



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

Paula Curi de Freitas

Análise de Alterações Cromossômicas, Mutações no Éxon 1 e  
do Padrão de Metilação da Região Promotora do Gene *FOXO3*  
em Síndrome Mielodisplásica

São José do Rio Preto  
2015

Paula Curi de Freitas

Análise de Alterações Cromossômicas, Mutações no Éxon 1 e  
do Padrão de Metilação da Região Promotora do Gene *FOXO3*  
em Síndrome Mielodisplásica

Tese apresentada como parte dos requisitos para  
obtenção do título de Doutor 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.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Agnes Cristina Fett Conte

São José do Rio Preto  
2015

Freitas, Paula Curi de.

Análise de alterações cromossômicas, mutações no Éxon 1 e do padrão de metilação da região promotora do gene Foxo3 em síndrome mielodisplásica / Paula Curi de Freitas. -- São José do Rio Preto, 2015

93 f. : il., tabs.

Orientador: Agnes Cristina Fett Conte

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

1. Genética humana. 2. Citogenética humana. 3. Síndromes mielodisplásicas - Aspectos genéticos. 4. Epigenética. 5. Polimorfismo (Genética) 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

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

Paula Curi de Freitas

Análise de Alterações Cromossômicas, Mutações no Éxon 1 e  
do Padrão de Metilação da Região Promotora do Gene *FOXO3*  
em Síndrome Mielodisplásica

Tese apresentada como parte dos requisitos para  
obtenção do título de Doutor 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<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Agnes Cristina Fett Conte  
FAMERP – São José do Rio Preto  
Orientadora

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Ana Elizabete Silva  
UNESP – São José do Rio Preto

Prof. Dr. Társis Antonio Vieira  
UNICAMP – Campinas

Prof. Dr. Flávio Augusto Naoum  
A.C.T– São José do Rio Preto

Prof. Dr. Carlos Fábio Mendiburu  
UNILAGO – São José do Rio Preto

São José do Rio Preto  
23 de fevereiro de 2015.

## AGRADECIMENTOS

Desejo expressar os meus sinceros agradecimentos:

A Deus.

À minha orientadora, Dra. Agnes Cristina Fett Conte pela oportunidade de desenvolver esta pesquisa, pela paciência, dedicação e por tudo que me ensinou durante este período.

Aos meus pais, Ligia e Paulo, principalmente pelo incentivo ao ensino, pela compreensão, amor, carinho e atenção.

Ao meu marido Marlos, pela compreensão nos momentos difíceis, pela ajuda e companheirismo durante todo este tempo compartilhado.

Ao meu irmão Fábio e a todos os familiares pelo apoio e confiança.

Aos membros da banca examinadora, pela disponibilidade, atenção e sugestões.

Ao Dr. Octávio Ricci Junior e 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.

Ao Prof. Dr. Maurício Nogueira pelo auxílio no desenvolvimento da parte molecular deste estudo em seu laboratório.

A todos os membros da equipe do Laboratório de Genética: Andrea Borduchi, Brasilina Maffei, Cristina Vendrame, Paula Abdala e Valéria Ferrarese, pela amizade e carinho que proporcionam um ótimo ambiente de trabalho.

Aos amigos de laboratório, Camila Oliveira, Fernanda Monteiro, Dante Avanso, Patrícia Nascimento e a todos os amigos da graduação e pós-graduação, pelos momentos juntos, experiências compartilhadas e toda a ajuda durante estes 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 às coordenadoras.

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

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

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

*“Pesquisa é curiosidade formalizada. Estar mexendo e estar procurando com um propósito.”*

