



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de São José do Rio Preto

Fernanda de Souza Monteiro

Análise Citogenética e Investigação Molecular do Gene *RASSF1A* em
Indivíduos com Síndrome Mielodisplásica

São José do Rio Preto
2014

Fernanda de Souza Monteiro

Análise Citogenética e Investigação Molecular do Gene *RASSF1A* em
Indivíduos com Síndrome Mielodisplásica

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

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

São José do Rio Preto
2014

Monteiro, Fernanda de Souza.

Análise citogenética e investigação molecular do gene RASSF1A em indivíduos com síndrome mielodisplásica / Fernanda de Souza Monteiro. -- São José do Rio Preto, 2014
68 f. : il., tabs.

Orientador: Agnes Cristina Fett Conte
Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas

1. Biologia molecular. 2. Citogenética humana. 3. Síndromes mielodisplásicas. 4. Cromossomos - Aberrações. 5. Antioncogenes.
I. Fett-Conte, Agnes Cristina. II. Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho". Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas.
III. Título.

CDU – 576.3:575:616-006

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

Fernanda de Souza Monteiro

Análise Citogenética e Investigação Molecular do Gene *RASSF1A* em
Indivíduos com Síndrome Mielodisplásica

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

Comissão Examinadora

Prof^a. Dr^a. Agnes Cristina Fett Conte
UNESP – São José do Rio Preto
Orientador

Prof^a. Dr^a. Cláudia Regina Bonini Domingos
UNESP – São José do Rio Preto

Prof. Dr. Flávio Naoum
Instituto Naoum de Hematologia

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.

AGRADECIMENTOS

Desejo expressar os meus sinceros agradecimentos:

À Deus.

Aos meus pais, Luiz Fernando e Rosângela, pelo incentivo e oportunidade de realizar mais essa conquista, pela compreensão, amor e atenção.

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

Aos meus Tios Adalberto e Odete, pelos conselhos, oportunidade e anos que passamos juntos, e a toda a minha família- SP que mesmo distante torcem por mim.

Ao meu namorado Heitor Corssi, pela dedicação, paciência e demonstrações de amor e carinho nos meus dias mais difíceis.

À minha orientadora, Dra. Agnes Cristina Fett Conte pela confiança e oportunidade de desenvolver esta pesquisa, pela paciência, dedicação e por grandes ensinamentos que servirão sempre como inspiração.

Ao Dr. Octávio Ricci Junior e a toda equipe de médicos e enfermeiros do Serviço de Hematologia e Hemoterapia do Hemocentro de São José do Rio Preto, pela ajuda no desenvolvimento do projeto.

À Dra. Andrea Salles, pela paciência e ensinamentos durante as correções dos casos de citogenética analisados e pelas palavras de incentivo.

Ao Prof. Dr. Maurício Nogueira, pelo auxílio no desenvolvimento de parte desse estudo em seu laboratório e a sua aluna de doutorado Tatiana pelo auxílio técnico no sequenciamento.

À aluna de doutorada Paula Curi, pela paciência, atenção, e ensinamentos que foram fundamentais para o desenvolvimento do meu trabalho. E a todos os amigos do laboratório, Patrícia Nascimento, Ana Luiza Martins, Camila Oliveira, Dante Rosan, pelos momentos que passamos juntos.

A todos os membros da equipe do Laboratório de Genética: Brasilina Maffei, Cristina Vendrame, Paula Abdala e Valéria Ferrarese pelo carinho e compreensão.

A todos os meus amigos queridos, Dayane Boracini, Guilherme Scagion, Barbara Mamede, Bianca Ceron, Willian Barberino e aqueles que moram comigo, Fernanda Vital, Rodrigo Ziere, Hevila Brognaro, Maurício Zacarias, pelos momentos inesquecíveis, experiências compartilhadas, e toda a ajuda durante esses anos.

A todos os pacientes que aceitaram participar desse projeto, pela resignação e confiança.

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.

“Sempre permaneça aventureiro. Por nenhum momento se esqueça de que a vida pertence aos que investigam. Ela não pertence ao estático; Ela pertence ao que flui. Nunca se torne um reservatório, sempre permaneça um rio.” Osho

RESUMO

As Síndromes Mielodisplásicas (SMD) definem um grupo de doenças clonais das células hematopoéticas caracterizadas por citopenias, displasia em uma ou mais linhagens celulares mielóides, hematopoese ineficaz e aumento do risco de evolução para leucemia mielóide aguda. A frequência de doentes que progridem para o câncer varia com o subtipo de SMD, de acordo com a classificação da Organização Mundial da Saúde. As SMD são consideradas doenças pré-malignas e, ao contrário de outras doenças hematológicas, como as leucemias, estão geralmente associadas a anomalias cromossômicas desequilibradas. Estas consistem principalmente em deleções, translocações e alterações numéricas. Também são frequentemente observadas perdas de material genético, com consequente inativação de genes supressores tumorais. Estes genes controlam mecanismos biológicos vitais, como reparo do DNA, crescimento e morte celular programada. Um exemplo é o supressor de tumor *RASSF1A* (*Ras-association domain family 1, isoform A*), mapeado em 3p21.3. A falta de expressão deste gene e taxas elevadas de mutações, especialmente envolvendo os exons 3, 4 e 5, foram descritas em diversos tipos de câncer, mas nunca foram investigadas em SMD. Neste contexto, este projeto teve como proposta investigar a presença de alterações cromossômicas e de mutações nos exons 3, 4 e 5 do gene *RASSF1A* em indivíduos com SMD ao diagnóstico e em controles normais. Foram estudados 50 casos dos quais foram realizadas culturas de curta duração (24 horas) de células de medula óssea sem estimulação mitogênica e sequenciamento direto dos exons de interesse. Quatro casos (8%) apresentaram alterações cromossômicas, caracterizadas como hipodiploidia em dois casos, monossomia do cromossomo 7 em um e um cariótipo complexo envolvendo os cromossomos 3, 5 e 11 em outro. A análise molecular dos exons 3, 4 e 5 dos 50 casos revelou dois (4%) casos com o polimorfismo Ala133Ser (A133S) no exon 3, que apresentaram resultados citogenéticos normais. Nenhum dos 50 controles estudados apresentou esta alteração. As alterações citogenéticas observadas estão relacionadas com o desenvolvimento das SMD e o polimorfismo encontrado tem sido proposto como fator de predisposição para alguns tipos de câncer, entretanto, outros estudos em casuísticas maiores são necessários para estabelecer se o polimorfismo está envolvido na predisposição da SMD. Os resultados podem auxiliar outros estudos que estão à procura de fatores genéticos envolvidos na etiopatogênia das MDS.

Palavras chave: mielodisplasia, cromossomos, sequenciamento, supressor de tumor

ABSTRACT

The myelodysplastic syndromes (MDS) are characterized by cytopenias, dysplasia in one or more myeloid cell lines, ineffective hematopoiesis and an increased risk of acute myeloid leukemia (AML) transformation. The rate of patients who progress to AML varies by subtype of disease, according to the World Health Organization classification. The MDS are considered premalignant diseases and unlike of other hematological diseases, such as leukemia, are mostly associated with unbalanced chromosomal abnormalities, as deletions, translocations and numerical changes, beyond loss of genetic material with consequent tumor suppressor genes inactivation, which can control biological mechanisms such as DNA repair, growth and programmed cell death. An example is the tumor suppressor *RASSF1A* (Ras-association domain family 1, isoform A) mapped in 3p21.3. The high mutation rates and no expression of this gene, mainly exons 3, 4 and 5, have been described in several types of cancer but have never been investigated in MDS. Thereby chromosomal changes and mutations in exons 3, 4 and 5 from *RASSF1A* of the bone marrow cells from 50 cases the diagnosis of MDS were investigated. The assays were accomplished for 24 hours applying bone marrow cells without mitogenic stimulation and the exons were straight sequenced, where four samples (8%) had chromosomal abnormalities, characterized for hypodiploidy (two cases), monosomy 7 and complex karyotype involving chromosomes 3, 5 and 11. Molecular analysis revealed two (4%) other cases with Ala133Ser polymorphism (A133S) in exon 3. The cytogenetic changes observed are related to the MDS developed, while the polymorphism has been proposed to be involved in some types of cancers predisposition. The results can support other studies which are searching for genetic factors involved in the pathogenesis of MDS.

Keywords: myelodysplasia, chromosomal abnormalities, sequencing, tumor suppressor

Sumário

1. INTRODUÇÃO	12
1.1 Epidemiologia e classificação das Síndromes Mielodisplásicas	12
1.2 Genética das Síndromes Mielodisplásicas	14
2. OBJETIVOS	21
3. MATERIAL E MÉTODOS	23
3.1 Casuística	23
3.2.1 Análise citogenética	26
3.2.1.1 Obtenção de células da medula óssea e cultivo celular.....	26
3.2.1.2 Bandamento GTG	26
3.2.2. Estudo Molecular	27
3.2.2.1 Extração de DNA	27
3.2.2.2 Amplificação do gene <i>RASSF1A</i>	28
3.2.2.3 Purificação dos produtos de PCR para sequenciamento	28
3.2.2.4 Sequenciamento direto.....	28
3.2.2.5 Identificação de mutações	29
4. RESULTADOS	31
4.1 Resultados citogenéticos.....	31
4.2 Resultados moleculares	37
5. DISCUSSÃO	40
6. CONCLUSÕES.....	47
7. REFERÊNCIAS.....	49
8. APÊNDICE- Artigo	57

Lista de Figuras

Figura 1. Proporção das anormalidades cromossômicas mais comuns em relação ao total de casos diagnosticados com Síndromes Mielodisplásicas (SMD), e as previsões para o prognóstico de acordo com o índice de prognóstico internacional (Sistema Internacional de Escore de Prognóstico-IPSS).....	15
Figura 2. Principais vias de atuação do gene <i>RASSF1A</i> . <i>Rassf1a</i> se liga a microtúbulos, a proteínas que regulam a mitose, ciclo celular e apoptose em resposta aos estímulos mitogênicos e apoptóticos. A repressão das ciclinas A2 e D1 por <i>Rassf1a</i> resulta na parada do ciclo celular e as interações com os produtos de <i>CNK1</i> , <i>MST1</i> , <i>SAV</i> e <i>MOAP1</i> permitem a <i>RASSF1A</i> modular a apoptose.....	17
Figura 3. Localização do polimorfismo no exon 3 do gene <i>RASSF1A</i>	18
Figura 4 Metáfase hipodiplóide em bandamento GTG do caso 5 com 43 cromossomos.....	33
Figura 5. Metáfases em bandamento GTG do caso 7 (A e B); a flecha vermelha indica o único cromossomo do par 7, evidenciando a monossomia.....	34
Figura 6. Metáfases hipodiplóides em bandamento GTG do caso 22: (A) 45,XX,-8 e (B) 44,XX, 10,-12.....	35
Figura 7. Metáfases em bandamento GTG do caso 32 (A e B); a seta azul indica cromossomo 3 invertido, a seta verde aponta o cromossomo 5 com deleção do braço longo e a amarela indica o cromossomo 11 com deleção do braço longo.....	36
Figura 8. Gel de agarose 2% mostrando a amplificação do exon 3 do gene <i>RASSF1A</i> . Em 1 a DNA Ladder (100pb) que serve como referência para observar o tamanho do fragmento amplificado (231pb) das amostras (2 – 11).....	37
Figura 9. (A) Eletroferograma obtido no sequenciamento do exon 3 do caso 6 e (B) eletroferograma obtido no sequenciamento do exon 3 do caso 9. A parte superior das imagens apresenta a sequência padrão do exon 3 e a parte inferior os resultados do sequenciamento. A região destacada é o local da troca de base para ambos os casos.....	38
Figura 10. Eletroferograma do exon 5 do caso 10.....	38

Lista de Tabelas

Tabela 1. Classificação das SMD segundo a OMS, considerando os achados em sangue periférico (SP) e na medula óssea (MO).....	13
Tabela 2. Caracterização da casuística quanto à idade, sexo e diagnóstico de SMD.....	24
Tabela 3. Resultado do cariótipo dos casos com alterações cromossômicas.....	32

1. INTRODUÇÃO

1.1 Epidemiologia e classificação das Síndromes Mielodisplásicas

Síndromes Mielodisplásicas (SMD) refere-se a um grupo de doenças com alterações clonais de células hematopoéticas caracterizado por citopenias, displasia em uma ou mais linhagens celulares mieloides e hematopoese ineficaz. São doenças crônicas, pré-malignas, já consideradas por alguns autores como neoplasias, pelo risco elevado de desenvolvimento de leucemia mieloide aguda (LMA). A percentagem de doentes que progride para LMA varia substancialmente de acordo com o subtipo da doença. A maioria das SMD 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 (HAASE et al., 2008; PFEILSTÖCKER et al., 2007; BRUNNING et al., 2008; NAGOSHI et al., 2011; SCHILLER, REESE, 2013; TOTHOVA, STEENSMA, EBERT, 2013; ZARE-ABDOLLAHI et al., 2014).

A doença é mais frequente em pacientes idosos, entre 65 e 70 anos de idade. A incidência é de aproximadamente 20 em cada 100.000 e essa frequência pode aumentar se for considerada que a longevidade populacional é atualmente uma preocupação em saúde pública, e que está diretamente associada ao índice de desenvolvimento de alguns países (RAZA, GALILI, 2012; GERMING et al., 2013; ZEIDAN et al., 2013).

As SMD são divididas em subtipos e a classificação mais utilizada é a da Organização Mundial da Saúde (OMS), revisada em 2008, que considera oito tipos: Anemia Refratária (AR); Anemia Refratária com Sideroblastos em Anel (ARSA); Citopenia Refratária com Displasia Multilinhagem (CRDM); Citopenia Refratária com Displasia Multilinhagem com Sideroblastos em Anel (CRDM-SA); Anemia Refratária com Excesso de Blastos 1 (AREB-1); Anemia Refratária com Excesso de Blastos 2 (AREB-2); SMD sem classificação e SMD Associada com del(5q) (MALCOVATI, NIMER, 2008; BURBURY, WESTERMAN, 2013). A Tabela 1 apresenta a classificação e caracterização destas doenças segundo a OMS.

Tabela 1. Classificação das SMD segundo a OMS, considerando os achados em sangue periférico (SP) e na medula óssea (MO).

