, especialmente idosos, sendo consideradas raras em crianças e adolescentes. Em SMD infantil, como em adultos, são descritas alterações genéticas importantes para o entendimento da etiologia, muitas delas utilizadas como marcadores diagnósticos e prognósticos. Entretanto, a manifestação da SMD em fases precoces do desenvolvimento humano ainda tem muito a ser esclarecida. Os microRNAs são considerados elementos potencialmente capazes de estarem envolvidos na etiopatogenia da doença, por desempenharem um papel fundamental na diferenciação, proliferação e apoptose, regulando a tradução de proteínas-alvo, inclusive, nas células da medula óssea. Entre eles, destacam-se como candidatos o miR29b, miR193, miR22 e o miR26a, por já terem sido encontrados com padrão de expressão alterados em neoplasias hematológicas de adultos. Destes, apenas o miR22 foi investigado em pacientes pediátricos com SMD e mostrou expressão aumentada. O presente estudo analisou o padrão de expressão dos microRNAs miR29b, miR193, miR22 e miR26a em 28 pacientes ao diagnóstico de SMD infantil e em 10 crianças saudáveis. A expressão do miR26a foi significativamente menor nos pacientes, comparados aos controles. Foi observada expressão diminuída dos microRNAs miR193 e miR29b em mais de 70% dos pacientes e aumentada do miR22 em mais de 50% deles, embora sem significância estatística. Os dados obtidos sugerem que a expressão diminuída do miR26a pode atuar como um elemento biológico envolvido na etiologia da SMD infantil. Embora não significativa a diferença entre pacientes e controles, a expressão alterada de miR29b, miR193 e de miR22 pode ter relevância individual, uma vez que é esperado padrão de expressão normal nas células da medula óssea. Os dados de expressão anormal dos microRNAs corroboram outros obtidos previamente e a hipótese de que podem ser biomarcadores promissores em SMD infantil, embora sejam necessários outros estudos para esclarecimento destes achados.

Palavras chave: síndrome mielodisplásica, SMD na infância, biomarcadores.

Abstract

Myelodysplastic syndrome (MDS) is the name given to a group of hematological malignancies that mostly affect adult individuals, especially the elderly, and thus are rare in children and adolescents. In childhood MDS, similar to adults, genetic alterations are important for the understanding of the etiology and many are used as diagnostic and prognostic markers. However, there is still much to be clarified about the manifestation of MDS in the early stages of human development. MicroRNAs are potentially involved in the pathogenesis of the disease because they play a key role in cell differentiation and proliferation, and apoptosis by regulating the translation of target proteins into bone marrow cells. Among these microRNAs, miR29b, miR193, miR22 and miR26 are considered candidates as they have already been identified as having altered expression patterns in hematological malignancies of adults. Of these, only miR22 has been investigated in pediatric MDS patients previously, with the results showing an increased expression. The present study compared the expressions of the miR29b, miR193, miR22 and miR26a microRNAs in 28 patients at the diagnosis of childhood MDS with ten healthy children. The expression of miR26a was significantly lower in patients compared to controls. Decreased expressions of the miR193 and miR29b microRNAs were observed in more than 70% of patients and an increased miR22 expression was found in more than 50% of patients. The data obtained suggest that diminished expression of miR26a may act as a biological factor involved in the etiology of childhood SMD. The altered expressions of miR29b, miR193 and miR22 may be of individual relevance, since normal expressions are expected in bone marrow cells. The identification of the abnormal expressions of the microRNAs corroborate previously obtained data these microRNAs may be promising biomarkers in childhood MDS, although further studies are needed to confirm these findings.

Keywords: myelodysplastic syndrome, childhood MDS, biomarkers.

Introdução

A síndrome mielodisplásica (SMD) compõe grupo de neoplasias das células da medula óssea (MO) com potencial risco de progressão para leucemia mieloide aguda (1). Afetam mais frequentemente adultos, especialmente idosos entre 65 e 70 anos de idade, com uma incidência de cinco casos novos a cada 100.000 pessoas por ano. Com o aumento da longevidade da população em geral são esperadas frequências progressivamente maiores. (2, 3).

A SMD em crianças e adolescentes até 18 anos de idade, denominada SMD infantil, é considerada uma doença rara, pois atinge menos de 5% das neoplasias hematopoiéticas da infância (3, 4). A incidência é de aproximadamente de 1 a 8 crianças por milhão por ano, sendo mais freqüente em crianças com síndrome de Down, representando aproximadamente 20 a 25% de todos os casos de SMD infantil (4).

Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS) a doença em crianças pode ser classificada em: Citopenia Refratária (CR) com <5% de blastos na MO (subtipo mais comum); Anemia Refratária com Excesso de Blastos (AREB), com porcentagem de blastos na MO entre 5-20% e AREB em transformação (AREB-T), com porcentagem de blastos na MO entre 20-30% (5).

Mas, o diagnóstico na infância é determinado principalmente pela exclusão de causas secundárias, após o estudo morfológico, avaliação da porcentagem de blastos e presença de alterações cromossômicas nas células da MO (3). As características morfológicas, achados citogenéticos e, conseqüentemente, os fatores prognósticos são específicos. Por exemplo, enquanto a neutropenia e a trombocitopenia são as manifestações iniciais mais recorrentes em crianças, em adultos é a presença de uma anemia isolada (6). A anemia refratária com sideroblastos em anel corresponde a 2% da SMD pediátrica e a 25% da SMD em adultos. Também, alterações citogenéticas são mais observadas nas crianças (60%), sendo a alteração mais frequente a del(7q)(40%), enquanto em adultos são observadas em cerca de 40% dos casos, mas apenas aproximadamente 10% dos casos tem esta deleção. (7).

As alterações genéticas são efetivamente importantes para a etiologia e evolução clínica da doença e podem servir como marcadores moleculares de diagnóstico e de progressão da mesma (4,6). Nos últimos anos, novos biomarcadores moleculares foram descobertos, com destaque para reguladores epigenéticos (*TET2*, *DNMT3A*, *ASXL1*, *EZH2* e *IDH1/2*) comumente mutados na SMD de adultos, que permitiram compreender melhor os

processos biológicos associados à doença e refinar o direcionamento para terapias específicas (6,7). Em SMD infantil, entretanto, pouco está esclarecido sobre estes elementos.

Os genes DNA metiltransferase 3A (*DNMT3A*) e Ten-Eleven translocation 2 (*TET2*) tem despertado muito interesse científico pela sua participação na etiopatogênese das malignidades hematológicas. Ambos atuam de maneira específica no ciclo celular, metilando e desmetilando o DNA, respectivamente, motivo pelo qual é crescente o número de estudos sobre seus elementos reguladores, os microRNAs (8, 9, 10).

Os microRNAs são pequenas moléculas de RNA de sequência curta, não-codificantes, com aproximadamente 19-22 nucleotídeos, que atuam na regulação de genes alvos específicos. Se ligam à região 3' (3'UTR) do RNA mensageiro (m-RNA) e, havendo complementaridade, o RNA mensageiro é clivado, degradado e, conseqüentemente o gene é silenciado pelo impedimento da tradução da proteína-alvo (11, 12).

A análise da expressão e função de microRNAs durante a hematopoiese tem demonstrado detalhes complexos sobre a ação desses elementos durante a diferenciação hematopoética (ERDOG). A expressão alterada de alguns microRNAs, e conseqüentemente, o produto de seu gene alvo, já foi observada em algumas neoplasias hematológicas, entre diversos outros tipos de câncer (6, 13). Entre os candidatos estão incluídos, o miR29 e miR193a, que são preditivos de regular o produto de transcrição do gene *DNMT3A*, e os miR22 e miR26a, que são preditivos de regular o produto do *TET2* (8, 14, 15, 16, 17).

Os miR29a e miR193 atuam como supressores de tumor e quando expressos em quantidades elevadas diminuem a expressão do produto gênico de *DNMT3a*. Assim, a ação destes micros conduz à sub-regulação de diversos genes, uma vez que eles são capazes de reduzir da metilação global do DNA. A expressão alterada destes micros já foi verificada em alguns tipos de tumores sólidos e em neoplasias hematológicas (14,16,18). Entretanto, não foram encontrados estudos sobre a ação dos mesmos em SMD infantil.

O miR22 e o miR26 atuam regulando negativamente o produto gênico do *TET2*, como um modificador oncogênico importante para neoplasias hematológicas. Alguns estudos mostraram expressão reprimida destes micros em diversos tipos de câncer, inclusive linfomas e LMA, o que sugere sua participação na regulação da hematopoese (15,17 e 12).

Assim, a investigação do padrão de expressão dos microRNAs miR29b, miR193, miR22 e o miR26a, em pacientes pediátricos, que foi o objetivo deste estudo, pode elucidar melhor a etiologia e evolução da SMD infantil e identificar potenciais biomarcadores desta doença rara.