*Zora Neale Hurston*

## RESUMO

Síndromes Mielodisplásicas (SMD) ou mielodisplasias compreendem um conjunto heterogêneo de doenças hematopoéticas caracterizadas por hematopoese ineficaz, que geralmente apresentam citopenias no sangue periférico, diferenciação celular displásica e propensão ao desenvolvimento de leucemia mielóide aguda. São classificadas em vários tipos e a incidência anual é estimada entre quatro casos por 100.000 pessoas da população em geral, e em até 50 casos por 100.000 indivíduos com idades avançadas. A análise cromossômica das células da medula óssea (MO) ao diagnóstico detecta alterações relacionadas com diagnóstico e prognóstico, mas alguns genes também já foram relacionados à etiologia das mielodisplasias, por apresentarem mutações e alterações epigenéticas que podem resultar em alterações na hematopoese. O gene *FOXO3*, um supressor de tumor, é um dos genes que mais se expressa no tecido hematopoético normal, o que faz dele um possível candidato ao envolvimento na etiopatogenia das doenças da MO. Entretanto, não foram encontrados estudos sobre *FOXO3* em SMD. Alterações neste gene poderiam resultar em hematopoese anormal. O objetivo deste trabalho foi estudar células da MO de 100 indivíduos com SMD de qualquer tipo, ao diagnóstico, para investigar mutações no éxon 1 e o padrão de metilação da região promotora do *FOXO3*, além da presença de alterações cromossômicas. Para a análise molecular foi extraído o DNA, realizada a amplificação gênica por PCR e realizado o sequenciamento direto do éxon 1; para o estudo epigenético, foi feita a conversão do DNA por bissulfito e a MSP-PCR, e a análise citogenética foi realizada em metáfases submetidas ao bandamento GTG. No éxon 1 foi observado o polimorfismo 159C>T em 26% pacientes e em 16% controles, o que não diferiu estatisticamente ( $p>0,05$ ). O estudo do padrão de metilação da ilha CpG estudada da região promotora do gene *FOXO3* revelou ausência de metilação. Sete casos apresentaram alterações cromossômicas: deleção intersticial do braço longo do cromossomo 5; monossomia do cromossomo 7; monossomia do cromossomo 22; deleção do braço longo do cromossomo 20; um cariótipo complexo e dois casos de hipodiploidia. Tais alterações puderam ser relacionadas ao diagnóstico e/ou prognóstico dos doentes. Os resultados sugerem que mutações no éxon 1 do *FOXO3*, o polimorfismo 159C>T e alterações no padrão de metilação da região promotora deste gene não parecem estar relacionados com etiologia das SMD. Entretanto, a frequência deste polimorfismo merece ser melhor investigada em outros grupos de doentes. A análise citogenética em SMD é importante e independe de outras avaliações, com implicações diretas no manuseio clínico.

**Palavras-chave:** Mielodisplasia, gene *FOXO3*, epigenética, alterações citogenéticas.

## ABSTRACT

Myelodysplastic syndromes (MDS) or myelodysplasia constitute a heterogeneous group of hematopoietic diseases characterized by ineffective hematopoiesis usually with peripheral blood cytopenias, dysplastic cell differentiation and a tendency to evolve to acute myeloid leukemia. They are classified in various types and the annual incidence is estimated at between four cases per 100,000 individuals in the general population and up to 50 cases per 100,000 with advanced ages. A chromosomal analysis of bone marrow cells at diagnosis identifies changes related with diagnosis and prognosis, but some genes are also associated to the etiology of myelodysplasia, for presenting mutations and epigenetic changes that may result in alteration in hematopoiesis. The *FOXO3* gene, tumor suppressor, is one of the most commonly expressed genes in normal hematopoietic tissue, which makes it a possible candidate for involvement in the pathogenesis of diseases of the bone marrow. However, no studies were found on *FOXO3* in MDS. The changes in this gene could therefore result in abnormal hematopoiesis. The aim of this work was to study bone marrow cells from 100 patients diagnosed with any type of MDS, to investigate mutations in exon 1 and the methylation pattern of *FOXO3* promoter region, and the presence of chromosomal alterations. For molecular analysis, DNA was extracted, gene amplification was achieved by polymerase chain reaction and direct sequencing of exon 1 was performed, for epigenetic study, the bisulfite conversion of DNA, and subsequently carrying out the MSP -PCR was performed, and cytogenetic analysis was performed on metaphases submitted to GTG banding. In exon 1 was observed the 159C>T polymorphism in 26% patients and in 16% healthy controls, wich not statistically significant ( $p>0,05$ ). The study of methylation pattern of CpG island the promoter region of the gene *FOXO3* revealed no methylation. Seven cases showed chromosomal abnormalities characterized as the interstitial deletion of the long arm of chromosome 5, monosomy 7, monosomy 22, deletion of the long arm of chromosome 20; karyotype complex; two cases of hypodiploid. All were correlated to the diagnosis and/or prognosis of patients. The results suggest that mutations in exon 1 of *FOXO3*, the 159C>T polymorphism and changes in the methylation pattern of the promoter region of this gene are not related to the etiology of MDS. However, the frequency of this polymorphism requires to be investigated in other groups of patients. Cytogenetic analysis in MDS is important and is independent of other reviews, with direct implications for clinical management.