Tipo	SP	MO
Anemia Refratária (AR)	-Anemia -Blastos ausentes ou raros	-Somente células eritróides displásicas - <5% de blastos - <15% de sideroblastos em anel
Anemia Refratária com Sideroblastos em Anel (ARSA)	-Anemia -Blastos ausentes	- <5% de blastos - \geq 15% de sideroblastos em anel
Citopenia Refratária com Displasia Multilinhagem (CRDM)	-Bi ou pancitopenia - Blastos ausentes ou raros - Monócitos < 1.000/ μ l	-Displasia em \geq 10% das células em duas ou mais linhagens mielóides - <5% de blastos - <15% de sideroblastos em anel
Citopenia Refratária com Displasia Multilinhagem com Sideroblastos em Anel (CRDM-SA)	-Bi ou pancitopenia -Blastos ausentes ou raros -Monócitos <1,000/ μ l	-Displasia em \geq 10% das células em duas ou mais linhagens mielóides - < 5% de blastos - \geq 15% de sideroblastos em anel
Anemia Refratária com Excesso de Blastos 1 (AREB-1)	-Citopenia - < 5% blastos - Monócitos <1,000/ μ l	-Displasia em uma ou multilinhagens - 5% a 9% de blastos
Anemia Refratária com Excesso de Blastos 2 (AREB-2)	-Citopenia - 5% a 19% de blastos -Monócitos < 1,000/ μ l	-Displasia em uma ou multilinhagens - 10% to 19% de blastos
SMD Associada com del(5q)	-Anemia - < 5% blastos -Número de plaquetas normal ou aumentado	-Aumento de megacariócitos com núcleo hipolobulado - <5% de blastos em del(5q) isolada
SMD sem classificação	-Citopenia -Anemia -Blastos ausentes; raros	-Displasia em uma linhagem, nos granulócitos ou megacariócitos - <5% de blastos

As SMD 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 a outros solventes, ao óleo diesel, pesticidas, fumaças e o uso de imunossupressores (COREY et al., 2007; NIMER, 2008; BARZI, SEKERES, 2010; ZACHAKIA et al., 2013).

O diagnóstico da doença é concluído com o estudo morfológico das células da MO, com o mielograma ou biópsia, e estudo citogenético, com o exame do cariótipo. Assim, o conjunto das características clínicas como, porcentagem de blastos, avaliação das citopenias e anormalidades citogenéticas compõe atualmente o escore de risco denominado IPSS-*International Prognostic Scoring System*, que auxilia a categorização de risco, de acordo com as condições biológicas apresentadas pelos pacientes (GREENBERG, 2013; MISHRA, et al., 2013; PELLAGATTI et al., 2013).

1.2 Genética das Síndromes Mielodisplásicas

Alterações citogenéticas específicas podem ser observadas em quase metade dos casos *de novo* (30-50%). As mais frequentes são as deleções e as alterações numéricas, que são observadas em cerca de 50% e de 10% dos casos, respectivamente. Nas SMD secundárias aproximadamente 80% dos casos apresentam alterações cromossômicas diversas (POZDNYAKOVA, 2008; CHAUBEY et al., 2011; TIAN et al., 2011; RAZA, GALILI, 2012; ZACHAKIA et al., 2013).

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 (KEEN-KIM et al., 2008; CHAUBEY et al., 2011; RAZA, GALILI, 2012). As alterações podem ocorrer como anormalidades isoladas, ou combinando duas ou mais alterações determinando um cariótipo anormal complexo (SCHANZ et al., 2012). A Figura 1 apresenta a proporção de alterações encontradas em SMD e o prognóstico relacionado a cada uma delas.

Embora as translocações equilibradas sejam alterações relativamente comuns em doenças mielóides, como em LMA, em SMD são raras, sendo observadas em 4% dos casos (TIAN et al., 2011).

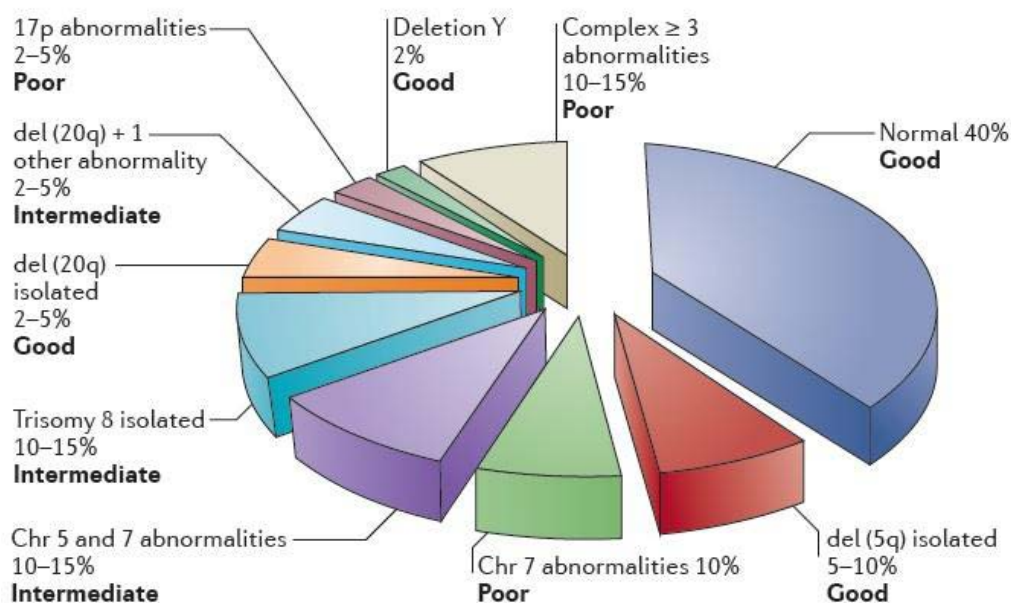


Figura 1- Proporção das anormalidades cromossômicas mais comuns em relação ao total de casos diagnosticados com Síndromes Mielodisplásicas (SMD), e as previsões para o prognóstico de acordo com o índice de prognóstico internacional (Sistema Internacional de Escore de Prognóstico-IPSS) (RAZA, GALILI, 2012).

No componente citogenético do IPSS, 86% das alterações cromossômicas podem ser classificadas de acordo com o seu impacto no prognóstico (SCHANZ, et al., 2012). A nova classificação revista do IPSS considera as anormalidades citogenéticas em cinco grupos de prognósticos: 1) prognóstico muito bom para pacientes que apresentam deleção em 11q ou perda do cromossomo Y como única alteração; 2) bom prognóstico para aqueles com cariótipo normal ou alterações isoladas, como deleção em 5q, em 12p ou deleção em 20q, ou ainda, com duas alterações e deleção em 5q; 3) prognóstico intermediário, com alterações isoladas como deleção ou inversão 7q, trissomia do 8, 19 ou 21, ou qualquer outra anormalidade isolada; 4) prognóstico ruim para aqueles com translocação envolvendo 3q, duas anormalidades incluindo deleção em 7q, ou monossomia do 7, e cariótipo complexo com três alterações, e 5) prognóstico muito ruim para pacientes com cariótipo complexo com mais de três alterações (ADEMÀA et al., 2013).

Portanto, a citogenética desempenha um papel importante no diagnóstico e prognóstico de pacientes com SMD (BAJAJ et al., 2011). No entanto, mais da metade dos

pacientes apresentam cariótipos normais e, em alguns casos, pacientes com as mesmas anormalidades cromossômicas podem ser clinicamente heterogêneos. É provável que mutações gênicas específicas estejam associadas e resultem em fenótipos diferentes. A identificação destas mutações e compreensão dos seus efeitos deletérios pode auxiliar no diagnóstico da doença, com a descoberta de biomarcadores, e na prática clínica, com alvos terapêuticos mais específicos (LI et al., 2010; BEJAR et al., 2011 BURBURY, WESTERMAN, 2013; TRAINA et al., 2013).

A utilização de técnicas genéticas mais específicas e sensíveis conduziu a descoberta de novos genes que podem estar envolvidos na etiopatogenia das SMD. O sequenciamento de alguns genes candidatos, por exemplo, foi capaz de identificar alterações recorrentes envolvidas no curso biológico da doença (ABDEL-WAHAB, FIGUEROA, 2012; KULASEKARARAJ, MOHAMEDALI, MUFTI, 2013). Diversas mutações pontuais, deleções e alterações epigenéticas têm sido observadas em genes que desempenham funções celulares distintas, como por exemplo: fatores de transcrição (*TP53*, *RUNX1* e *ETV6*), reguladores de fatores epigenéticos e remodelação da cromatina (*TET2*, *DNMT3a*, *ASXL1*, *IDH1/2* e *EZH2*), fatores de *splicing* de pré-mRNA (*SF3B1*, *U2AF* e *SRSF2*) e moléculas de sinalização (*NRAS*, *JAK2* e *NPM1*). É estimada uma frequência de cerca de 50% dos casos de SMD com pelo menos uma mutação (TOTHOVA, STEENSMA, EBERT, 2013).

Entre as alterações moleculares frequentemente encontradas estão mutações de ponto nos oncogenes *RUNX1* e *NRAS*, com frequências de 15% e 10% dos casos de SMD, respectivamente, as duplicações em *tandem* no gene *FLT3* (5% dos casos), a metilação do promotor do gene *p15* (30-50% dos casos) e a deleção com inativação do gene supressor de tumor *TP53* (5-10% dos casos) (OLIVEIRA, 2009; LEVINE, 2011; RAZA, GALILI, 2012; TOTHOVA, STEENSMA, EBERT, 2013).

Os genes supressores tumorais atuam no controle da divisão e diferenciação celular; controlam o crescimento e a morte celular programada, e têm ação no reparo de danos ao DNA. A perda de função destes genes pode ocorrer por deleções e mutações pontuais, que levam à perda da heterozigose, ou pelo silenciamento transcricional resultante de metilação alterada de elementos controladores destes genes (OLIVEIRA, 2009; KHALID et al., 2013).

Os genes supressores de tumor se destacam nas pesquisas sobre a etiopatogênese do câncer e das condições pré-malignas. Um exemplo é o supressor de tumor *RASSF1A* (*Ras-association domain family 1, isoform A*). Ele está localizado em 3p21.3 e apresenta oito éxons (1 α , 1 β , 2 $\alpha\beta$, 2 γ , 3, 4, 5 e 6). Codifica uma proteína supressora de tumor (Rassf1a) capaz de

mediar, por interações moleculares específicas, três importantes processos celulares: estabilidade do microtúbulo, progressão do ciclo celular e indução à apoptose, (KORAH et al., 2013).

A perda da função do gene *RASSF1A* leva à progressão acelerada do ciclo celular e resistência aos sinais apoptóticos (AMIN, BANERJEE, 2012 ZARE-ABDOLLAHI et al., 2014). A dinâmica das funções celulares desempenhadas pelo gene, que envolve interações moleculares com vários outros genes, como por exemplo, o gene *RAS*, também é comprometida (DONNINGER et al., 2011; HESSON et al., 2007; RICHTER et al., 2009 ZARE-ABDOLLAHI et al., 2014) (Figura 2).

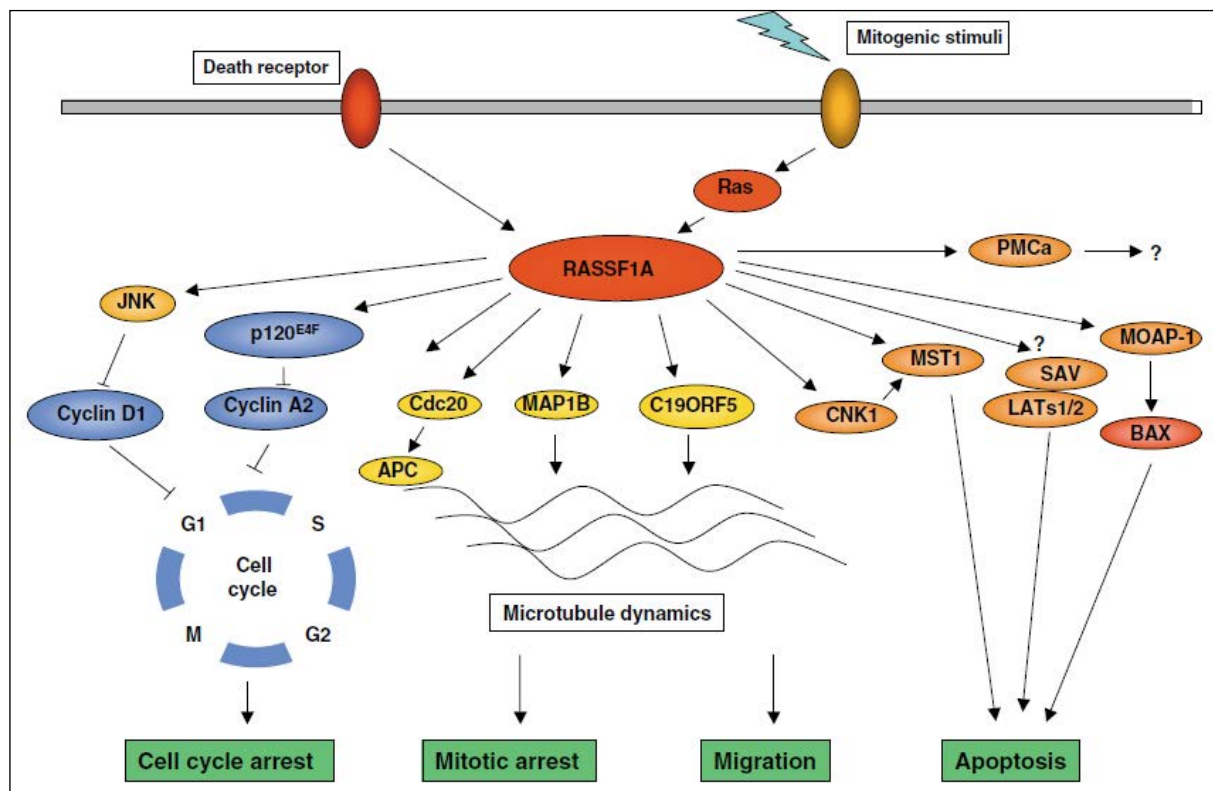


Figura 2. Principais vias de atuação do gene *RASSF1A*. *Rassf1a* se liga a microtúbulos, a proteínas que regulam a mitose, ciclo celular e apoptose em resposta aos estímulos mitogênicos e apoptóticos. A repressão das ciclinas A2 e D1 por *Rassf1a* resulta na parada do ciclo celular e as interações com os produtos de *CNK1*, *MST1*, *SAV* e *MOAPI* permitem a *RASSF1A* modular a apoptose (DONNINGER, 2011).

A inativação epigenética das ilhas CpG da região promotora do gene *RASSF1A* apresenta relação significativa com a ocorrência de diversos tipos de neoplasias malignas,

como de pulmão, de fígado, bexiga, mama, próstata, glioma, ovário e neuroblastoma. Inclusive, muitos estudos têm proposto a metilação do *RASSF1A* como potencial marcador diagnóstico ou de prognóstico, demonstrando que o fenótipo neoplásico pode ser revertido quando o gene supressor de tumor é novamente expresso nas células malignas (UNDERHILL-DAY et al., 2011; AMIN, BANERJEE, 2012; AGARWAL et al., 2013).

No entanto, não apenas a perda da expressão gênica pela hipermetilação, mas também a ocorrência de mutações no *RASSF1A*, especialmente nos exons 3, 4 e 5, sugerem sua participação no desenvolvimento de alguns tipos de câncer. Mutações de ponto já foram observadas em carcinoma de pulmão, rim, pâncreas, mama e próstata (KASHUBA et al., 2009).

Um estudo realizado por KASHUBA et al (2009) investigou os exons 1 e 2 do *RASSF1A* em amostras de diferentes tipos de câncer e detectaram uma taxa mutacional de 0,23. Se forem considerados os exons 3, 4 e 5 a frequência de mutações é ainda maior, de 0,29, provavelmente devido à presença elevada de CG nestes locais.