Material e Métodos

Pacientes

O presente estudo, após aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto – CEP/FAMERP (nº 37509814.4.0000.5415) e do Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital do Câncer de Barretos (nº 37509814.4.30015437), foi realizado em amostras de células da MO de 28 pacientes pediátricos (13 do sexo masculino e 15 do sexo feminino), ao diagnóstico, antes de qualquer tipo de tratamento, com diagnóstico conclusivo de SMD infantil, e em amostras de dez crianças saudáveis (controles), atendidos no Hospital do Câncer de Barretos, Barretos- SP, Brasil. O diagnóstico seguiu os critérios de classificação de SMD na infância da Organização Mundial de Saúde (OMS) (1).

Extração de RNA e análise da expressão dos miRNAs via RT-PCR

Para a análise dos quatro microRNAs de interesse (miR29b, miR193, miR22 e miR26a), o miR192 foi utilizado como controle endógeno, por ser um excelente indicador, expresso de maneira estável em células da medula óssea. O RNA total foi extraído de amostras de MO utilizando o reagente TRIzol® (Invitrogen), seguindo as normas do fabricante.

Após a extração do RNA foi realizada a etapa de síntese do cDNA com a utilização do kit *High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit* (Applied Biosystems), seguindo as recomendações do fabricante quanto ao protocolo de reação e ciclagens.

Os *mixes* de reação continham, além dos reagentes necessários para o processo de síntese de cDNA, os *primers* específicos para as sondas TaqMan de microRNAs. Após a ciclagem, as amostras de cDNA foram armazenadas em freezer -20°C para posterior utilização nas análises de expressão dos microRNAs.

Para a análise de expressão dos microRNAs, as reações foram feitas em triplicata, utilizando-se como sistema de detecção o sistema TaqMan® MiRNA assay (Invitrogen, Life Technologies). O equipamento utilizado foi o 7500 Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems) e o perfil de amplificação foi o seguinte; 50°C por 2min, desnaturando a 95°C por 10min, 40 ciclos a 95°C por 15seg e 60°C por 1min.

A análise dos resultados (expressão de microRNAs) foi quantificada usando o Ct comparativo ($2^{-\Delta\Delta Ct}$), no qual $\Delta Ct = Ct$ médio de miRNA – Ct médio do controle.

A expressão relativa de cada microRNA foi comparada entre pacientes com SMD e amostras controles pelo teste t de Student.

Resultados

O grupo de estudo consistiu de 13 do sexo masculino e 15 do sexo feminino, com média de idade de 8,28 (intervalo: 01 a 15 anos).

A expressão relativa dos micros miR29b, miR193, miR22 e miR26a em pacientes com SMD infantil, comparada com a das amostras controles está apresentada na Figura 1. É possível observar os valores de expressão que cada um dos microRNAs esteve expresso a mais ou a menos do que no grupo controle. Assim, comparada ao grupo controle, a expressão relativa do miR29b foi 0,09 menor (~10% menor que a expressão observada no grupo controle), do miR193 foi 0,97 (97%) menor, do miR22 1,7 (70%) maior e do miR26a 0,92 (92%) menor.

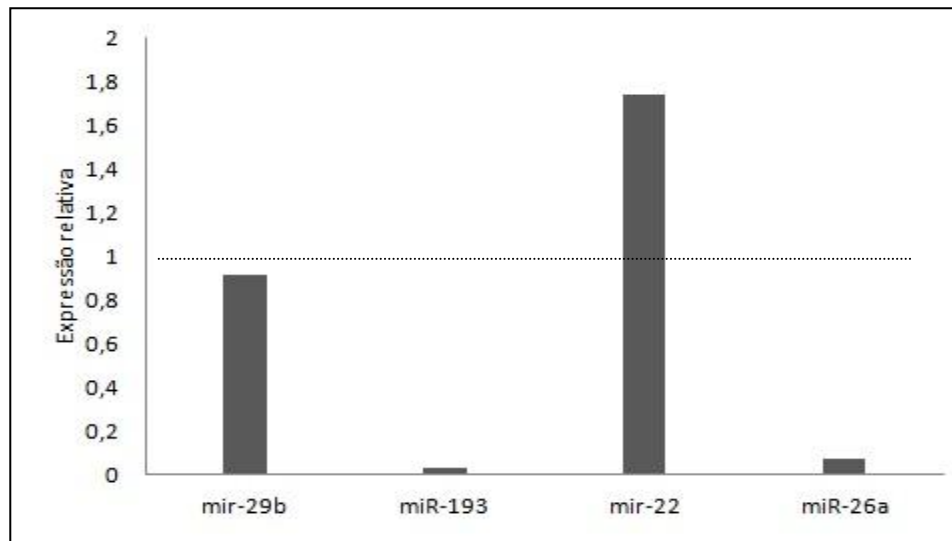


Figura 1 – Expressão relativa dos microRNAs utilizando método $2^{-\Delta\Delta Ct}$. A reta indicada no gráfico corresponde o valor “referencial” para expressão dos controles.