**Keywords:** Myelodysplasia, *FOXO3* gene, epigenetic, citogenetics abnormalities.



## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Frequências das alterações cromossômicas mais comuns em SMD.....	14
<b>Figura 2.</b> Distribuição da frequência de anomalias cromossômicas clonais relacionadas com SMD em 1.080 pacientes.....	14
<b>Figura 3.</b> Ação do gene <i>FOXO3</i> no núcleo e citoplasma.....	18
<b>Figura 4.</b> Metilação do DNA. (A) A metilação da base citosina. (B) Diagrama que ilustra os efeitos da metilação nas ilhas CpG na região promotora dos genes.....	20
<b>Figura 5.</b> Relação dos diagnósticos e idades dos pacientes com SMD.....	28
<b>Figura 6.</b> Perfil eletroforético em gel de agarose a 2%.....	38
<b>Figura 7.</b> Eletroferograma parcial das sequencias do éxon 1, destacada a posição 159 com a sequência normal.....	39
<b>Figura 8.</b> Eletroferograma parcial das sequencias do éxon 1, destacada a posição 159 com a presença da timina, evidenciando a substituição C>T.....	39
<b>Figura 9.</b> Identificação no eletroferograma das formas em homozigose e heterozigose do polimorfismo.....	40
<b>Figura 10.</b> Gel de poliacrilamida a 8% evidenciando o padrão de bandas do gene <i>FOXO3</i> após a técnica de MSP-PCR.....	41
<b>Figura 11.</b> Metáfases do caso 7 submetidas à técnica de bandamento GTG.....	42
<b>Figura 12.</b> Metáfases do caso 9 submetidas à técnica de bandamento GTG.....	43
<b>Figura 13.</b> Metáfases submetidas a técnica de bandamento GTG.....	43
<b>Figura 14.</b> Metáfases do indivíduo 30 submetidas à técnica de bandamento GTG.....	44
<b>Figura 15.</b> Metáfases em bandamento GTG do caso 55.....	44
<b>Figura 16.</b> Cariograma da metáfase b do caso 55.....	45
<b>Figura 17.</b> Metáfases em bandamento GTG do caso 88.....	45

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Classificação das Síndromes Mielodisplásicas segundo a Organização Mundial da Saúde (VARDIMAN, 2012 com modificações), de acordo com as manifestações observadas no sangue periférico (SP) e na medula óssea (MO).....	<b>13</b>
<b>Tabela 2.</b> Sistema Internacional de Pontuação de Prognóstico (IPSS-R) de acordo com os achados cariotípicos.....	<b>16</b>
<b>Tabela 3.</b> Caracterização da casuística quanto a idade (em anos), sexo e diagnóstico (tipo de SMD) .....	<b>26</b>
<b>Tabela 4.</b> Condições da reação de PCR utilizada para a amplificação do éxon 1.....	<b>30</b>
<b>Tabela 5.</b> Programa de amplificação utilizado para os primers do éxon 1 do gene <i>FOXO3</i> .....	<b>30</b>
<b>Tabela 6.</b> Condições para reação de sequenciamento do éxon 1 do gene <i>FOXO3</i> .....	<b>31</b>
<b>Tabela 7.</b> Condições da reação utilizada para a amplificação do gene <i>FOXO3</i> para o estudo da metilação.....	<b>33</b>
<b>Tabela 8.</b> Parâmetros para amplificação da reação de metilação do gene <i>FOXO3</i> .....	<b>33</b>
<b>Tabela 9.</b> Caracterização da sequência polimórfica do éxon 1 do gene <i>FOXO3</i> .....	<b>38</b>
<b>Tabela 10.</b> Frequência do polimorfismo nos indivíduos com SMD e indivíduos saudáveis.....	<b>38</b>
<b>Tabela 11.</b> Frequência do polimorfismo encontrado nos diferentes tipos de SMD.....	<b>40</b>
<b>Tabela 12.</b> Alteração cromossômica clonal observada em cada caso.....	<b>41</b>

## LISTA DE ABREVIATURAS

AREB 1	Anemia refratária excesso de blastos 1
AREB 2	Anemia refratária excesso de blastos 2
ARSA	Anemia refratária com sideroblastos em anel
CPG	Citosina-fosfato-guanina
CRDM	Citopenia Refratária com displasia em multilinhagem
CRDU	Citopenia refratária com displasia em uma linhagem
DNMT	DNA metiltransferases
EPO	Eritropoietina
IPSS-R	Sistema Internacional de Pontuação e Prognóstico Revisado
ISCN	International System for Human Cytogenetic Nomenclature
KCl	Cloreto de potássio
LLA	Leucemia Linfoblástica Aguda
LMA	Leucemia Mielóide Aguda
MSP-PCR	Reação da cadeia da polimerase- Metilação específica
MO	Medula óssea
OMS	Organização Mundial da Saúde
PCR	Reação da cadeia da polimerase
PI3-K	Fosfoinositide-3-quinase
PKB	Proteína quinase B
SMD	Síndrome Mielodisplásica
SNP	Polimorfismo de nucleotídeo simples
SP	Sangue periférico
5mC	5-metilcitosina