Alguns estudos observaram a presença de polimorfismos do gene *RASSF1A* em células tumorais. Um exemplo é o Ala133Ser, troca de uma única base nitrogenada, uma guanina (G) por uma timina (T) localizada na primeira posição do códon 133 do exon 3. Estudos recentes buscam encontrar uma associação do polimorfismo com predisposição para a ocorrência de alguns tipos de câncer, como por exemplo, câncer de pulmão, mama, colorretal e de cabeça e pescoço (ZHOU et al., 2013). A Figura 3 mostra a localização deste polimorfismo no *RASSF1A*.

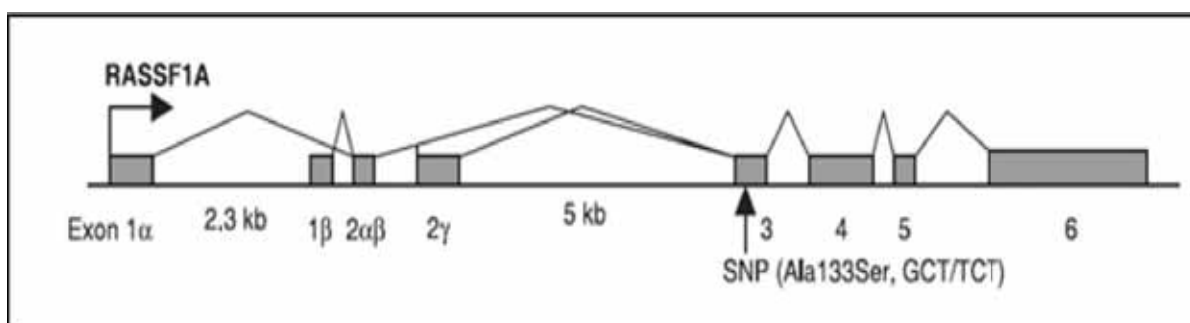


Figura 3. Localização do polimorfismo no exon 3 do gene *RASSF1A* (KANZAKI et al., 2006).

Foi encontrada somente uma descrição na literatura da investigação do gene *RASSF1A* em SMD. Os autores estudaram o padrão de metilação do gene e observaram inativação em homozigose do mesmo em cinco (9%) dos 55 casos avaliados, uma frequência considerada alta. Mas, o estudo foi realizado apenas no sangue periférico dos doentes, não nas células da

MO (JOHAN et al., 2005). Embora não tenham sido encontrados estudos de mutações/polimorfismos no gene *RASSF1A* em SMD, estudos em outras neoplasias hematopoéticas, como mieloma múltiplo, demonstraram alterações em genes que participam da via do *RASSF1A*, ou podem se associar a ele de alguma forma (NG et al., 2003; MURATI et al., 2012).

Assim, não apenas o padrão de metilação do *RASSF1A*, mas mutações raras e polimorfismos também podem estar envolvidos direta ou indiretamente na causa ou na evolução das SMD. A doença é clinicamente heterogênea e o seu tratamento é adaptado para cada paciente de acordo com alguns protocolos terapêuticos, o que exige uma previsão acurada do prognóstico para cuidados mais específicos (BEJAR et al., 2011).

A hipótese científica que foi testada neste projeto é que, além de alterações cromossômicas, mutações nos éxons 3, 4 e 5 do gene *RASSF1A* também podem ser observadas em SMD, e estas alterações, relacionadas ou não, podem estar envolvidas na etiopatogenia dessas doenças.

2. OBJETIVOS

Geral:

Investigar alterações cromossômicas e mutações no gene *RASSF1A* em células da medula óssea de indivíduos com Síndromes Mielodisplásicas.

Específicos:

1. Analisar o cariótipo das células da medula óssea de indivíduos com SMD ao diagnóstico, por bandamento GTG;
2. Avaliar a presença de mutações nos éxons 3, 4 e 5 do gene *RASSF1A* por sequenciamento direto, nas células da medula óssea de indivíduos com SMD ao diagnóstico;
3. Comparar os achados moleculares com um grupo controle;
4. Relacionar os achados cariotípicos e moleculares, assim como com possível evolução para LMA durante o período do estudo.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Casuística

Após aprovação do comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da FAMERP, foi realizado um estudo prospectivo descritivo de amostras de medula óssea (MO) de 50 indivíduos com diagnóstico de síndrome mielodisplásica primária (*de novo*), de acordo com a classificação da OMS, ao diagnóstico, sem tratamento quimio e/ou radioterápico prévios, atendidos no período de março de 2012 a setembro de 2013.

As coletas de células da MO foram realizadas por profissionais habilitados, médicos hematologistas, responsáveis pelo atendimento dos pacientes no Serviço de Hematologia e Hemoterapia do Hospital de Base de São José do Rio Preto. As amostras foram obtidas de partes daquelas utilizadas nos procedimentos médicos hematológicos de rotina, aos quais os pacientes são necessária e rotineiramente submetidos. Portanto, não foi necessário submeter os pacientes a coletas adicionais.

Só foram incluídas aquelas obtidas de pacientes que concordaram em participar do estudo e assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido-TCLE, obtido pelas pesquisadoras ou pelos médicos hematologistas. Os resultados foram disponibilizados para os hematologistas e sua aplicação clínica ou não seguiu os critérios da equipe médica.

A idade dos indivíduos analisados variou de três e 89 anos (média = 51,14 e DP = 18,78), 20 eram homens e 30 mulheres, todos atendidos no Serviço de Hematologia e Hemoterapia do Hospital de Base de São José do Rio Preto, SP. A Tabela 2 apresenta a caracterização da casuística, com relação à idade, sexo e tipo de SMD.

O diagnóstico de SMD seguiu os critérios da Organização Mundial da Saúde (OMS), revisada em 2008, e foi realizado por dois hematologistas que, de forma independente, analisaram o hemograma, o mielograma e exames complementares.

Dos 50 casos, foram diagnosticados 31 com Citopenia Refratária com Displasia Multilinhagem (CRDM), 14 com Anemia Refratária com Excesso de Blastos-1 (AREB-1), quatro com Anemia Refratária com Excesso de Blastos-2 (AREB-2) e um caso com Anemia Refratária (AR).

Como controles, para comparação de resultado molecular, após obtenção do TCLE, foram utilizadas amostras de DNA de sangue periférico de 50 indivíduos saudáveis, doadores de sangue do Hemocentro de São José do Rio Preto, que foram convidados a participar quando compareceram para doação.

Tabela 2. Caracterização da casuística quanto à idade, sexo e diagnóstico de SMD.

Caso	Idade (anos)	Sexo	Diagnóstico
1	63	M	CRDM
2	41	M	AREB1
3	39	F	CRDM
4	55	M	CRDM
5	35	M	CRDM
6	23	F	CRDM
7	3	F	AREB1
8	62	M	CRDM
9	70	M	AREB1
10	73	F	CRDM
11	54	F	AREB1
12	62	F	CRDM
13	56	M	CRDM
14	15	M	AREB1
15	45	M	AREB1
16	31	M	AREB1
17	74	F	AREB2
18	51	F	CRDM
19	22	M	AREB2
20	76	F	CRDM
21	28	F	CRDM
22	82	F	CRDM
23	69	F	CRDM
24	48	F	CRDM
25	44	M	CRDM
26	35	F	CRDM
27	67	F	CRDM
28	42	F	CRDM
29	66	F	CRDM
30	70	F	CRDM
31	63	F	AREB1
32	69	F	AREB1
33	50	F	AR
34	50	M	CRDM
35	46	M	CRDM
36	12	M	CRDM
37	69	M	CRDM
38	65	M	AREB1
39	70	M	AREB1
40	57	F	AREB1
41	56	F	CRDM
42	29	F	CRDM

F=feminino; M= masculino; CRDM= Citopenia Refratária com Displasia Múltipla; AREB1= Anemia Refratária com Excesso de Blastos 1; AREB2= Anemia Refratária com Excesso de Blastos 2.

Tabela 2. Caracterização da casuística quanto à idade, sexo e diagnóstico de SMD.

43	52	F	AREB2
44	63	F	AREB1
45	39	F	CRDM
46	51	F	CRDM
47	47	M	CRDM
48	30	M	AREB1
49	49	F	CRDM
50	89	F	AREB2

F=feminino; M= masculino; CRDM= Citopenia Refratária com Displasia Múltipla; AREB1= Anemia Refratária com Excesso de Blastos 1; AREB2= Anemia Refratária com Excesso de Blastos 2.

3.2.1 Análise citogenética

3.2.1.1 Obtenção de células da medula óssea e cultivo celular

Foram realizadas culturas de células da MO (do osso esterno ou ilíaco), obtidas por punção aspirativa com seringa, de acordo com o procedimento médico padronizado. Para cada indivíduo foi realizada cultura de curta duração (24 horas) de MO, sem estimulação mitogênica (sem fito-hemaglutinina - PHA).

Foram montados pelo menos dois frascos de cultura para cada caso, cada um contendo 5,0ml de meio RPMI 1640, 2,0ml 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 desse tempo foram adicionados 100µl de Colchicina (5µl/ml).

Após o cultivo o material foi centrifugado por 08 minutos a 1.000rpm e o sobrenadante retirado. Em seguida, 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, realizada a fixação com metanol e 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 1.000 rpm por 08 minutos.

Após o cultivo por 24 horas, parte do material obtido foi gotejada em lâminas úmidas e geladas, que foram envelhecidas por 20 minutos em estufa a 87°C e, posteriormente, submetidas à técnica de bandamento GTG.

3.2.1.2 Bandamento GTG

A análise citogenética foi realizada em metáfases submetidas à técnica de bandamento GTG segundo GROUCHY & TURLEAU (1984), com modificações. O material fixado nas lâminas foi tratado em solução de tripsina (60mL de PBS e, aproximadamente, 0,12g de tripsina) a 27°C 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.

Pelo menos 20 metáfases de cada amostra foram analisadas em microscópio com aumento de 1.000 vezes e todas as análises foram corrigidas pela orientadora do trabalho (segundo observador).

Os achados citogenéticos foram descritos conforme a ISCN (2013) e fotografados.

3.2.2. Estudo Molecular

Após extração do DNA pela técnica *salting-out*, os exons do gene de interesse foram amplificados por PCR (*Polymerase Chain Reaction*- Reação em Cadeia da Polimerase) e a sequência dos mesmos foi determinada por sequenciamento direto. A sequência obtida foi comparada com a de referência para o gene, depositada no *National Center for Biotechnology Information* (NCBI - <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>), para detecção de mutações e polimorfismos.

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. (1988), 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, e o material transferido com pipeta Pasteur descartável para outro tubo; o volume de 15ml foi completado com PBS1X e nova centrifugação realizada a 3.500rpm por 12 minutos. O sobrenadante foi retirado com pipeta Pasteur descartável, o “pellet” ressuspensionado e novamente completado o volume de 15ml com PBS1X. O material foi, então, centrifugado a 3.500rpm por 12 minutos e o sobrenadante recolhido com pipeta descartável. O “pellet” foi ressuspensionado 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 a 37°C *overnight*.

Ao “pellet” foi acrescentado 1,0ml de NaCl 6M saturado, o tubo 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 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, que foram então “pescados” e colocados em um *eppendorf* de 1,5ml com 500µl de etanol a 70% gelado. O material foi centrifugado a 14.000rpm por três minutos, o etanol 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 foi realizada pela leitura em espectrofotômetro *NanoDrop ND 1000*.

3.2.2.2 Amplificação do gene *RASSF1A*

A amplificação do gene *RASSF1A* foi realizada pela técnica de *Polymerase Chain Reaction* (PCR). O desenho dos oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) específicos para a amplificação dos exons do gene *RASSF1A* contou com o auxílio do Prof. Dr. Maurício Lacerda Nogueira, do Laboratório de Virologia (FAMERP), colaborador do estudo. As sequências de bases dos *primers* utilizados para amplificação dos exons estão apresentadas nos Quadros 1, 2, 3 e 4.

3.2.2.3 Purificação dos produtos de PCR para sequenciamento

Os produtos obtidos em todas as reações de PCR foram purificados com etanol, de acordo com metodologia descrita por SAMBROOK, RUSSEL, 2001.

3.2.2.4 Sequenciamento direto

As amostras amplificadas e purificadas foram submetidas ao sequenciamento automático em sequenciador de capilaridade *3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems)*.

As sequências do exons 3, 4 e 5 do gene *RASSF1A* foram determinadas utilizando-se o kit *Big Dye Terminator v3.1 (Applied Biosystems, USA)*, segundo recomendações do fabricante.

Primer	<i>Primers 5' a 3'</i>	Tamanho do amplicon (pb)
<i>Sense</i>	GCCAAAGGCAGTCAGTTTCC	231
<i>Antisense</i>	CCCCTTCCTGAGCAGTCAAC	

Quadro 1. Sequência de amplificação dos *primers* para o exon 3.

Primer	<i>Primers 5' a 3'</i>	Tamanho do amplicon (pb)
<i>Sense</i>	GGAACCTATTATCAAGGTTTGGTTT	220
<i>Antisense</i>	AGCATCCTTGGGCAGGTAAA	

Quadro 2. Sequência de amplificação dos primers (1) para o exon 4.

Primer	<i>Primers 5' a 3'</i>	Tamanho do amplicon (pb)
<i>Sense</i>	CCGCACTTCCTTTTACCTGC	202
<i>Antisense</i>	CATGCTCAGGTGCATGCGTA	

Quadro 3. Sequência de amplificação dos primers (2) para o exon 4.

Primer	<i>Primers 5' a 3'</i>	Tamanho do amplicon (pb)
<i>Sense</i>	TGATCATTACTTCCCCTTCACAGT	174
<i>Antisense</i>	AGTGACAACCAAGAACTAAGAACT	

Quadro 4. Sequência de amplificação dos primers para o exon 5.

3.2.2.5 Identificação de mutações

A sequência obtida para o gene foi comparada com a sequência de referência correspondente depositada no NCBI (ID: 11186), com a utilização da ferramenta BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*).

4. RESULTADOS

Foram recebidas amostras de MO e realizado o estudo citogenético de 50 casos com diagnóstico confirmado de SMD ao diagnóstico. Para o estudo molecular foram investigadas amostras de DNA dos 50 casos (exons 3,4 e 5) e de 50 controles (exon 3).

A maioria (60%) dos indivíduos estudados era do sexo feminino e acima de 50 anos de idade, com 28% deles em idades igual ou superior a 65 anos. Além disso, a maioria (62%) apresentava o subtipo Citopenia Refratária com Displasia Multilinhagem (CRDM).

4.1 Resultados citogenéticos

A análise citogenética revelou que dos 50 indivíduos, 46 (92%) apresentaram células com cariótipos normais (46,XX ou 46,XY) no nível de resolução da técnica utilizada. Em quatro casos foram observadas alterações cromossômicas clonais. A Tabela 3 apresenta os resultados dos cariótipos alterados.

O caso 5, um homem com 35 anos de idade, com diagnóstico de SMD CRDM, apresentou hipodiploidia, observada na contagem de cromossomos, cujo número variou de 41 a 45 em 40% das 20 metáfases íntegras analisadas. A Figura 4 apresenta uma metáfase hipodiplóide em bandamento GTG com 43 cromossomos (43,XY,-6,-12,-13).