Os microRNAs miR29b e miR193 mostraram expressão diminuída em relação ao grupo controle em 22 (78,5%) e em 26(92,8%) pacientes, respectivamente, ou seja, em mais de 70% dos casos analisados.

A expressão do miR22 foi maior em 15(53.5%) pacientes em relação à expressão detectada no grupo controle, enquanto uma expressão diminuída do miR26a foi observada em 28 (100%) dos pacientes analisados.

A expressão dos microRNAs analisados dos pacientes com SMD infantil comparada com a do grupo controle, ambos normalizados para o miR192 (controle endógeno), pode ser observada na Figura 2.

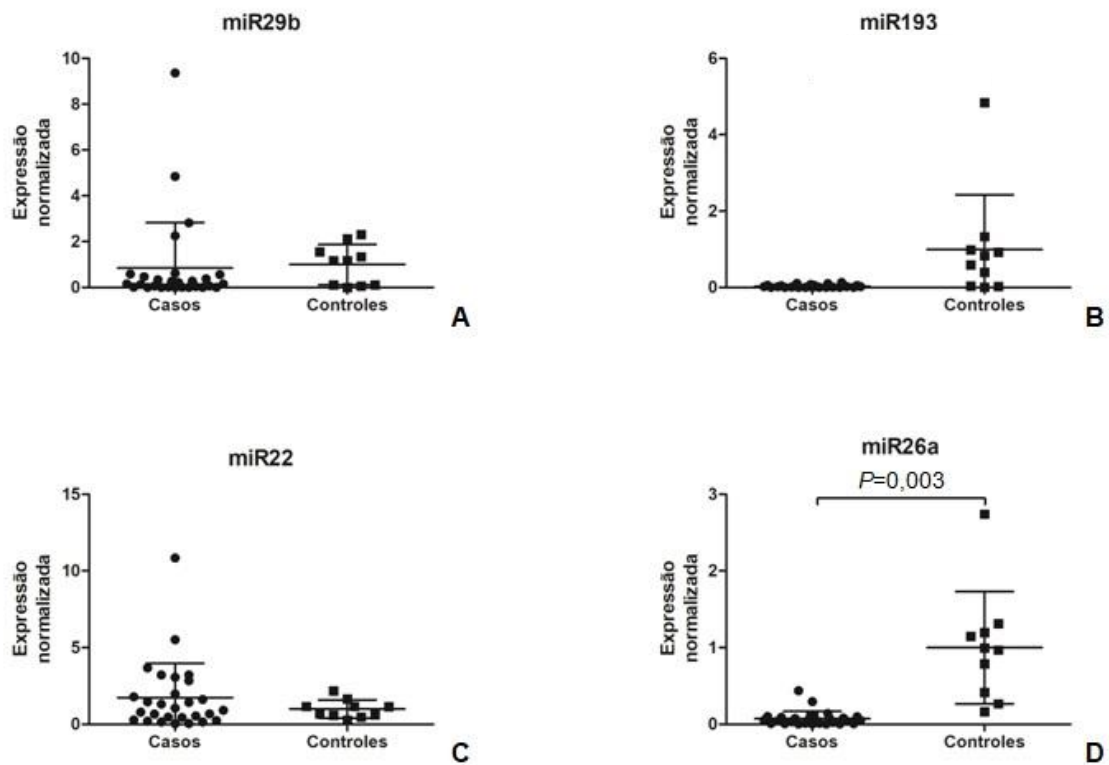


Figura 2: Expressão normalizada para os micros miR29b, miR193, miR22 e miR26a, comparando casos de SMD infantil e grupo controle. Cada símbolo representa a expressão de um paciente.

A análise estatística mostrou que houve diferença entre o total de pacientes com SMD infantil em comparação com o total de indivíduos do grupo controle apenas quanto a expressão do miR26a, que foi significativamente menor nos pacientes. Os resultados desta análise estão representados na Tabela 1.

Embora não tenha sido observada diferença significativa entre os grupos, dos três outros microRNAs analisados (miR29a, miR193 e miR22), todos os quatro testados apresentaram padrões de expressão alterados em pacientes em relação ao grupo controle, portanto, uma expressão individual alterada de miR29b, miR193 e de miR22, em relação ao padrão de expressão esperado.