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO .....	11
2. OBJETIVOS .....	23
3. MATERIAL E MÉTODOS .....	25
3.1 Casuística .....	25
3.2 Métodos.....	28
3.2.1 Extração de DNA .....	28
3.2.2 Amplificação do éxon 1 do gene <i>FOXO3</i> e eletroforese em gel de agarose.....	29
3.2.3 Purificação dos produtos de PCR para sequenciamento.....	30
3.2.4 Sequenciamento direto.....	30
3.2.5 Análise do padrão de metilação.....	31
3.2.5.1 Metilação <i>in vitro</i> da amostra controle.....	32
3.2.5.2 Conversão do DNA por bissulfito de sódio.....	32
3.2.5.3 MSP-PCR .....	32
3.2.6 Cultivo Celular e análise citogenética.....	34
3.2.6.1 Bandamento GTG .....	34
4. RESULTADOS .....	37
4.1 Resultados moleculares .....	37
4.1.1 Sequenciamento do éxon 1 do gene <i>FOXO3</i> .....	37
4.1.2 Padrão de Metilação .....	40
4.2 Resultados citogenéticos .....	41
5. DISCUSSÃO.....	47
6. CONCLUSÕES.....	56
7. REFERÊNCIAS .....	58
APÊNDICE A - Artigo 1 .....	68
APÊNDICE B - Artigo 2 .....	80
APÊNDICE C – Artigo 3.....	84



## 1. INTRODUÇÃO

Síndromes Mielodisplásicas (SMD), também encontradas na literatura nominadas como mielodisplasias ou síndrome mielodisplásica, correspondem a uma condição hematopoética maligna associada a idade avançada. Trata-se de um conjunto heterogêneo de doenças hematopoéticas que são caracterizadas por distúrbios de diferenciação e maturação celular e por alterações no estroma da medula óssea (MO). São, portanto, displasias das células da MO, que se caracterizam pela diminuição da capacidade de diferenciação celular e pelo aumento da apoptose, que resultam em hematopoese ineficaz, geralmente com citopenias no sangue periférico resultando em hemorragia, infecções, anemia, diferenciação celular anormal e possibilidade de evolução para Leucemia Mielóide Aguda (LMA). As manifestações clínicas são inespecíficas e altamente variáveis, dependendo do tipo de SMD, podendo ser de curso indolente a extremamente grave, com risco de morte, o que faz da doença um desafio diagnóstico peculiar para os hematologistas. (MA, 2012; FORAN, SHAMMO, 2012; KAWANKAR et al, 2012; GERMING et al., 2013; SÁNCHEZ-CASTRO et al., 2013; GARCIA-MANERO, 2014).

A incidência das SMD aumenta com a idade, o que é muito comum nas afecções das células da MO. É de quatro casos por 100.000 pessoas considerando-se todas as faixas etárias, mas atinge 50 casos por 100.000 em idades superiores a 70 anos. A prevalência é de sete em 100.000 indivíduos. Também, outros problemas de saúde relacionados com a idade avançada, como as anemias de outras causas, podem imitar as apresentações da doença. (GARCIA-MANERO, 2012; FORAN, SHAMMO, 2012; RAZA, GALILI, 2012; GERMING et al., 2013; SOUZA et al., 2014; UDAYAKUMAR et al., 2015; ZHANG et al., 2015). Apesar de haver relatos de SMD na infância, os dados clínicos são escassos, em parte pela raridade da doença nesta fase, e também por causa de dificuldades no diagnóstico e classificação. SMD em crianças tem incidência de 1,8-4 casos por milhão, com uma frequência menor que 5% entre todas as neoplasias hematopoéticas que ocorrem em crianças até 14 anos (CHATTERJEE, CHOUDHRY, 2013).

SMD são denominadas primárias, ou *de novo*, e secundárias. Estas últimas surgem após tratamento quimio ou radioterápico de outras doenças, ou exposição a agentes tóxicos ambientais, como pesticidas, solventes e benzeno, sendo o tabagismo a principal fonte de exposição a este último (MA, 2012; RASHID et al., 2014).