No caso 7, uma menina com três anos de idade e diagnóstico de SMD AREB-1, foi observada monossomia do cromossomo 7 em 100% das 20 metáfases analisadas (Figura 5A e B).

Uma mulher com 82 anos de idade e diagnóstico de SMD CRDM, caso 22, apresentou hipodiploidia, com a contagem de cromossomos variando de 43 a 45 em 30% das 20 células analisadas. A Figura 6 A e B mostra duas metáfases hipodiplóides.

Três alterações foram detectadas no caso 32, uma mulher com 69 anos e diagnóstico de SMD AREB-1, que caracterizaram um cariótipo complexo, com inversão paracêntrica do braço longo do cromossomo 3, deleção do braço longo do cromossomo 5 [del(5q)], e deleção do braço longo do cromossomo 11[del(11)(q14)] (Figura 7, A e B).

Tabela 3. Resultado do cariótipo dos casos com alterações cromossômicas.

Caso	Cariótipo
5	41~45,XY[8]/46,XY[12]
7	45,XX,-7[20]
22	43~45,XX[6]/46,XX[14]
32	41~46,XX,inv(3q),del(5q), del(11)(q14)[6]/46,XX [15]

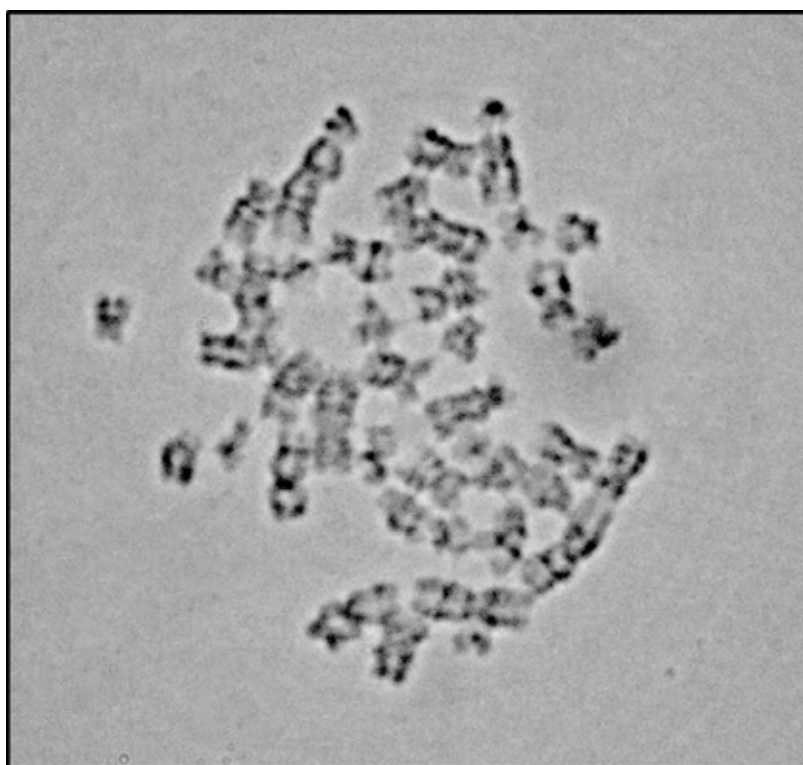


Figura 4. Metáfase hipodiplóide em bandamento GTG do caso 5 com 43 cromossomos.

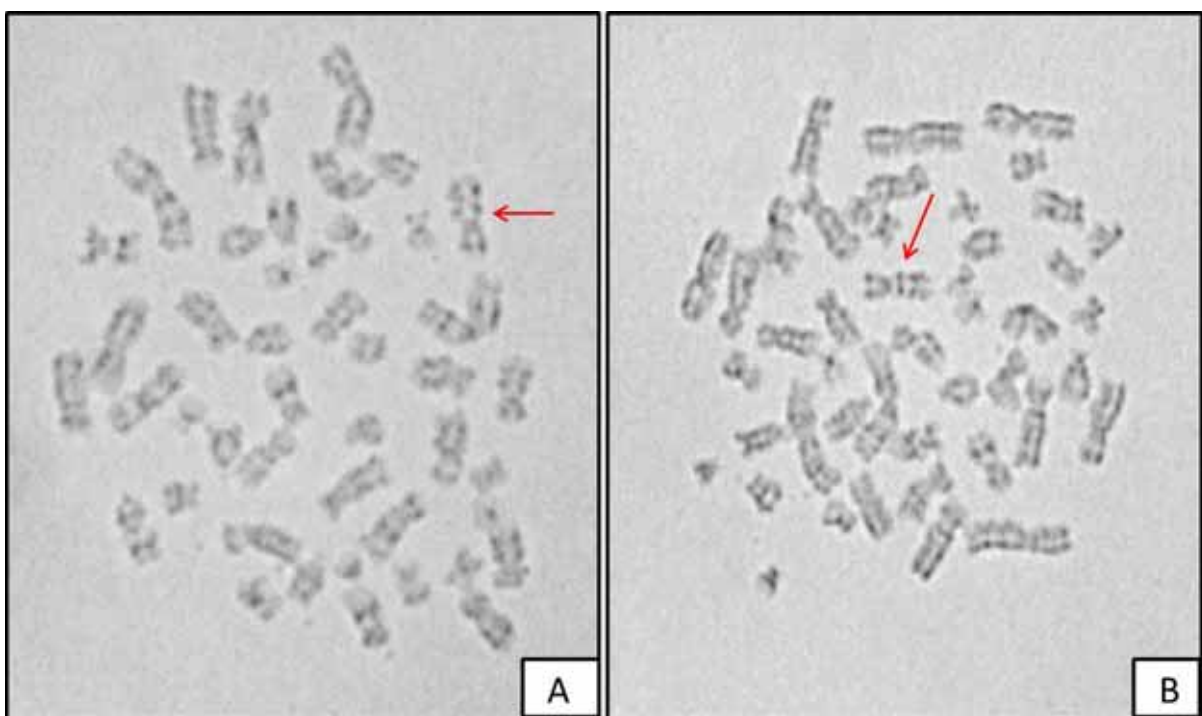


Figura 5. Metáfases em bandamento GTG do caso 7 (A e B); a flecha vermelha indica o único cromossomo do par 7, evidenciando a monossomia.

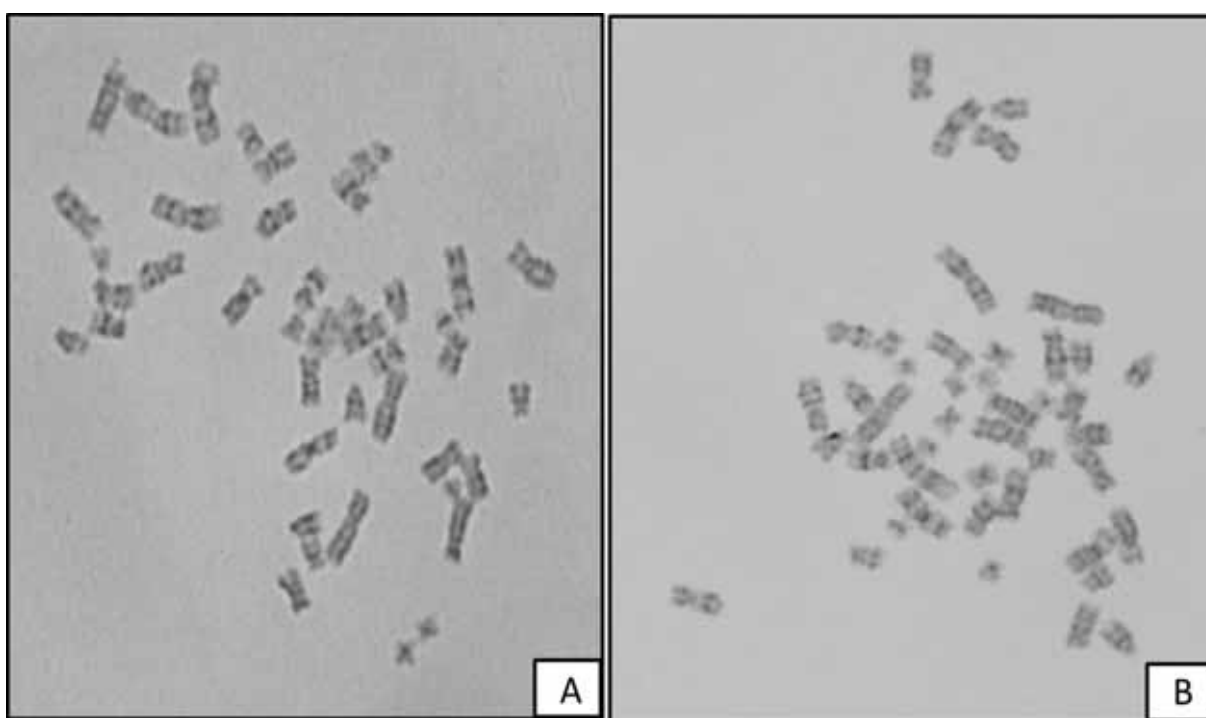


Figura 6. Metáfases hipodiplóides em bandamento GTG do caso 22: (A) 45,XX,-8 e (B) 44,XX, 10,-12.

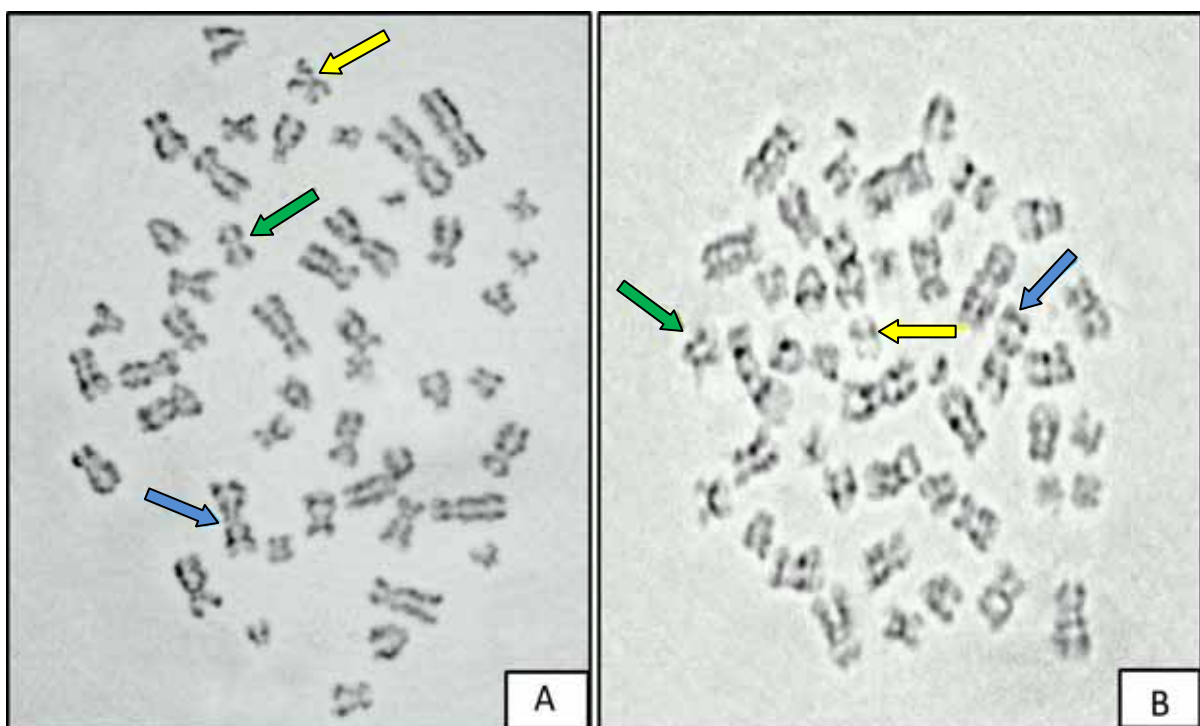


Figura 7. Metáfases em bandamento GTG do caso 32 (A e B); a seta azul indica cromossomo 3 invertido, a seta verde aponta o cromossomo 5 com deleção do braço longo e a amarela indica o cromossomo 11 com deleção do braço longo.

4.2 Resultados moleculares

Dos 50 casos analisados para o exon 3, 4% (casos 6 e 9) apresentaram troca de uma base nitrogenada, sugerindo a presença de uma mutação de ponto. Em ambos os casos a base trocada foi guanina por timina (G/T) no códon 133. A alteração caracteriza a presença do polimorfismo Ala133Ser (A133S). Para comparação do achado foi realizado o estudo do exon 3 em 50 amostras controles. Nem um dos controles apresentou o polimorfismo encontrado no exon 3.

A Figura 8 ilustra o resultado da amplificação do exon 3 em gel de agarose e a Figura 9 ilustra o resultado do sequenciamento dos casos 6 e 9, mostrando o polimorfismo.

Dos 50 casos analisados para o exon 4 e 5, não foram encontradas alterações. A Figura 10 exemplifica a análise do resultado obtido do sequenciamento do exon 5 para o caso 10.

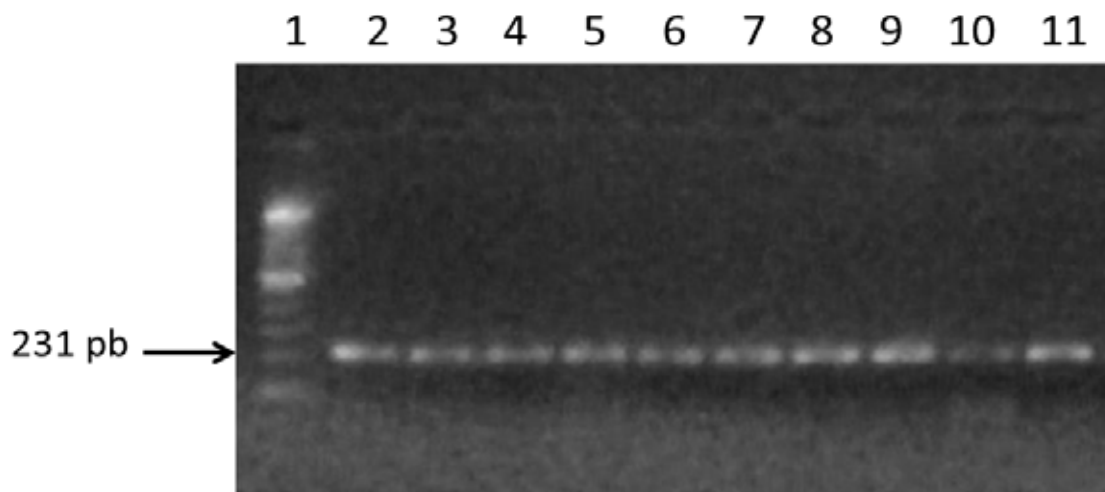


Figura 8. Gel de agarose 2% mostrando a amplificação do exon 3 do gene *RASSF1A*. Em 1 a DNA Ladder (100pb) utilizada como referência para observar o tamanho do fragmento amplificado (231pb) das amostras (2 – 11).