Tabela 1: Valores de *P* obtidos pela comparação da expressão dos quatro miRNAs estudados em pacientes com SMD infantil e em controles.

mirRNA	<i>P</i>-value
miR29b	0,74
miR193	0,06
miR22	0,11
miR26a	0,003*

*=estatisticamente significante

Discussão

A SMD é um grupo de doenças heterogêneas tanto quanto aos mecanismos causais, quanto aos propulsores da sua evolução para leucemia aguda. É descrita como uma doença de idosos, por ser muito menos frequente em adultos jovens e rara em crianças e adolescentes. Estes aspectos tem motivado a investigação da SMD infantil, inclusive, sob um ponto de vista fundamentalmente envolvido na etiopatogênese e evolução da doença, o genético (6).

Defeitos nas células-tronco hematopoiéticas causadas por anormalidades citogenéticas e moleculares adquiridas são considerados evidências marcantes nas SMDs, e são utilizadas como marcadores em adultos. No entanto, a patogênese molecular da SMD infantil ainda não está esclarecida (3).

Neste contexto, alguns estudos recentes evidenciaram uma expressão aberrante de microRNAs potencialmente importantes em processos hematológicos normais, que foi relacionada ao fenótipo de pacientes adultos com SMD (15, 19). Embora o padrão de expressão do miR29b, do miR193, miR22 e do miR26a já tenha sido investigada em outras malignidades hematológicas, apenas do miR29b e do miR22 foram estudados em SMD, e em adultos. Em SMD infantil há uma única descrição da expressão de microRNA, referente ao miR22. Estes dados motivaram a seleção dos mesmos para este estudo.

Quanto a expressão do miR29b, que normalmente atua regulando fatores de transcrição para ocorrência da diferenciação mielóide normal, há apenas um estudo na literatura, realizado em pacientes adultos com SMD. Os resultados mostraram regulação negativa nos pacientes, ou seja, expressão diminuída, com consequentes efeitos antiapoptóticos em blastos mielóides, resultando no desenvolvimento da leucemia mielóide

aguda (15). No presente estudo 78% dos pacientes apresentaram o miR29b menos expresso do que no grupo controle, o que corrobora o resultado previamente descrito. Além disso, a região em que está localizado o miR29b (7q32.3) é uma região frequentemente observada como deletada em SMD infantil (15, 20). Portanto, pode ser sugerido que este microRNA apresenta importância pelo menos etiológica na SMD infantil, uma vez que nosso estudo foi realizado ao diagnóstico dos casos.

O miR193 tem ação supressora de tumor, reprimindo a expressão de múltiplos genes alvos, como a do *DNMT3a*. Este gene é fundamental no processo de metilação específica para diferenciação celular durante a hematopoese normal e também pode ter ação oncogênica, aumentando a expressão de genes como o *PTEN*, um oncogene associado à proliferação de blastos em pacientes com LMA (16, 18, 21). Um estudo realizado por Yonghui Li et al. (2013) mostrou a expressão do miR193, 7,5 vezes menor do que no grupo controle. Estes dados foram corroborados no presente estudo, em que a expressão do miR193 também foi menor, aproximadamente 95% menos expresso do que o grupo controle, sugerindo também uma associação entre a expressão desregulada do miR193 com um processo anormal de proliferação e diferenciação celular na SMD infantil.

O miR22, por sua vez, apresenta função supressora de tumor e oncogênica. Um único estudo analisou sua expressão em pacientes pediátricos. Diego et al (2015) observaram um aumento na sua expressão em pacientes com SMD infantil CR. A superexpressão desse microRNA foi correlacionada com a diminuição da expressão do gene *TET2* (12). Os resultados do nosso estudo estão de acordo com os dados previamente publicados, uma vez que o miR22 esteve altamente expresso em mais da metade dos casos analisados e a expressão relativa comparada com o grupo controle foi ~2 vezes maior na SMD infantil do que no grupo controle, reforçando a correlação entre sua expressão aumentada e a presença da doença.

Assim como os outros micros investigados nesse trabalho, o miR26a também está descrito como responsável pelo desenvolvimento de neoplasias, tanto quando aumenta ou diminui sua expressão (17). Por exemplo, Xianghui Fu et al. (2013), estudaram a expressão do miR26a comparada com os níveis de mRNA de todos os membros da família *TET* em tumor de pâncreas e observaram uma diminuição evidente na expressão de *TET2* relacionada ao aumento da expressão do miR26a (17). Por outro lado Zhang et al. (2014) observaram uma relação entre expressão diminuída do miR26a e sobrevida menor em câncer de pulmão. Ainda, a função supressora de tumor do miR26a foi observada em pacientes com Leucemia

Linfocítica Crônica (LLC) e a baixa expressão foi associada a um tempo de vida reduzido dos pacientes entre o momento do diagnóstico e o primeiro tratamento (22).