Com o objetivo de prover critérios para o diagnóstico e prognóstico, a Organização Mundial da Saúde (OMS) classifica as SMD em sete tipos: Citopenia refratária com displasia

em uma linhagem (CRDU); Anemia refratária com sideroblastos em anel (ARSA); Citopenia refratária com displasia de multi-linhagem (CRDM); 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) isolada (Tabela 1). Os critérios diferenciais mais importantes são a quantidade de linhagem celular displásica, o grau de proliferação dos blastos e a presença da deleção no braço longo do cromossomo 5. (GERMING et al., 2012; VARDIMAN, 2012; ADÈS et al., 2014).

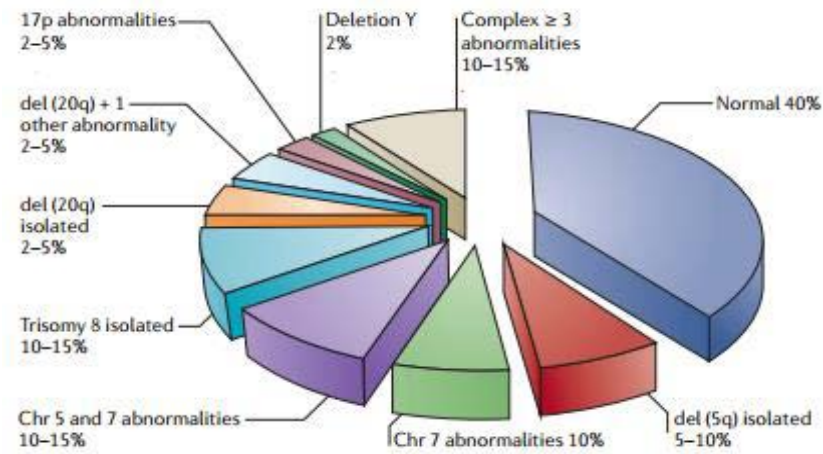
Anomalias cromossômicas são detectadas em aproximadamente 30% a 50% dos indivíduos com SMD primária e em 80% dos pacientes com SMD secundária. O achado citogenético também é útil para diagnóstico diferencial e para distinguir entre hiperplasia e proliferação monoclonal maligna. Durante a terapia, a citogenética pode ser usada para monitorar a frequência das células clonais na MO, ou seja, resposta terapêutica. A análise citogenética das células displásicas da MO é determinante para a patogênese, diagnóstico, prognóstico e escolha terapêutica, além de permitir o entendimento dos mecanismos biológicos envolvidos e poder caracterizar a evolução clonal da doença (NYBAKKEN, BAGG, 2014). Mas, 20-70% dos pacientes com cariótipo normal apresentam alterações submicroscópicas como mutações pontuais, microdeleções, microampliações, alterações epigenéticas ou de número de cópias, além de perda da informação genética por dissomia uniparental, caracterizando a base molecular da doença (KAWANKAR et al., 2012; GIAGOUNIDIS, HAASE, 2013).

As anomalias cromossômicas encontradas em SMD geralmente consistem em deleções, perdas e ganhos de cromossomos inteiros, que promovem alteração da dosagem de genes. As mais frequentes são: del(5q), del(7q), -7, +8, -Y, del(11q), del(12p) e del(20q). Cromossomos distintos estão frequentemente envolvidos. Anormalidades dos cromossomos 5, 7 e 8 juntas respondem por 50%-70% de todas as alterações citogenéticas observadas (Figura 1). Uma cooperação internacional resultou em uma base de dados com 2.124 casos de SMD. Nesta base consta o percentual de anormalidades citogenéticas clonais por cromossomo (Figura 2) (GIAGOUNIDIS, HAASE, 2013).