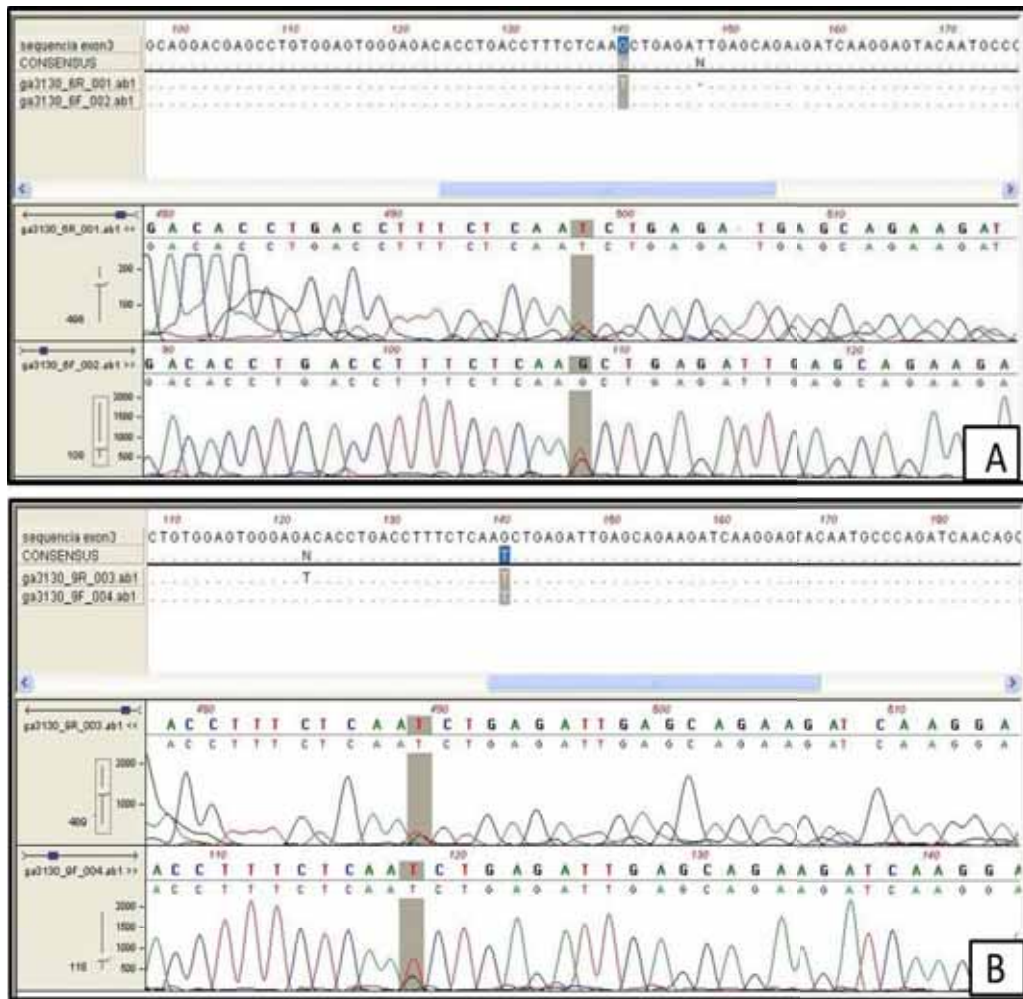


Figura 9. (A) Eletroferograma obtido no sequenciamento do exon 3 do caso 6 e (B) eletroferograma obtido no sequenciamento do exon 3 do caso 9. A parte superior das imagens apresenta a sequência padrão do exon 3 e a parte inferior os resultados do sequenciamento. A região destacada é o local da troca de base para ambos os casos.

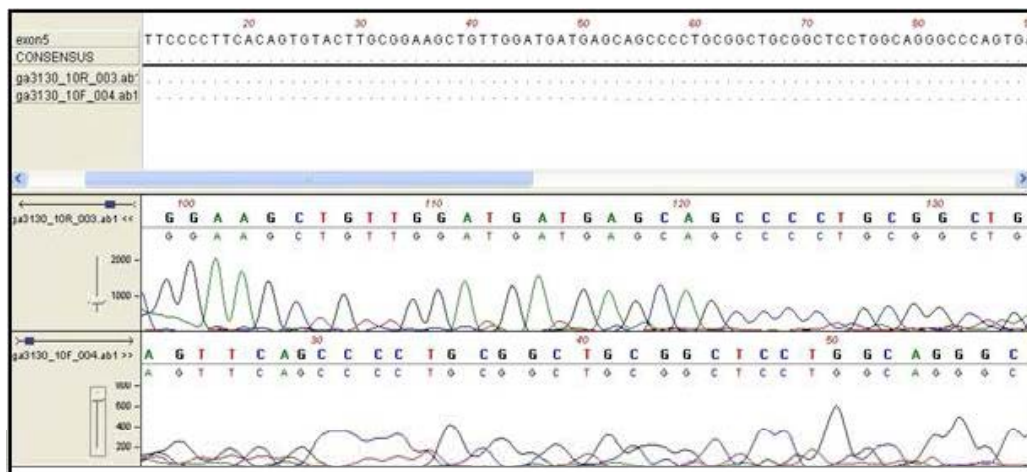


Figura 10. Eletroferograma do exon 5 do caso 10

Discussão

5. DISCUSSÃO

No Serviço de Hematologia e Hemoterapia do Hospital de Base de São José do Rio Preto são recebidos cerca de 50 casos novos suspeitos por ano, entretanto, a confirmação do diagnóstico ocorre em cerca de 70% dos casos (comunicação pessoal). A casuística com 50 indivíduos foi constituída em 18 meses.

O tamanho da casuística de pacientes com SMD descritos na literatura é muito variável, sendo encontrados estudos genéticos realizados em 2012 e 2013 com casuísticas compostas de 16 a 53 e até 1.500 pacientes (SONG et al., 2012; FU et al., 2013; HUANLING et al., 2013). Casuísticas grandes geralmente são observadas em estudos colaborativos e de consórcios e de pacientes avaliados ao longo de vários anos. Assim, pela raridade da doença e pelo fato de não se tratar de estudo de consórcio, 50 indivíduos pode ser considerado um tamanho adequado da casuística para um estudo com a proposta apresentada.

As SMD são doenças relativamente raras na população em geral e atingem mais frequentemente faixas etárias mais avançadas, especialmente entre 65-70 anos (COREY et al., 2007; JÄDERSTEN, HELLSTRÖM-LINDBERG, 2009; ZEIDAN et al., 2013). Os resultados do presente estudo corroboram estes dados, o que pode ser observado pelas idades dos indivíduos que foram estudados, sendo mais frequentes aqueles com idade igual ou superior a 50 anos, 28% acima de 65 anos. Entretanto, SMD na infância é considerado um evento muito mais raro do que em adultos, representando menos de 3-7% de todas as neoplasias hematológicas em crianças com idade inferior a 14 anos (CHATTERJEE, CHOUDHRY, 2013; SILVA, et al, 2013). A incidência anual combinada na Dinamarca e Inglaterra, por exemplo, sem a inclusão de pacientes com Síndrome de Down, foi estimada em 1-8 por milhão de crianças entre 0 e 14 anos (HASLE, NIEMEYER., 2011). Este estudo apresentou dois casos (4%) que tinham idades inferiores a 14 anos no momento do diagnóstico, o caso 7 com três anos e o caso 36 com 12 anos de idade. Portanto, considerando-se uma casuística constituída apenas de SMD, tal frequência foi maior do que o esperado, o que provavelmente se deveu ao fato de terem sido estudados pacientes de um Serviço que também é referência em neoplasias pediátricas.

Alterações cromossômicas foram observadas em 8% dos casos de SMD aqui estudados. A maioria das frequências descritas varia entre 30 e 50% (TIAN et al., 2011), contudo, alguns estudos relataram incidência maior de cariótipo normal, com até 75,9% de

casos sem alterações (BELLI et al., 2011; BACHERA et al., 2012). Mesmo assim, era esperado um número maior de casos com aberrações cromossômicas.

A frequência menor observada pode ser justificada pelo fato de existirem limitações técnicas na análise convencional por bandamento GTG que subestimam a presença de algumas alterações cromossômicas em alguns casos, a percentagem de células anormais obtidas em culturas de MO é frequentemente menor comparada à de células normais, as preparações nem sempre estão em boa resolução e a análise de cerca de 20 células em metáfase pode não ter sido suficiente para detectá-las em alguns casos, embora seja o número internacionalmente adotado (ARENILLAS et al., 2013). Além disso, os casos estudados estavam todos no início da doença, no momento do diagnóstico, e algumas aberrações cromossômicas adicionais podem aparecer apenas durante o curso da doença ou um clone anormal pode desenvolver-se no paciente com cariótipo de MO anteriormente normal (BENNETT, 2002).

Também, alguns estudos afirmam que a frequência de alterações citogenéticas é menor em pacientes considerados de baixo risco de evolução para LMA, como aqueles diagnosticados com Citopenia Refratária com Displasia Multilinhagem (CRDM) (BURBURY, WESTERMAN, 2013) foi o diagnóstico da maioria (62%) dos pacientes estudados. Entretanto, a frequência de alterações cromossômicas é maior em pacientes diagnosticados com SMD tipo Anemia Refratária com Excesso de Blastos 1-2 (AREB), que têm alta probabilidade de evoluir para LMA (PATNAIK et al, 2012), que foi o diagnóstico de 36% dos casos. Entre os casos com alterações cromossômicas, dois eram CRDM e dois AREB-1, mas as alterações com pior prognóstico, que significa evolução para LMA, foram observadas nos pacientes com AREB-1.

Está bem estabelecido na literatura que a detecção ou não de alterações citogenéticas específicas auxiliam no diagnóstico, prognóstico e tratamento dos doentes. Muitas têm uma relação direta com prognóstico e escolha do protocolo terapêutico. As alterações mais frequentes incluem perda total ou parcial dos cromossomos 5, 7, 13, 17 e 20, ou de um cromossomo sexual. Também é relatada uma incidência relativamente elevada de ganhos genéticos como trissomia dos cromossomos 8, 19 e 21. Entretanto, alterações como translocações ou outras anormalidades estruturais são mais raras (BELLI et al., 2011). Além disso, estudos demonstraram que mais da metade dos casos de SMD apresentam hipodiploidia, e as alterações mais recorrentes são monossomia dos cromossomos 5, 7 e 20 (MARTÍNEZ-RAMÍREZ et al., 2004; XU et al, 2010; BELLI et al., 2011).

A monossomia do cromossomo 7 foi apresentada por um dos casos estudados (caso 7), com diagnóstico de AREB-1. Em geral, os pacientes com esta anormalidade têm prognóstico ruim, são mais propensos a evoluir para a leucemia e são considerados candidatos ao transplante de células tronco hematopoiéticas, com potencial relativo para cura da doença. Além disso, a monossomia do 7 está comumente associada ao desenvolvimento precoce de insuficiência medular na infância (MORRISSETTE, CHADARÉVIAN, KOLB, 2010; MADUREIRA et al., 2011), e o caso 7 tinha três anos de idade na época do diagnóstico. Muito provavelmente esta alteração está envolvida na etiopatogenia da doença do caso estudado e, por ter prognóstico desfavorável, sua detecção foi utilizada para nortear a conduta terapêutica. Até a redação deste trabalho a paciente não apresentou evolução do quadro clínico e o diagnóstico estava mantido.

A hipodiploidia, embora essa seja considerada uma alteração frequente, segundo alguns autores é indicativa de mal prognóstico, mas apenas quando o número cromossômico varia de 33 a 39 (HARRISON et al., 2004; PUI, EVANS, 2009). Os casos 5 e 22 apresentaram hipodiploidia, mas com contagem cromossômica variando entre 41~45 e 43~45 respectivamente, com perdas variáveis de cromossomos, o que permitiu classificá-los com prognóstico intermediário, segundo Harrison et al (2004). Os casos 5 e 22 também não apresentaram evolução da doença no período deste estudo.

Cariótipos complexos, como apresentado pelo caso 32, são frequentes em SMD e algumas evidências apontam para a existência de subgrupos de prognósticos diferentes para estes pacientes. A complexidade do cariótipo atribuída ao número elevado de alterações encontradas está diretamente relacionada com o prognóstico da doença (SCHANZ et al., 2012). Os pacientes com alterações no cromossomo 3, em especial com inversões, frequentemente apresentam anemia, medula óssea com aumento típico no número de megacariócitos, contagem de plaquetas normal ou aumentada e displasia de múltiplas linhagens. A inversão do cromossomo 3 é recorrente nos casos de SMD que evoluem para LMA (KAYSER et al., 2011).

Já a deleção em 5q é a alteração isolada mais frequente em SMD, presente em 15% dos casos diagnosticados. Os pacientes estão indicados para transplante de medula óssea, e também respondem de maneira positiva ao tratamento com lenalidomida (GIAGOUNIDIS et al., 2013). Por sua vez, a deleção em 11q é a alteração isolada menos frequente em SMD, e as características clínico-patológicas e genéticas associadas a ela permanecem indefinidas. Essa

alteração é mais recorrente em cariótipos complexos (WANGA et al., 2011), como foi observado nesse estudo.

A paciente com cariótipo complexo está em tratamento quimioterápico, pois evoluiu para Leucemia Mieloide Aguda (LMA), o que corrobora o prognóstico ruim em casos com cariótipo com três alterações (MARTÍNEZ-RAMÍREZ et al., 2004).

Não foram encontrados relatos de pacientes com SMD que apresentam estas três alterações juntas, nas mesmas células, o que caracteriza o evento como inédito.

Também deve ser ressaltado que um cariótipo normal, como observado em 92% dos indivíduos avaliados é indicativo de bom prognóstico (RAZA, GALILI, 2012).

Assim, é evidente que a presença ou ausência de alterações citogenéticas tem grande relevância para o estudo das SMD. Porém, além das alterações cariotípicas, a utilização de técnicas moleculares permitiram descobertas que auxiliam no conhecimento de fatores genéticos envolvidos na etiopatogenia da doença.

Alterações genéticas e epigenéticas contribuem para modificar o microambiente medular, prejudicando a diferenciação celular e/ou permitindo que essas células se auto renovem de maneira descontrolada. Atualmente o número de genes que apresentam mutações recorrentes em SMD tem crescido de maneira significativa (ABDEL-WAHAB, FIGUEROA, 2012; TOTHOVA, STEENSMA, EBERT, 2013).

No presente estudo foram investigadas alterações nos exons 3, 4 e 5 do gene *RASSF1A*. O gene *RASSF1A* é um supressor de tumor que está associado a um risco elevado para diversas neoplasias malignas. Ele não apresenta uma atividade enzimática específica, mas atua modulando a polimerização dos microtúbulos durante as fases do ciclo celular, pode atuar como proteína efetora do oncogene *RAS*, mediando os efeitos pró apoptóticos do mesmo, além de interagir com outros genes, como por exemplo o *K-Ras* e o *TNF-alfa*. (NG et al., 2003; DONNINGER et al., 2011; KORAH et al., 2013).

Embora o *RASSF1A* apresente oito exons, são detectadas alterações mais frequentes nos exons 3, 4 e 5, motivo pelo qual estes foram alvo da investigação deste estudo. Uma taxa mutacional mais elevada para estes exons foi verificada para diversos tipos de câncer, tais como pulmão, rim, mama, cabeça e pescoço, nasofaringe, próstata entre outros (KASHUBA et al., 2009).