No presente estudo todos os pacientes analisados apresentaram expressão diminuída em relação ao grupo controle e essa diferença de expressão foi significativa, demonstrando que a expressão anormal do mir26a pode estar associada com a etiopatogenia da SMD infantil, o que o torna um potencial marcador de diagnóstico da doença.

Considerando-se que os microRNAs estudados podem também atuar como reguladores da hematopoese, os resultados obtidos permitem considerar miR29b, miR193, miR22 e miR26a como possíveis biomarcadores diagnósticos da SMD infantil, embora tal hipótese deva ser investigada em outros estudos que possam corroborar tais achados e esclarecer os mecanismos envolvidos na patogênese da SMD infantil, com objetivo de desenvolver terapias mais efetivas para os pacientes.

Financiamento: Este estudo foi financiado pela Coordenação de Aperfeiçoamento Pessoal de Nível Superior - CAPES.

Conflito de Interesse: Os autores declaram não haver conflitos de interesse. Não houve patrocinadores envolvidos no desenho do estudo, na coleta, análise ou interpretação dos dados, na redação do relatório ou na decisão de submeter o manuscrito para publicação.

Referências

- 1- Arber DA, et al. The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. *Blood*. 2016; 127 (19): 2391- 2405.
- 2- Zini G. Diagnostics and Prognostication of Myelodysplastic Syndromes. *Annals of laboratory medicine*. 2017. doi.org/10.3343/alm.2017.37.6.465.
- 3- Locatelli F, Strahm B. How I treat myelodysplastic syndromes of childhood. *Blood Journal*. 2018. doi 10.1182/blood-2017-09-765214, 2018.
- 4- Niemeyer CM, Kratz CP. Paediatric myelodysplastic syndromes and juvenile myelomonocytic leukaemia: molecular classification and treatment options. *British Journal of Haematology*. 2008; 140: 610- 624.
- 5- Niemeyer CM, Baumann I. Classification of Childhood Aplastic Anemia and Myelodysplastic Syndrome. *American Society of Hematology*. 2011; 84-89.
- 6- Umerez M, et al. Role of miRNAs in treatment response and toxicity of childhood acute lymphoblastic leukemia. *Pharmacogenomics*. 2018; ISSN 1462-2416.
- 7- Hasle H. Myelodysplastic and myeloproliferative disorders of childhood. *American Society of Hematology*. 2016; 598-604.
- 8- Diego F, et al. *TET2* expression level and 5-hydroxymethylcytosine are decreased in refractory cytopenia of childhood. *Leukemia Research*. 2015. doi:10.1016/j.leukres.2015.07.005.
- 9- Hou H, et al. Incorporation of mutations in five genes in the revised International Prognostic Scoring System can improve risk stratification in the patients with myelodysplastic syndrome. *Blood Cancer Journal*. 2018; 8 (39): 1-13.
- 10- Traina F, et al. Impact of molecular mutations on treatment response to *DNMT* inhibitors in myelodysplasia and related neoplasms. *Leukemia*. 2013. doi: 10.1038/leu.2013.269, 2013.
- 11- Vasilatou D, et al. Expression analysis of miR17-5p, miR20a and let-7a microRNAs and their target proteins in CD34+ bone marrow cells of patients with myelodysplastic syndromes. *Leukemia Research*. 2013; 37: 251– 258.
- 12- Chung SS, Hu W, Park CY. The role of microRNAs in hematopoietic stem cell and leukemic stem cell function. *Therapeutic Advances in Hematology*. 2011; 2(5): 317-334.
- 13- Liao R, et al. Molecular mechanism of microRNA involvement in genesis of myelodysplastic syndrome and its transformation to acute myeloid leukemia. *Hematology*. 2013; 18(4): 191-197.
- 14- Ngankeu A, Ranganathan P, Havelange V, et al. Discovery and functional implications of a miR29b-1/miR29a cluster polymorphism in acute myeloid leukemia. *Oncotarget*. 2018; 9(4): 4354-4365.
- 15- Kirimura S, Kurata M, Nakagawa Y, et al. Role of microRNA-29b in myelodysplastic syndromes during transformation to overt leukaemia. *Pathology*. 2016 ; 48(3): 233–241.
- 16- Gao X, Lin J, Li Y, et al. MicroRNA-193a represses c-kit expression and functions as a methylation-silenced tumor suppressor in acute myeloid leukemia. *Oncogene*. 2011; 30: 3416–3428.
- 17- Fu, X. et al. MicroRNA-26a targets ten eleven translocation enzymes and is regulated during pancreatic cell differentiation. *Pnas*. 2013;110 (44): 17892–17897.
- 18- Li, Y. et al. Epigenetic silencing of *microRNA-193a* contributes to leukemogenesis in t(8;21) acute myeloid leukemia by activating the *PTEN/PI3K* signal pathway. *Blood*. 2013; 121 (3).
- 19- Choi Y, et al. Expression and prognostic significance of microRNAs in Korean patients with myelodysplastic syndrome. *The Korean Journal of Internal Medicine*. doi10.3904/kjim.2016.239.