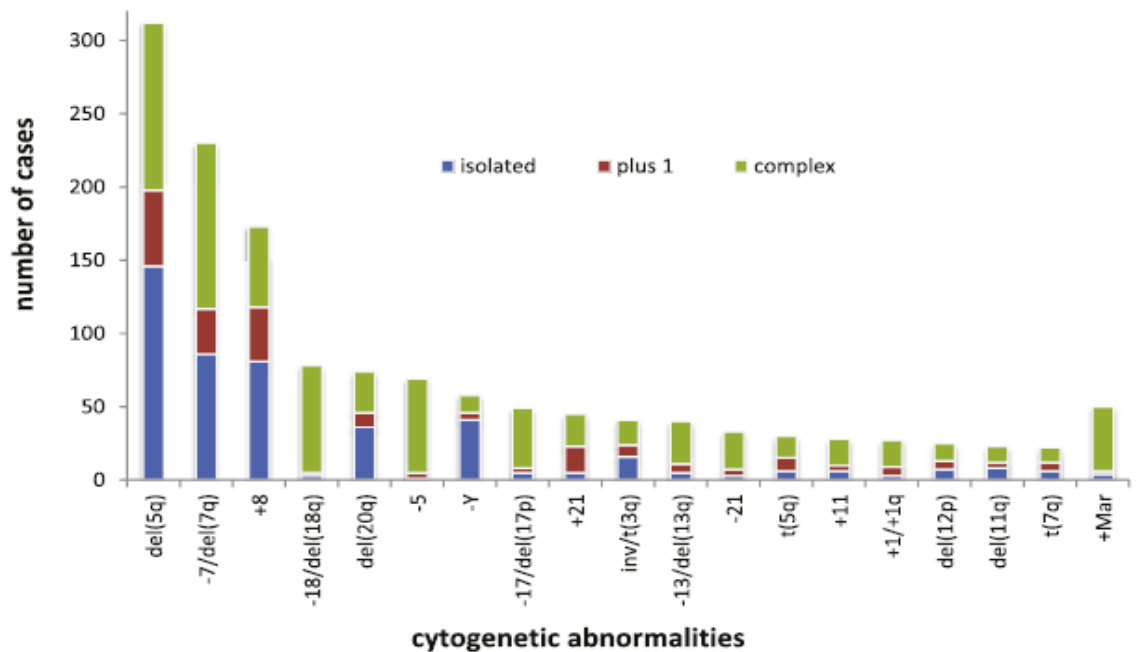
**Tabela 1. Classificação das Síndromes Mielodisplásicas segundo a Organização Mundial da Saúde (VARDIMAN, 2012 com modificações), de acordo com as manifestações observadas no sangue periférico (SP) e na medula óssea (MO).**

<b>Tipo</b>	<b>SP</b>	<b>MO</b>
<b>Citopenias refratárias com displasia em uma linhagem (CRDU): anemia refratária, neutropenia refratária, trombocitopenia refratária.</b>	-Unicitopenia ou bicitopenia -Blastos ausentes ou raros (<1%)	- $\geq 10\%$ de células displásicas de uma única linhagem mielóide - <5% de blastos -15% de precursores eritróides são sideroblastos em anel
<b>Anemia refratária com sideroblastos em anel (ARSA)</b>	-Anemia -Blastos ausentes	- $\geq 15\%$ de precursores eritróides são sideroblastos em anel - <5% de blastos
<b>Citopenia refratária com displasia de multi-linhagem (CRDM)</b>	-Citopenia(s) -Blastos raros ou ausentes -Ausência de bastonetes de Auer - < $1 \times 10^9/L$ monócitos	-Displasia em >10% das células em duas ou mais linhagens - <5% de blastos -Ausência de bastonetes de Auer - < $1 \times 10^9/L$ monócitos
<b>Anemia Refratária com Excesso de Blastos 1 (AREB-1)</b>	-Citopenia(s) - < 5% blastos -Ausência de bastonetes de Auer - < $1 \times 10^9/L$ monócitos	-Displasia em uma ou mais linhagens -5% a 9% de blastos -Ausência de bastonetes de Auer
<b>Anemia Refratária com Excesso de Blastos 2 (AREB-2)</b>	-Citopenia(s) - 5% a 19% de blastos -Bastonetes de Auer - < $1 \times 10^9/L$ monócitos	-Displasia em uma ou multilinhagens - 10% to 19% de blastos -Bastonetes de Auer
<b>SMD sem classificação</b>	-Citopenias - < 1% blastos	-Displasia inequívoca em <10% de uma ou mais linhagens mieloides acompanhada de alteração citogenética relacionada a SMD - <5% de blastos
<b>SMD Associada com del(5q) isolada</b>	-Anemia -Blastos ausentes ou raros -Número de plaquetas normal ou aumentado	-Número normal ou aumentado de megacariócitos com núcleo hipolobulado - <5% de blastos a del(5q) é isolada





**Figura 1.** Frequências das alterações cromossômicas mais comuns em SMD (RAZA, GALILI, 2012).



**Figura 2.** Distribuição da frequência de anomalias cromossômicas clonais relacionadas com SMD em 1.080 pacientes (GIAGOUNIDIS, HAASE, 2013).