Na literatura não foram encontrados estudos que investigaram mutação no gene *RASSF1A* em SMD. No entanto, existem estudos que verificaram a expressão e a presença de mutações no gene abordando outras neoplasias hematológicas, como LMA e ele é

constantemente expresso em todas as células hematopoiéticas (ZARE-ABDOLLAHI et al., 2014).

Em Mieloma Múltiplo já foi observado que a presença de mutações e a inativação por metilação do gene *RASSF1A* são eventos frequentes (NG et al., 2003). Já Johan et al. (2005) verificaram que pacientes com LMA não apresentam a inativação do gene pela metilação. Além disso, eles relataram que o silenciamento de *RASSF1A* e a presença de mutações do *RAS* eram eventos mutuamente exclusivos nas amostras de pacientes com mielodisplasia.

Estudos complementares investigaram a presença de mutações em genes que se associam com *RASSF1A*, como por exemplo, o gene *RAS* que apareceu mutado em 15 a 30% dos pacientes com Leucemia Mieloide Aguda (AL-KALI et al., 2013; ZARE-ABDOLLAHI et al., 2014). Mais recentemente, também com LMA, observou-se que a expressão do *RASSF1A* não apresenta modificação se comparada com a encontrada em indivíduos normais (ZARE-ABDOLLAHI et al., 2014). Alguns achados fazem do *RASSF1A* um candidato ao envolvimento na etiopatogenia do câncer em diversos tecidos sólidos, mas seu envolvimento em neoplasias hematopoiéticas é relativamente desconhecido, ou totalmente desconhecido, como em SMD. Foi encontrado apenas um estudo do padrão de metilação do *RASSF1A* em SMD, e em 9% dos casos foi observado o silenciamento do gene. Entretanto, a análise foi realizada em células do sangue periférico o que, sabidamente, pode não ser representativo do fenômeno biológico que está ocorrendo nas células da MO, conforme crítica do próprio autor (JOHAN et al., 2004).

As mutações mais observadas no *RASSF1A* envolvem os exons 3, 4 e 5, como referido anteriormente, mas aqui foi observada uma mutação polimórfica apenas no exon 3 e em 4% dos casos. Os exons 4 e 5 não apresentaram alterações moleculares.

O polimorfismo Ala133Ser (A133S) do *RASSF1A* resulta na troca de uma única base G/T, que resulta na troca de um aminoácido serina por alanina. Foram demonstrados alguns defeitos quanto à função biológica da proteína variante, uma vez que a localização estrutural da troca é um domínio importante de associação que pode levar a efeitos sobre o ciclo celular e interações diferentes com a maquinaria de reparo do DNA (DONNINGER et al., 2011).

Alguns estudos procuram estabelecer associação entre a presença deste polimorfismo com uma pré-disposição para alguns tipos de câncer. Kanzaki et al (2006), observaram que o polimorfismo é duas vezes mais frequente em pacientes japoneses com câncer de pulmão do que na população japonesa normal, cuja frequência é de aproximadamente 11% (KANZAKI et al, 2006). DONNINGER et al, (2011) apresentaram resultados que mostram uma forte

associação entre a presença do polimorfismo e o desenvolvimento do câncer de mama. Porém, há relatos da presença deste polimorfismo em aproximadamente 29% da população europeia normal (DONNINGER et al., 2011).

Assim, mesmo que o polimorfismo não tenha sido encontrado no grupo controle, uma possível associação entre SMD e o polimorfismo Ala133Ser (A133S), necessita ser melhor investigada em casuístas maiores. E é de extrema importância que os estudos abordando genes específicos que possam estar associados com a etiologia da doença continuem sendo estudados, fornecendo informações que permitam estimar o prognóstico e auxiliar no direcionamento para um tratamento específico dos pacientes.

Conclusões

6. CONCLUSÕES

1. Alguns casos de SMD ao diagnóstico apresentam alterações cariotípicas nas células da medula óssea e estas alterações estão relacionadas com a etiologia ou evolução dos casos, com implicações diretas no diagnóstico, prognóstico e escolha terapêutica;
2. Cariótipos complexos envolvendo 3q, 5q e 11q, além de monossomia do 7 são indicativos de prognóstico ruim;
3. Mutações nos éxons 3, 4 e 5 no gene *RASSF1A* nas células da medula óssea de indivíduos com SMD ao diagnóstico parecem ser eventos raros e necessitam ser investigadas em casuísticas grandes;
4. O polimorfismo Ala133Ser (A133S) pode estar envolvido na predisposição para as SMD, entretanto, são necessários estudos da sua frequência na população brasileira e de estudos em casuísticas maiores de SMD.

Referências

7. REFERÊNCIAS

- ABDEL-WAHAB, O.; FIGUEROA, M. E. Interpreting new molecular genetics in myelodysplastic syndromes. **American Society of Hematology**, p. 56-64, 2012.
- ADEMÀA, V. et al. Application of FISH 7q in MDS patients without monosomy 7 or 7q deletion by conventional G-banding cytogenetics: Does -7/7q- detection by FISH have prognostic value? **Leukemia Research**, v. 37, p. 416– 421, 2013
- AGARWAL, S.; AMIN, K. S.; JAGADEESH, S.; BAISHAY, G.; RAO, P. G.; BARUA, N. C.; BHATTACHARYA, N.; BANERJEE, P. P. Mahanine restores RASSF1A expression by down-regulating DNMT1 and DNMT3B in prostate cancer cells. **Molecular Cancer**, v. 12, p. 1- 12, 2013.
- AL-KALI, A.; QUINTÁS-CARDAMA, A.; LUTHRA, R.; BUESO-RAMOS, C.; PIERCE, S.; KADIA, T.; BORTHAKUR, G.; ESTROV, Z.; JABBOUR, E.; FADERL, S.; RAVANDI, F.; CORTES, J.; TEFFERI, A.; KANTARJIAN, H.; GARCIA-MANERO, G. Prognostic impact of RAS mutations in patients with myelodysplastic syndrome. **American Journal Hematology**, v. 88, p. 365-369, 2013
- AMIN, K. S.; BANERJEE, P. P. The cellular functions of RASSF1A and its inactivation in prostate cancer. **Jornal Carcinogeneses**, v.11, p. 1-13, 2012.
- ARENILLAS, L. *et al.* Single Nucleotide Polymorphism Array Karyotyping: A Diagnostic and Prognostic Tool in Myelodysplastic Syndromes with Unsuccessful Conventional Cytogenetic Testing. **Genes, Chromosomes & Cancer**, v. 52, p. 1167–1177, 2013.
- BACHERA, U.; KERNB, W.; ALPERMANNB, T.; SCHNITTGERB, S.; HAFERLACHB, C.; HAFERLACHB, T. Prognoses of MDS subtypes RARS, RCMD and RCMD-RS are comparable but cytogenetics separates a subgroup with inferior clinical course. **Leukemia Research**, v. 36, p. 826– 831, 2012.
- BAJAJ, R.; XU, F.; XIANG, B.; WILCOX, K.; DIADAMO, A.J.; KUMAR, R.; PIETRASZKIEWICZ, A.; HALENE, S.; LI, P. Evidence-based genomic diagnosis characterized chromosomal and cryptic imbalances in 30 elderly patients with myelodysplastic syndrome and acute myeloid leukemia. **Molecular Citogenetics**, v.4, p. 1-10 Jan. 2011.
- BARZI, A.; SEKERES, M. A. Myelodysplastic syndromes: A practical approach to diagnosis and treatment. **Cleveland Clinic Journal of Medicine**, v.77, n. 1, p. 37-44, Jan. 2010.
- BEJAR, R.; STEVENSON, K.; ABDEL-WAHAB, O.; GALILI, N.; NILSSON, B.; GARCIA-MANERO, G.; KANTARJIAN, H.; RAZA, A.; LEVINE, R. L.; NEUBERG, D.; EBERT, B. L. Clinical Effect of Point Mutations in Myelodysplastic Syndromes. **The New England Journal of Medicine**, v. 26, p. 496-506, Jun. 2011.
- BELLI, C.B.; BENGIÓ, R.; ARANGUREN, P.N.; SAKAMOTO, F.; FLORES, M.G.; WATMAN, N.; NUCIFORA, E.; PRATES, M.V.; ARBELBIDE, J.; LARRIPA, I. Partial and total monosomal karyotypes in myelodysplastic syndromes: comparative prognostic relevance among 421 patients. **American Journal of Hematology**, v. 7, p. 540-545, Jul. 2011.

BENNETT, J. M. The myelodysplastic syndromes. Pathobiology and clinical management. Marcel Dekker Inc, New York, p 15, 2002.

BURBURY, K. L.; WESTERMAN, D. A. Role of flow cytometry in myelodysplastic syndromes: diagnosis, classification, prognosis and response assessment. **Leukemia & Lymphoma**, Early Online: 1–12, 2013.

BRUNNING, R.D.; HASSERJIAN, R.P.; PORWIT, A.; *et al.* Refractory cytopenia with unilineage dysplasia *In*: Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, Jaffe ES, Pileri SA, Stein H, THIELE J, VARDIMAN JW. WHO Classification of Tumours of Hematopoietic and Lymphoid Tissues. **Lyon: IARC Press**, p. 94-95, 2008.

CHATTERJEE, T.; CHOUDHRY, V. P. Childhood Myelodysplastic Syndrome. **Indian Journal Pediatric**, v. 80, p.764–771, 2013.

CHAUBEY, R.; SAZAWAL, S.; DADA, R.; MAHAPATRA, M.; SAXENA, R. Cytogenetic profile of Indian patients with de novo myelodysplastic syndromes. **Indian Journal of Medical Research**, v. 134, p. 452–457, 2011.

COREY, S. J., MINDEN, M. D.; BARBER, D.L., KANTARJIAN, H.; WANG, J.C.; SCHIMMER; A.D. Myelodysplastic syndromes: the complexity of stem-cell diseases. **Nature Reviews Cancer**, v. 7, n.2, p 118-129, Feb. 2007.

DONNINGER¹, H.; MICHELE, D.; CLARK¹, G. J. The RASSF1A tumor suppressor Molecular Targets Group, Department of Medicine, J. G. Brown Cancer Center, University of Louisville Research Analysis and Evaluation Branch, NCI, Rockville, MD, USA. **Jornal of Cell Science**, v. 18, p. 163-172, Sep. 2007.

DONNINGER, H.; BARNOUD, T.; NELSON, N.; KASSLER, S.; CLARK, J.; CUMMINS, T. D.; POWELL, D. W.; NYANTE, S.; MILLIKAN, R. C.; CLARK, G. J. RASSF1A and the rs 2073498 cancer associated SNP. **Frontiers in Oncology**, v. 1, p. 1-7, 2011.

FU, C.M.; CHEN, Z.X.; LIU, D.D.; ZHANG, J.; PAN, J.L. Study of the clonal origin and development of MDS by FISH analysis of dysplasia cells in bone marrow of patients with MDS. **Jornal of Experimental Hematology/ Chinese Association of Pathophysiology**, v. 3, p. 650-656, Jun 2013.

GERMING, U.; KOBBE, U.; HAAS, R.; GATTERMANN, N. Myelodysplastic Syndromes: Diagnosis, Prognosis, and Treatment. **Deutsches Ärzteblatt International**, v. 46, p. 783–90, 2013.

GIAGOUNIDIS, A.; MUFTI, G. J.; FENAUX, P.; GERMING, U.; LIST, A.; MACBETH, K. J. Lenalidomide as a disease-modifying agent in patients with del(5q) myelodysplastic syndromes: linking mechanism of action to clinical outcomes. **Ann Hematology**, 2013

GREENBERG, P. L. The Multifaceted Nature of Myelodysplastic Syndromes: Clinical Molecular, and Biological Prognostic Features. **Journal of the National Comprehensive Cancer Network**, v. 11, p. 877-885, 2013.

GROUCHY, J. D. E.; TURLEAU, C. Clinical atlas of human chromosomes, New York: Wiley, c 1984.

HAASE, D. Cytogenetic features in myelodysplastic syndromes. **Annals of Hematology**, v. 87, n. 7, p. 515-526, Jul. 2008.

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

HARRISON, C. J.; MOORMAN, A. V.; BROADFIELD, Z. J.; CHEUNG, K. L.; HARRIS, R. L.; JALALI, G. R.; ROBINSON, H. M.; BARBER, K. E.; RICHARDS, S. M.; MITCHELL, C. D.; EDEN, T. O. B.; HANN, I. M.; HILL, F. J. G.; KINSEY, S. E.; GIBSON, B. E. S.; LILLEYMAN, J.; VORA, A.; GOLDSTONE, A. H.; FRANKLIN, I. M.; DURRANT, J.; MARTINEAU, M. Three distinct subgroups of hypodiploidy in acute lymphoblastic leukaemia. **British Journal of Haematology**, v. 125, p. 552–559, 2004.

HESSON, L.B.; COOPER, W.N.; LATIF, F. The role of RASSF1A methylation in cancer. **Disease Markers**, v.23(1-2), p.73-87, 2007.

HUANLING, WU.; SHUQUAN, BIAN.; JINGXUE, CHU.; XIAOYAN, ZHONG.; HUI, SUN.; BINGCHANG, ZHANG.; ZHIMING, LU. Characteristics of the four subtypes of myelodysplastic/myeloproliferative neoplasms. **Experimental and Therapeutic Medicine**, v.5, p.1332-1338, 2013.

JÄDERSTEN M, HELLSTRÖM-LINDBERG E. Myelodysplastic syndromes: biology and treatment. **Journal of Internal Medicine**, v. 3, p. 307-328, Mar 2009.

JOHAN, M.F.; BOWEN, D.T.; FREW, M.E.; GOODEVE, A.C.; REILLY, J.T.; Aberrant methylation of the negative regulators RASSF1A, SHP-1 and SOCS-1 in myelodysplastic syndromes and acute myeloid leukaemia. **British Journal of Haematology**. v.129(1), p. 60-65, Apr. 2005.

KANZAKI, H.; HANAFUSA, H.; YAMAMOTO, H.; YASUDA, Y.; IMAI, K.; YANO, M.; AOE, M.; SHIMIZU, N.; NAKACHI, K.; OUCHIDA, M.; SHIMIZUA, K. Single nucleotide polymorphism at codon 133 of the RASSF1 gene is preferentially associated with human lung adenocarcinoma risk. **Cancer Letters**, v. 238, p. 128–134, 2006.

KASHUBA, V. I.; PAVLOVA, T.V.; GRIGORIEVA, E.V.; KUTSENKO, A.; YENAMANDRA, S.P.; et al. High Mutability of the Tumor Suppressor Genes RASSF1 and RBSP3 (CTDSPL) in Cancer. **PLOS ONE** v. 4 , e. 5231, p. 1-12, May. 2009.