- 20- Weng H, Huang H, Dong B, et al. Inhibition of miR17 and miR20a by Oridonin Triggers Apoptosis and Reverses Chemoresistance by Derepressing BIM-S. *Cancer Research*. 2018. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-13-1748.
- 21- Gao X, Lin J, Li Y, et al. MicroRNA-193a represses c-kit expression and functions as a methylation-silenced tumor suppressor in acute myeloid leukemia. *Oncogene*. 2011; 30: 3416–3428.
- 22- D'Abundo L, et al. Anti-leukemic activity of microRNA-26a in a chronic lymphocytic leukemia mouse model. *Oncogene*. 2017. doi:10.1038/onc.2017.269.

5. CONCLUSÕES

- 1- A metilação do gene *SOX17* parece ser um evento frequente e possivelmente envolvido no curso inicial de SMDs e ICUS, o que o torna um potencial marcador de diagnóstico e prognóstico dessas doenças.
- 2- A diferença significativa na expressão dos microRNAs, miR126, miR29a, miR20a, miR19b, miR21, miR22 e miR193 em pacientes com SMDs em comparação ao grupo controle sugere que esses microRNAs são candidatos biomarcadores diagnósticos para SMDs em adultos, independente da classificação de risco. Seu envolvimento na evolução/prognóstico merece ser melhor investigado.
- 3- Considerando-se que os microRNAs miR29b, miR193, miR22 e miR26a podem também atuar como reguladores da hematopoese, os resultados obtidos permitem considerá-los como possíveis biomarcadores diagnósticos da SMD infantil, embora tal hipótese deva ser investigada em outros estudos que possam corroborar estes achados.

6. REFERÊNCIAS

- ARBER, D.A. et al. The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. *Blood*, v.127, n.19, p. 2391- 2405, 2016.
- BALGKOURANIDOU, I. et al. *SOX17* promoter methylation in plasma circulating tumor DNA of patients with non-small cell lung cancer. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*, v.54, n.8, p1385–1393, 2016.
- BISSELS, U. et al. MicroRNAs are shaping the hematopoietic landscape. *Haematologica*, v. 97, n.2, p.160-167, 2012.
- CHOI Y, et al. Expression and prognostic significance of microRNAs in Korean patients with myelodysplastic syndrome, *The Korean Journal of Internal Medicine*, doi10.3904/kjim.2016.239, 2017.
- CIABATTI, E. et al. Myelodysplastic syndromes: advantages of a combined cytogenetic and molecular diagnostic workup. *Oncotarget*, www.impactjournals.com/oncotarget, 2017.
- ERDOGAN B, et al. Diagnostic microRNAs in myelodysplastic syndrome. *Experimental Hematology*, v.39, p.915–926, 2011.
- FAN, R. et al. Abnormal methylation of the sex-determining region Y-box 17 (*SOX17*) promoter predicts poor prognosis in myelodysplastic syndrome. *Clinical Laboratory*, v.60, p.1465- 1474, 2014.
- FU, X. et al. MicroRNA-26a targets ten eleven translocation enzymes and is regulated during pancreatic cell differentiation. *Pnas*, v.110, n.44, p. 17892–17897, 2013.
- GAO, X. et al. MicroRNA-193a represses c-kit expression and functions as a methylation-silenced tumor suppressor in acute myeloid leukemia. *Oncogene*, v.30, p.3416–3428, 2011.
- GIDARO A, et al. Laboratory and clinical risk assessment to treat myelodysplastic syndromes. *Clin Chem Lab Med*. doi10.1515/cclm-2015-0789, 2016.
- GREENBERG PL, et al. Revised international prognostic scoring system for myelodysplastic syndromes. *Blood*, v.120, p.2454–65, 2012.
- HERSHKOVITZ-ROKAH, O. et al. Network analysis of microRNAs, genes and their regulation in diffuse and follicular B-cell lymphomas. *Oncotarget*, v.9, n.8, p. 7928-7941, 2018.
- ISSA, J.J. The myelodysplastic syndrome as a prototypical epigenetic disease. *Blood*, v.121, p.3811-3817, 2013.
- KIRIMURA, S. et al. Role of microRNA-29b in myelodysplastic syndromes during transformation to overt leukaemia. *Pathology*, v.48, n.3, p. 233–241, 2016.
- KUANG, X. et al. Deregulated microRNA expression and its pathogenetic implications for myelodysplastic syndromes. *Hematology*, doi10.1080/10245332.2016.1193962, 2016.
- LI, Y. et al. Epigenetic silencing of *microRNA-193a* contributes to leukemogenesis in t(8;21) acute myeloid leukemia by activating the *PTEN/PI3K* signal pathway. *Blood*, v. 121, n.3, 2013.
- LIU, J. et al. MiR181 regulates cisplatin-resistant non-small cell lung cancer via downregulation of autophagy through the *PTEN/PI3K/AKT* pathway. *Oncology Reports*, v 39, p.1631-1639, 2018.
- LOCATELLI, F.; STRAHM, B. How I treat myelodysplastic syndromes of childhood. *Blood Journal*, doi 10.1182/blood-2017-09-765214, 2018.
- MACEDO, L. C. et al. Genetics factors associated with myelodysplastic syndromes. *Blood Cells, Molecules and Diseases*, v.55, p.76–81, 2015.
- MOYO, T. K.; SAVONA, M.R. Molecular Testing in Patients with Suspected Myelodysplastic Syndromes. *Current Hematologic Malignancy Reports*, doi 10.1007/s11899-016-0356-8, 2016.