Os pacientes possuem prognóstico amplamente variável, dependente das anomalias cromossômicas, alterações gênicas e alterações epigenéticas observadas, mas também por fatores específicos do paciente, como idade, sexo, morbidades, e necessidade de transfusão. Cariótipos anormais ou mais complexos mostram uma associação direta com a gravidade das SMD, que também aumenta com a contagem de blastos medulares e com a intensidade de displasias celulares (GIAGOUNIDIS, HAASE, 2013; MARSHALL, ROBOZ, 2013).

O Sistema Internacional de Pontuação de Prognóstico Revisado (IPSS-R) auxilia nas decisões terapêuticas e usa como base o cariótipo, citopenia e porcentagem de blastos na MO, sendo uma ferramenta para medir a probabilidade de sobrevivência e risco para a progressão de LMA em pacientes sem tratamento. Recentemente, uma nova classificação do risco citogenético em SMD foi proposta e inclui cinco subgrupos, incluindo 20 diferentes alterações. Os pacientes do grupo de risco muito elevado têm um tempo médio de sobrevida de apenas 0,8 anos, enquanto a média de sobrevida para os pacientes do grupo de risco muito baixo é 8,8 anos (GLAUSER et al. 2013; ADÈS et al., 2014; NEUKIRCHEN et al., 2014). A Tabela 2 apresenta a classificação do prognóstico pelo IPSS-R com base no cariótipo.

Quanto ao aspecto molecular, comparadas com as leucemias, as SMD são muito pouco conhecidas. Dados recentes sugerem que SMD é uma doença multigênica, com envolvimento de diversas mutações, mesmo nos estágios iniciais (GIAGOUNIDIS, HAASE, 2013). Estudos pré-clínicos demonstraram claramente que o desenvolvimento de SMD ocorre a partir de mutações adquiridas que aparentemente são independentes da sua apresentação morfológica ou fenotípica. O estudo do espectro amplo de alterações genéticas aumenta a eficácia de ferramentas de diagnóstico e prognóstico (ZHANG et al., 2015).

Ao contrário do que ocorre na maioria das neoplasias hematológicas malignas com translocações cromossômicas balanceadas, que resultam na ativação de oncogenes, as alterações cromossômicas mais frequentes em SMD podem contribuir para o surgimento ou desenvolvimento da doença por hipoexpressão de genes importantes, ou perda da heterozigidade e haploinsuficiência, que estão relacionadas com a inativação de genes supressores tumorais. A perda ou inativação deste tipo de gene parece ser o mecanismo biológico mais relevante na etiopatogenia das SMD (RAZA, GALILI, 2012; GIAGOUNIDIS, HAASE, 2013; SOUZA et al., 2014; VISCONTE et al., 2014).

**Tabela 2. Sistema Internacional de Pontuação de Prognóstico Revisado (IPSS-R) de acordo com os achados cariotípicos.**

Fator	Valor Prognóstico	Cariótipo
Citogenético	Muito Bom	del(11q) isolado; -Y isolado
	Bom	normal; der(1;7) isolado; del(5q) isolada; del(12p) isolada; del(20q) isolada; duas alterações com del(5q)
	Intermediário	-7/7q-; +8; iso(17q); +19; +21; qualquer outra alteração isolada ou quaisquer outras duas alterações
	Ruim	der(3q)(21), der(3q)(26) e del(3q); duas alterações envolvendo cromossomo 7 ou 7q; três alterações
	Muito Ruim	mais de três alterações

Vários estudos têm investigado marcadores moleculares de mielodisplasias, especialmente mutações, e mais de 40 genes apresentam mutações somáticas que podem ser relacionadas com a doença. Mais de 80% dos pacientes com SMD tem pelo menos uma anormalidade nos genes que controlam a regulação epigenética, *splicing*, fatores de crescimento, regulação da transcrição, apoptose ou estabilidade genômica (BEJAR, 2014). Estudos baseados em sequenciamento revelaram mutações somáticas no *TET2*, relacionado com regulação da transcrição, *Runx1*, responsável pelo desenvolvimento normal da hematopoese, *ASXL1*, envolvido na regulação epigenética e *JAK2*, que codifica uma proteína tirosina-quinase que ativa vias de transdução de sinal (GARCIA-MANERO, 2012; HAFERLACH, 2012; LUKACKOVA et al., 2014; ZHANG et al., 2015).