KAYSER, S.; ZUCKNICK, M.; DÖHNER, K.; KRAUTER, J.; KÖHNE, C.; HORST, H. A.; HELD, G.; LILIENFELD-TOAL, M.; WILHELM, S.; RUMMEL, M.; GERMING, U.; MORLOK, C.; TELEANU, V.; GANSER, A.; DÖHNER, H.; SCHLENK, R. F.; GÖTZE, K.; NACHBAUR, D.; SCHLEGELBERGER, B.; GÖHRING, G.; SPÄTH, D. Monosomal karyotype in adult acute myeloid leukemia: prognostic impact and outcome after different treatment strategies. **Blood- the American Society of Hematology**, v. 119, p. 551-558, 2011.

KEEN-KIM, D.; NOORAIE, F.; RAO, P. N. Cytogenetic biomarkers for human cancer. **Frontiers in Bioscience: Journal and Virtual Library**, v. 59. e.13, p. 5928-5949, May 2008.

- KHALID, A. M.; ASANO, A.; HOSAKA, Y. Z.; TAKEUCHI, T.; YAMANO, Y. Tumor Suppressor Candidat TUSC3 Expression during Rat Testis Maturion. Online Publication, October 7, 2013 [doi:10.1271/bbb.130327].
- KORAH, R.; HEALY, J. M.; KUNSTMAN, J. W.; FONSECA, A. L.; AMERI, A. L.; PRASAD, M. L.; CARLING, T. Epigenetic silencing of RASSF1A deregulates cytoskeleton and promotes malignant behavior of adrenocortical carcinoma. *Molecular Cancer*, v. 12, p. 1-13, 2013.
- KULASEKARARAJ, A. G.; MOHAMEDALI, A. M.; MUFTI, G. J. Recent advances in understanding the molecular pathogenesis of myelodysplastic syndromes. **British Journal of Haematology**, v. 162, p. 587–605, 2013.
- LI, L.; ZHANG, Y.; MA, XT.; YANG, L.; XU, ZF.; XIAO, ZJ. Study on NPM1 gene mutations in patients with primary myelodysplastic syndromes. **Zhonghua Xue Ye Xue Za Zhi**, v.12, p. 809-812, Dec. 2010.
- MADUREIRA, M. B. A., et al. Analysis of risk factors influencing outcome in children with myelodysplastic syndrome after unrelated cord blood transplantation. **Leukemia**, v. 25(3), p. 449–454, Mar. 2011.
- MALCOVATI, L.; NIMER, S. D. Myelodysplastic syndromes: diagnosis and staging, **Cancer control: Journal of the Moffitt Cancer Center**, v. 15, p.4-13, Oct. 2008.
- MARTÍNEZ-RAMÍREZ, A. et al. Cytogenetic profile of myelodysplastic syndromes with complex karyotypes: an analysis using spectral karyotyping. **Cancer Genetics and Cytogenetics**, v. 153, p. 39-47, Aug, 2004.
- MILLER, S.A.; DYKES, D.D.; POLESKY, H.F. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. **Nucleic Acids Research**, v.16, n.4, p.1215, 1988.
- MISHRA, A. *et al.* Validation of the revised International Prognostic Scoring System in treated patients with myelodysplastic syndrome. **American Journal of Hematology**, v. 88, p. 566–570, 2013.
- MORRISSETTE, J. D. J.; CHADARÉVIAN, J.P.; KOLB, A. E. Familial Leukemia Associated with Monosomy 7. **Gene Reviews**, 2010.
- MURATI, A.; BRECQUEVILLE, M.; DEVILLIER, R.; MOZZICONACCI, M.; GELSI-BOYER, V.; BIRNBAUM, D. Myeloid malignancies: mutations, models and management. **Biomed Central Cancer**, v. 12, p.1-15, 2012.
- NAGOSHI, H.; HORIIKE, S.; KURODA, J.; TANIWAKI M. Cytogenetic and Molecular Abnormalities in Myelodysplastic Syndrome. **Current Molecular Medicine**. v. 11, p. 678-685, Nov. 2011.
- NG, M. H. L.; LAU, K. M.; WONG, W. S.; TO, K. W.; CHENG, S. H.; TSANG, K. S.; CHAN, N. P. H.; KHO, B. C. S.; LO, K. W.; TONG, J. H. M.; LAM, C. W.; CHAN, J. C. W. Alterations of RAS signalling in Chinese multiple myeloma patients: absent BRAF and rare RAS mutations, but frequent inactivation of RASSF1A by transcriptional silencing or

expression of a non-functional variant transcript. **British Journal of Haematology**, v. 123, p. 637-645, 2003

NIMER, S. D. Myelodysplastic syndromes. **Blood**, v. 111, n. 10, p. 4841-4851, May 2008.

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.

PATNAIK, M. M.; HANSON, C. A.; HODNEFIELD, J. K.; KNUDSON, J.; VAN DYKE, D. L.; TEFFERI, A. Monosomal karyotype in myelodysplastic syndromes, with or without monosomy 7 or 5, is prognostically worse than an otherwise complex karyotype. **Leukemia**, v. 25, p. 266–270, 2011.

PELLAGATTI et al. Identification of Gene Expression–Based Prognostic Markers in the Hematopoietic Stem Cells of Patients With Myelodysplastic Syndromes. **Journal of Clinical Oncology**, v. 31, p. 3557-3567, 2013.

PFEILSTÖCKER, M.; KARLIC, H.; NÖSSLINGER, T.; SPERR, W.; STAUDER, R.; KRIEGER, O.; VALENT, P. Myelodysplastic syndromes, aging, and age: correlations, common mechanisms, and clinical implications. **Leukemia & Lymphoma**, v. 48, n. 10, p. 1900-1909, Oct 2007.

POZDNYAKOVA, O.; MIRON, P. M.; TANG, G.; WALTER, O.; RAZA, A.; WODA, B.; WANG, S. A. Cytogenetic Abnormalities in a Series of 1029 Patients with Primary Myelodysplastic Syndromes. **Cancer**, v. 113, n. 12, p. 3331-3340, Dec. 2008.

PUI, CHING-HON.; EVANS, W. E. Treatment of Acute Lymphoblastic Leukemia. **The New England Journal of Medicine**, v. 2, p. 166- 178, 2006.

RAZA, A.; GALILI, N. The genetic basis of phenotypic heterogeneity in myelodysplastic syndromes. **Nature Reviews/ Cancer**, v. 12, p.849-859, Dec. 2012.

RIA, R.; MOSCHETTA, M.; REALE, A.; MANGIALARDI,G.; CASTROVILLI,A.; VACCA, A.; DAMMACCO, F. Managing myelodysplastic symptoms in elderly patients. **Clinical Interventions in Aging** v.4, p. 413–423, Nov. 2009.

RICHTER, A. M.; PFEIFER, G.P.; DAMMANN, R. H. The RASSF proteins in cancer; from epigenetic silencing to functional characterization. **Biochimic et Biophyscia acta**, v. 2, ed.1796, p.114-128, Dec. 2009.

SAMBROOK, J.; RUSSEL, D. W. Molecular Cloning. **Cold Spring Harbor Laboratory Press**, v. 3 ed. 3, 2001.

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.

- SCHILLER, G. J.; REESE, N. Myelodysplasia. **Hematology Clinic**, v. 18, p 307- 309, 2013.
- SHIH A.H; LEVINE R. L. Molecular biology of myelodysplastic syndromes. **Seminars in Oncology**, v.5, p. 613-620, Oct. 2011.
- SILVA, A. G. S.; MASCHIETTO, M.; VIDAL, D. O.; PELIÇARIO, L. M.; VELLOSO E. D. R. P.; LOPES, L. F.; KREPISCHI, A. C.; Rosenberg C. Array-CGH as an adjuvant tool in cytogenetic diagnosis of pediatric MDS and JMML. **Medicine Oncology**, v. 30, p. 1- 5, 2013.
- SONG, L.X.; HE, Q.; ZHANG, Y.; WU, LY.;; ZHOU, LY.; ZHANG, Z.; ZHANG, X.; YANG, LP.; Chang, CK. Cytogenetic study of autosomal monosomies among myelodysplastic syndrome patients, **Zhongguo Shi Yan Xue Ye Xue Za Zhi**, v. 6, Dec 2012.
- TIAN Y; YU HOU; XIANG ZHOU; HANHUA CHENG; RONGJIA ZHOU. Tumor Suppressor RASSF1A Promoter: p53 Binding and Methylation. **PLoS ONE**. v.6 , 2011.
- TOTHOVA, Z.; STEENSMA, D. P.; EBERT, B. L. New Strategies in Myelodysplastic Syndromes: Application of Molecular Diagnostics to Clinical Practice. **Clinical Cancer Research**, v. 19, p. 1637–43, 2013
- TRAINA, F.; VISCONTE, V.; ELSON, P.; TABARROKI, A.; JANKOWSKA, A. M.; HASROUNI, E.; SUGIMOTO, Y.; SZPURKA, H.; MAKISHIMA, H.; KEEFE, C.L.O.; SEKERES, M. A.; ADVANI, A. S.; KALAYCIO, M.; COPELAN, E. A.; SAUNTHARARAJAH, Y.; OLALLA SAAD, S. Y.; MACIEJEWSKI, J.P.; TIU, R. V. Impact of molecular mutations on treatment response to DNMT inhibitors in myelodysplasia and related neoplasms. **Leukemia**, doi: 10.1038/leu.2013.269, 2013.
- UNDERHILL-DAY N, HILL V, LATIF F. N-terminal RASSF family: RASSF7-RASSF10. **Epigenetics: official Journal of DNA Methylation Society**, v.2, p. 84-92, Mar 2011.
- XU, W.; LI, JY.; LIU, Q.; ZHU, Y.; PAN, JL.; QIU, HR.; XUE, YQ. Multiplex fluorescence in situ hybridization in identifying chromosome involvement of complex karyotypes in de novo myelodysplastic syndromes and acute myeloid leukemia. **International Journal of Laboratory Hematology**, v.32, p. 86-95, Feb. 2010.
- ZACHAKIA, S.; STAVROPOULOUA, C.; KOROMILAC, T.; MANOLA, K. N.; KALOMOIRAKIA, M.; DARAKIA, A.; KOUMBIA, D.; ATHANASIADOUD, A.; KANAVAKISB, E.; KOLLIA, P.; SAMBANIA, C. High frequency of NAD(P)H: quinone oxidoreductase 1 (NQO1) C609T germline polymorphism in MDS/AML with trisomy 8. **Leukemia Research**, v.37, p. 742– 746, 2013.
- ZARE-ABDOLLAHI, D.; SAFARI, S.; MOVAFAGH, A.; GHADIANI, M.; RIAZI-ISFAHANI, S.; OMRANI, D. Intact expression status of RASSF1A in acute myeloid leukemia. **Medicine Oncology**, v. 31, p. 1-5, 2014.
- ZEIDAN, A. M.; LINHARES, Y.; GORE, S. D. Current therapy of myelodysplastic syndromes. **Blood Reviews**, <http://dx.doi.org/10.1016/j.blre.2013.07.003>, 2013.
- ZHOU, S. L.; CUI, J.; ZONG, M. F.; LI, X. L.; LI, J. L. LIU, B. C.; ZHANG, D. Y. LIU, H. Y.; ZHAO, K. X.; SONG, X.; WANG, R.; YAN, Z. C.; YI, H. X.; WANG, L. D. Polymorphism of A133S and promoter hypermethylation in Ras association domain family

1A gene (RASSF1A) is associated with risk of esophageal and gastric cardia cancers in Chinese population from high incidence area in northern China. **BMC Cancer**, v. 13, p. 1-10, 2013.

WANGA, S. A.; ABRUZZO, L. V.; HASSERJIAN, R. P.; ZHANG, L.; HU, Y.; ZHANG, Y.; ZHAO, M.; GALILI, N.; RAZA, A.; MEDEIROS, L. J.; GARCIA-MANERO, G.; MIRANDA, R. N. Myelodysplastic syndromes with deletions of chromosome 11q lack cryptic MLL rearrangement and exhibit characteristic clinicopathologic features. **Leukemia Research**, v. 35, p. 351-357, 2011.

8. APÊNDICE- Artigo

RASSF1A mutations in myelodysplastic syndromes

Monteiro, FS¹; Freitas-Favaro, PC¹; Nogueira, ML²; Ricci Jr, O³; Fett-Conte, AC².

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

²*Molecular Biology Department, Medicine School in São José do Rio Preto, (FAMERP/FUNFARME), Sao Paulo, Brazil;*

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

Abstract

Myelodysplastic syndromes (MDS) are a very heterogeneous group of clonal myeloid neoplasms associated with ineffective myelopoiesis and risk of progression to acute myeloid leukemia. The pathogenesis and progression involve epigenetic defects and mutations in genes that control cell events such as proliferation and apoptosis. Little is known about genomic aberrations and MDS biogenesis. Advances in the understanding of the molecular drivers of the disease can provide important information in its diagnosis, prognosis, and treatment. The *RASSF1A* gene is a tumor suppressor located on 3p21.3 that has been described as changed in numerous solid tumors. It is consistently expressed in all hematopoietic cells but has not been studied in MSD. We investigated the presence of mutations in exons 3, 4 and 5 of *RASSF1A* in 50 patients with MDS and 50 controls. The sequencing of exon 3 showed the Ala133Ser polymorphism (A133S) in 4% of patients but it was not found in controls. No alterations in exons 4 and 5 were observed in both groups. There are reports that suggest an association of this polymorphism with some solid tumors, however, nothing is conclusive. Other studies using larger samples are needed to establish whether the Ala133Ser polymorphism is involved in the biogenesis of MDS.

Keywords: Myelodysplasia, sequencing, tumor suppressor

Introduction

The myelodysplastic syndromes (MDS) are characterized by cytopenias, dysplasia in one or more myeloid cell lines, ineffective hematopoiesis and an increased risk of leukemic transformation [1, 2]. They are typically considered neoplasms because of frequent genetic aberrations and limited patient survival with progression to acute myeloid leukemia (AML) or death related to the consequences of bone marrow failure including infection, hemorrhage, and iron overload [3]. The incidence of MDS is currently 2.0-3.4 per 100,000 individuals in Western countries; with the increasing longevity of the population, the number of patients is growing [1, 4]. More than 10,000 cases are diagnosed annually in the US, with a median age at diagnosis of 76 years and a median survival of about 2 years. However, cancer registries probably underestimate the real incidence as MDS primarily affects older adults, that is, individuals over the age of 70 years at diagnosis [5].

The MDS are classified into subgroups with the most widely used classification being that of the World Health Organization revised in 2008 (WHO-2008) that takes into account: the amount of peripheral cytopenia, the percentage of blasts in peripheral blood and bone marrow, the percentage of ringed sideroblasts, the presence of Auer Rods, and the detection of a cytogenetic abnormality (the isolated 5q deletion). The following subgroups are defined: refractory cytopenia with unilineage dysplasia, refractory anemia with ringed sideroblasts, refractory cytopenia with multilineage dysplasia (RCMD), refractory anemia with excess blasts (RAEB), unclassifiable myelodysplastic syndrome and myelodysplastic syndrome with isolated del(5q) [6].