NGANKEU, A. et al. Discovery and functional implications of a miR29b-1/miR29a cluster polymorphism in acute myeloid leukemia. *Oncotarget*, v.9, n.4, p.4354-4365, 2018.

OLIVEIRA, M. J. V. Citogenética convencional e citogenética molecular na caracterização genética das síndromes mielodisplásicas – técnicas complementares ou alternativas? Dissertação Instituto de Ciências Biomédicas de Abel Salazar da Universidade do Porto, Prof. Doutor Sérgio Castedo Faculdade de Medicina da Universidade do Porto, 2009.

SCHANZ, J. et al. New Comprehensive Cytogenetic Scoring System for Primary Myelodysplastic Syndromes (MDS) and Oligoblastic Acute Myeloid Leukemia After MDS Derive From an International Database Merge. *Journal of Clinical Oncology*, v. 30, p. 820-829, 2012.

SHIH, A. H.; LEVINE, R. L. Molecular biology of myelodysplastic syndromes. *Seminars in Oncology*, v.5, p. 613-620, 2011.

SONG, Q. et al. Identify latent chromosomal aberrations relevant to myelodysplastic syndromes. *Nature*, v.7, n.10354, p. 1-8, 2017.

SONG, S. J. et al. The Oncogenic MicroRNA miR22 Targets the TET2 Tumor Suppressor to Promote Hematopoietic Stem Cell Self-Renewal and Transformation. *Cell Stem Cell*, v.13, p. 87–101, 2013.

TANG, C. Y. et al. Low *SOX17* expression: prognostic significance in de novo acute myeloid leukemia with normal cytogenetics. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*, v.52, n.12, p.1843–1850, 2014.

TIAN, Y. et al. Tumor Suppressor RASSF1A Promoter: p53 Binding and Methylation. *Plos One*. v.6, 2011.

VASILATOU, D. et al. Expression analysis of miR17-5p, miR20a and let-7a microRNAs and their target proteins in CD34+ bone marrow cells of patients with myelodysplastic syndromes. *Leukemia Research*, v. 37, p.251– 258, 2013.

YUN S, et al. Targeting epigenetic pathways in acute myeloid leukemia and myelodysplastic syndrome: a systematic review of hypomethylating agents trials. *Clinical Epigenetic*, v.8, n.68, p.1-9, 2016.

ZHANGA, T. et al. High bone marrow miR19b level predicts poor prognosis and disease recurrence in de novo acute myeloid leukemia. *Gene*, v.640, p. 79–85, 2018.

ZINI G. Diagnostics and Prognostication of Myelodysplastic Syndromes *Annals of laboratory medicine*. doi.org/10.3343/alm.2017.37.6.465, 2016.