Chromosomal abnormalities in bone marrow cells are found in 30-50% of “*de novo*” MDS patients and approximately 80% of secondary or therapy-related MDS cases. [7, 8] However, there are patients with myelodysplastic syndromes with normal karyotypes, and often patients with identical chromosomal abnormalities are clinically heterogeneous. [9; 10]

More than 25 recurrent MDS-associated somatic mutations involving cell cycle regulatory genes, apoptotic genes, and DNA repair genes have been identified. Recent genomic advances suggest that MDS and its

progression to AML is a genomic instability disorder, resulting from a stepwise accumulation of genetic abnormalities [11; 12].

The Ras-Association Domain Family 1A (RASSF1A) protein is a ubiquitously expressed 37kDa isoform of the *RASSF1* tumor suppressor gene that has demonstrated mediating roles in three important cellular processes in a variety of tissues: the stability of microtubules, progression of the cell cycle and induction of apoptosis by specific molecular interactions between the factors that act in these processes. The *RASSF1A* gene is a negative effector of the *Ras* gene; it binds to proteins in the Ras family and antagonizes activated proliferative stimuli. [13]

Several studies have reported hypermethylation of the *RASSF1A* promoter region as one of the most frequent genetic alterations in varying solid tumors. However, not only the loss of gene expression by hypermethylation has been observed, but also genetic silencing by mutations and the presence of several single nucleotide polymorphisms (SNPs) have been described, especially in exons 3, 4 and 5, suggesting their involvement in the development of some cancers. [14, 15]

RASSF1A is consistently expressed in all hematopoietic cells and its methylation pattern was investigated in patients with acute AML and multiple myeloma (MM) [16]. However, no investigation about mutations in MDS was found.

We investigated the presence of mutations in exons 3, 4 and 5 of the *RASSF1A* gene in patients with primary MDS.

Patients

After approval by the Research Ethics Committee of FAMERP, a prospective descriptive study was conducted of bone marrow samples from 20 male and 30 female individuals diagnosed with primary MDS (*de novo*) according to the WHO-2008 classification. Patients who had normal karyotypes were enrolled in the study prior to being submitted to chemotherapy or radiation treatment. Informed consent was obtained from all participants.

All participants were treated in the Hematology and Transfusion Service of Hospital de Base in São José do Rio Preto, SP from March 2012 to September 2013. The ages of the patients ranged from three and 89 years (mean = 51.14 ± 18.78 years).

Of the 50 cases, 31 were diagnosed with RCMD, 14 with refractory anemia with excess blasts-1 (RAEB-1), four with refractory anemia with excess of Blasts-2 (RAEB-2) and one with refractory anemia (RA).

After obtaining informed consent, DNA samples from the peripheral blood of 50 healthy blood donors of the blood bank in São José do Rio Preto were used as controls to compare possible molecular changes.

Materials and Methods

Genomic DNA was extracted from bone marrow cells of patients and from peripheral blood of controls. After DNA extraction by the salting-out technique, exons 3, 4 and 5 were amplified by polymerase chain reaction (PCR) with sequences being determined by direct sequencing. The sequence obtained was compared to that of the reference gene deposited at the National Center for Biotechnology Information (NCBI -<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>) to detect mutations and polymorphisms. The forward and reverse primers are listed in Table 1.

The amplified and purified samples were automatically sequenced in a capillary 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems).

The sequences of exons of the *RASSF1A* gene were determined using the Big Dye Terminator kit v 3.1 (Applied Biosystems, USA) according to the manufacturer's recommendations. The obtained sequences were compared with the reference sequence available in NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>).

Results

We investigated the sequences of exons 3, 4 and 5 in the *RASSF1A* gene. Of the 50 cases with *de novo* MDS, two (4%), one with RCMD and the other with RAEB, showed a nitrogenous base exchange, a guanine (G) for thymine (T) in the first position of codon 133 in exon 3 (dbSNP ID:rs2073498) resulting in the substitution of an alanine (Ala) residue (GCT) for a serine (Ser) residue (TCT) (c.397G>T, also designated *RASSF1A* Ala133Ser). The change characterizes the presence of the Ala133Ser polymorphism (A133S) (Figure 1).

Analysis of exons 4 and 5 of all patients revealed no changes. Moreover, no changes were found in exons 3, 4 and 5 of control subjects.

Discussion

The *RASSF1A* gene is a tumor suppressor that is associated with a high risk for various malignant neoplasms. It does not present any specific enzymatic activity, but acts by modulating the polymerization of microtubules during cell cycle phases, it can act as an effector protein for the RAS oncogene, mediating proapoptotic effects of this oncogene, as well as interacting with other genes, such as the *K-Ras* and *TNF-alpha* genes [16,17,18].

Although the *RASSF1A* gene has eight exons, changes are more frequently described in exons 3, 4 and 5, which is why these were the target of the current study. Higher mutation rates were found for these exons in several types of cancer, including lung, kidney, breast, head and neck, prostate, and nasopharyngeal cancer, among others [19].

No published studies were found that investigated *RASSF1A* gene mutations in MDS; however there are studies that examined the expression and the presence of mutations of the gene in other hematologic neoplasms, such as AML [20]

It has already been observed that mutations and inactivation of the *RASSF1A* gene due to methylation are common events in MM [16]. Johan et al. (2005) found that patients with AML do not present with gene inactivation due to methylation. In addition, they reported that the silencing of the *RASSF1A* gene and the presence of mutations in the *Ras* gene are mutually exclusive events in patients with myelodysplasia [21].

Complementary studies examined the presence of mutations in genes that are associated with *RASSF1A* such as, for example, the *Ras* gene which was mutated in 15 to 30% of patients with AML [20]. More recently, it was observed that the expression of *RASSF1A* is unchanged in patients with AML compared to healthy individuals [20].

Some findings implicate *RASSF1A* in the pathogenesis of cancer of various solid tissues, but its involvement in hematopoietic neoplasms is relatively unknown, or even totally unknown as in MDS. Only one study on the pattern of methylation of *RASSF1A* in MDS was found with gene silencing being observed in 9% of

the cases. However, the analysis was performed using peripheral blood cells which, as the author himself stated, may not be representative of the biological phenomenon that is occurring in bone marrow cells [21].

Most mutations observed in *RASSF1A* involve exons 3, 4 and 5, as mentioned above, but in this study one polymorphic mutation in exon 3 was observed and only in 4% of the cases. There were no molecular changes in exons 4 and 5.

The Ala133Ser polymorphism (A133S) of the *RASSF1A* gene results in a single base G/T change with the substitution of the amino acid serine for alanine. Some failures regarding the biological function of the variant protein were demonstrated as the structural location of the polymorphism is an important association domain that can have an effect on the cell cycle and different interactions with the DNA repair machinery [17].

Some studies try to establish an association between this polymorphism and predisposition to some types of cancer. Kanzaki et al. (2006) observed that the polymorphism is two times more common in Japanese patients with lung cancer than in the general Japanese population, in which the frequency is approximately 11% [22]. DONNINGER et al. (2011) presented results that show a strong association between the presence of this polymorphism and the development of breast cancer. However, there have been reports of the presence of this polymorphism in approximately 29% of the general European population [17].

So, even though it was not found in the control group, a possible association between the Ala133Ser (A133S) polymorphism and MDS needs to be further investigated in larger study samples.

It is extremely important that studies investigating specific genes that might be associated with the etiology of the disease continue to be performed, thereby providing more information on the prognosis and assisting in targeting specific treatment.

Table 1: Primer sequences

<i>RASSF1A</i> - Exon 3	F-GCCAAAGGCAGTCAGTTTCC R- CCCCTTCCTGAGCAGTCAAC	231
	Fa-GGAACCTATTATCAAGGTTTGGTTT Ra- AGCATCCTTGGGCAGGTAAA;	220
<i>RASSF1A</i> - Exon 4	Fb- CCGCACTTCCTTTTACCTGC Rb- CATGCTCAGGTGCATGCGTA	201
<i>RASSF1A</i> - Exon 5	F-TGATCATTACTTCCCCTTCACAGT R- AGTGACAACCAAGAACTAAGAACT	174

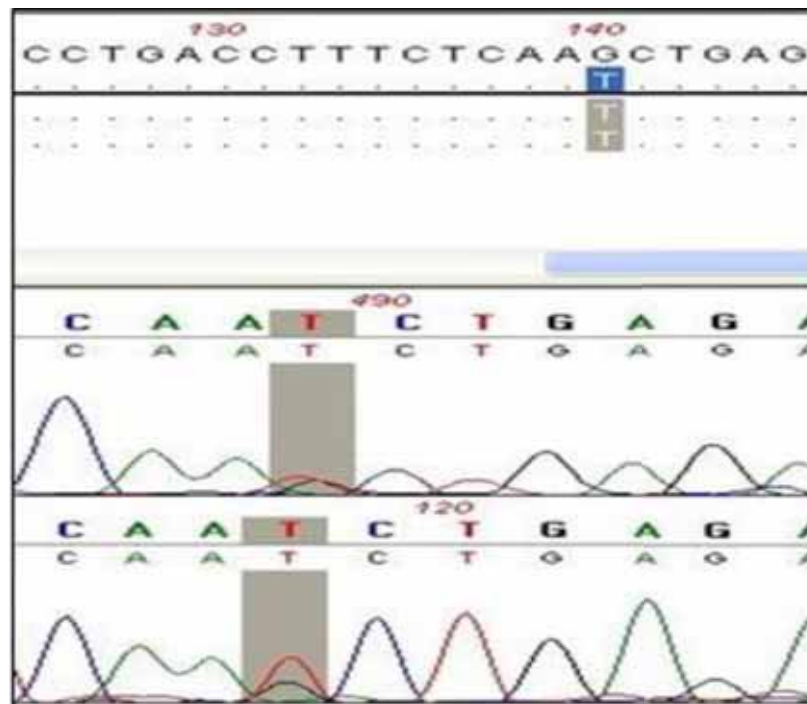


Figure 1: Electropherogram showing the exchange of the G/T base in codon 133 of exon 3. The highlighted region is the location of base exchange observed in two cases.

References

1. Dinmohamed A J, et al. Trends in incidence, initial treatment and survival of myelodysplastic syndromes: A population-based study of 5144 patients diagnosed in the Netherlands from 2001 to 2010. *Eur J Cancer*. 2013; <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejca.2013.12.002>.
2. Komrokji R S, Padron E, Lancet J E, List A F. Prognostic Factors and Risk Models in Myelodysplastic Syndromes. *Clinical Lymphoma, Myeloma & Leukemia*. 2013; 13: 295-9.
3. Natelson E A, Pyatt D. Acquired Myelodysplasia or Myelodysplastic Syndrome: Clearing the Fog. *Advances in Hematology*, 2013.
4. Germing U, Kobbe U, Haas R, Gattermann N. Myelodysplastic Syndromes: Diagnosis, Prognosis, and Treatment. *Dtsch Arztebl Int*, 2013; 110(46): 783–90. DOI: 10.3238/arztebl.2013.0783.
5. Fedeli U, Schievano E, Rodeghiero F, Saugo M. Mortality from myelodysplastic syndromes: a multiple causes of death approach. *American Journal of Hematology*, 2013; v. : 2-15.
6. Gahariani I, Braham N, Hassine M, Kortas M. Myelodysplastic syndrome classification. *Ann Biol Clin*, 2013; 71(2): 139-44.
7. Ademàa V, et al. Application of FISH 7q in MDS patients without monosomy 7 or 7q deletion by conventional G-banding cytogenetics: Does -7/7q- detection by FISH have prognostic value? *Leukemia Research*. 2013; 37: 416– 421.
8. Abdel- Wahab O, Figueroa M E. Interpreting new molecular genetics in myelodysplastic syndromes. *American Society of Hematology*. 2012; 56-64.
9. BEJAR R, et al. Clinical Effect of Point Mutations in Myelodysplastic Syndromes. *The New England Journal of Medicine*. 2011; 26; 496-506.
10. Otrrock Z K, Tiu R M, Maciejewski J P, Sekekeres M A. The need for additional genetic markers for myelodysplastic syndrome stratification: what does the future hold for prognostication? *Expert Review of Hematology*, 2013; 6: 59-68
11. Tothova Z, Steensma D P, Ebert B L. New Strategies in Myelodysplastic Syndromes: Application of Molecular Diagnostics to Clinical Practice. *Clinical Cancer Research*, 2013; 19: 1637–43.
12. Zhou, et al. Polymorphism of A133S and promoter hypermethylation in Ras association domain family 1A gene (RASSF1A) is associated with risk of esophageal and gastric cardia cancers in Chinese population from high incidence area in northern China. *BMC Cancer*, 2013; 13: 1-10.
13. Khalid A. M, Asano A, Hosaka Y Z, Takeuchi T, Yamano, Y. Tumor Suppressor Candidat TUSC3 Expression during Rat Testis Maturion. 2013; Online Publication [doi:10.1271/bbb.130327].
14. ZARE-ABDOLLAHI D, Safari S, Movafagh A, Ghadiani M, Riazi-Isfahani S, Omrani D. Intact expression status of RASSF1A in acute myeloid leukemia. *Med Oncol*. 2014; 31; 1-5.
15. Korah R, Healy J M, Kunstman J W, Fonseca A L, Ameri A L, Prasad M L, Carling T. Epigenetic silencing of RASSF1A deregulates cytoskeleton and promotes malignant behavior of adrenocortical carcinoma. *Molecular Cancer*. 2013; 12; 1-13.
16. Ng, et al. Alterations of RAS signalling in Chinese multiple myeloma patients: absent BRAF and rare RAS mutations, but frequent inactivation of RASSF1A by transcriptional silencing or expression of a non-functional variant transcript. *British Journal of Haematology*, 2003; 123: 637-645.

17. Donninger H, Barnoud T, Nelson N, Kassler S, Clark J, Cummins T D, Powell D W, Nyante S, Millikan R C, Clark G J. RASSF1A and the rs 2073498 cancer associated SNP. *Frontiers in Oncology*, v. 1, p. 1-7, 2011.
18. Korah R, Healy J M, Kunstman J W, Fonseca A L, Ameri A L, Prasad M L, Carling T. Epigenetic silencing of RASSF1A deregulates cytoskeleton and promotes malignant behavior of adrenocortical carcinoma. *Molecular Cancer*, 2013; 12: 1-13.
19. Kashuba V I, Pavlova T V, Grigorieva E V, Kustsenko A, Yenamandra S P. High Mutability of the Tumor Suppressor Genes RASSF1 and RBSP3 (CTDSPL) in Cancer. *PLOS ONE*, 2009; 4 : 1-12.
20. Zare-Abdollahi D, Safari S, Movafagh A, Ghadiani M, Riazi-Isfahani S, Omrani D. Intact expression status of RASSF1A in acute myeloid leukemia. *Medicine Oncology*, 2014; 31: 1-5.
21. Johan M F, Bowen D T, Frew M E, Goodeve A C, Reilly J T. Aberrant methylation of the negative regulators RASSF1A, SHP-1 and SOCS-1 in myelodysplastic syndromes and acute myeloid leukaemia. *British Journal of Haematology*, 2005; 129(1): 60-65.
22. Kanzaki, et al. Single nucleotide polymorphism at codon 133 of the RASSF1 gene is preferentially associated with human lung adenocarcinoma risk. *Cancer Letters*, 2006; 238: 128–134.

Autorizo a reprodução xerográfica para fins de pesquisa.

São José do Rio Preto, ___/___/___

Assinatura