Polimorfismos também já foram relacionados à predisposição para SMD, como na região promotora do gene da eritropoietina (EPO), este está envolvido no controle da produção de eritróides e outras células hematopóéticas. O genótipo G/G do polimorfismo de nucleotídeo simples (SNP) rs1617640 é significativamente mais comum em pacientes com SMD e está associado com a diminuição da expressão do gene (MA et al., 2010). O polimorfismo rs1801320 do gene *RAD51*, com função de reparo do DNA, também tem sido

associado com aumento de risco de aparecimento de SMD (HE et al., 2014; RIBEIRO JR et al., 2014).

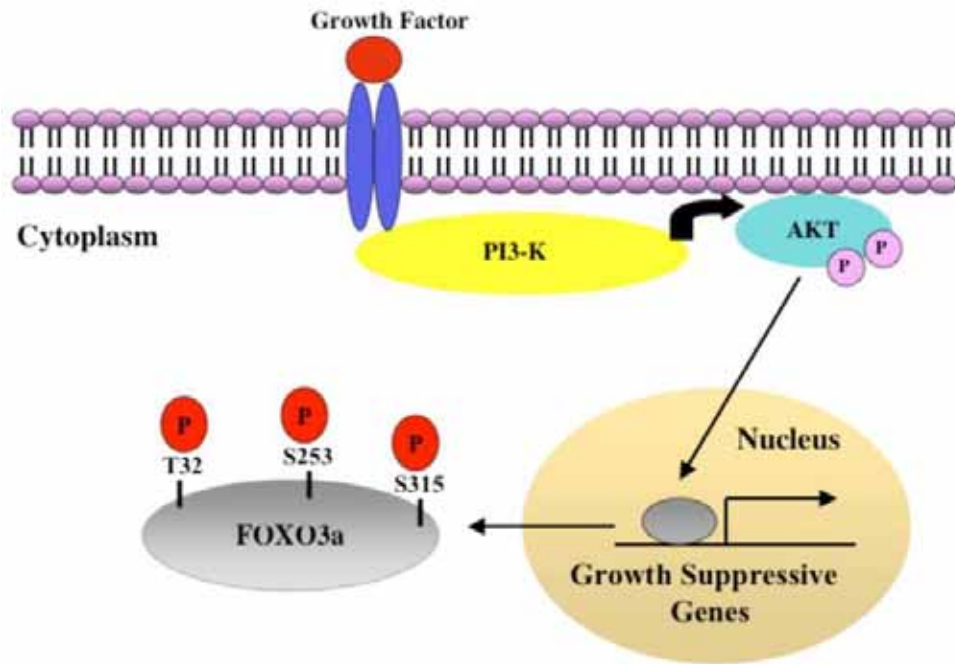
Um estudo realizado por componentes do mesmo grupo de pesquisa da autora deste projeto, em SMD AREB-1 e 2 ao diagnóstico, com a utilização da técnica SAGE (*Serial Analysis of Gene Expression*), mostrou um perfil diferente de expressão gênica das células da MO dos pacientes, quando comparado ao de células da MO de indivíduos saudáveis. Entre os genes com expressão significativamente diferente, validada por PCR em tempo real, o *FOXO3* apresentou hipopressão (MENDIBURU, 2009, comunicação pessoal).

O gene forkhead box O3 (*FOXO3*, *FOXO3a*, *AF6q21*, *FKHRL1*, *FKHRLIP2*) é um supressor de tumor. Está mapeado em 6q21 e tem três éxons, o éxon 1 com 621pb, o éxon 2 com 1.4kb e o 3 com 4.9kb, além de dois íntrons, incluindo um íntron localizado dentro da sequência codificante do domínio *forkhead*. Pertence à família de fatores de transcrição *forkhead*, que são caracterizados por conservar um domínio de ligação do DNA denominado “*forkhead box*”. Esse gene codifica uma proteína que controla a transcrição de vários genes cruciais para a regulação de uma grande variedade de processos biológicos incluindo a regulação do ciclo celular, longevidade, reparo de DNA, apoptose, envelhecimento, câncer, diabetes, resposta antioxidante, fertilidade, autofagia e neurogênese, todos necessários para a manutenção da homeostase e desenvolvimento (BUTT, 2012; LI et al., 2012; FLACHSBART et al., 2013; GENIN et al., 2014; TIKHANOVICH et al., 2014).

*FOXO3* desencadeia a apoptose modulando a expressão de outros genes envolvidos neste processo. Sua expressão aumentada é observada em muitos tecidos, inclusive, no sistema hematopoético, tecido adiposo, ovário, próstata (TIKHANOVICH et al., 2014).

O grupo de proteínas FOXO em humanos contém quatro membros: FOXO1, FOXO3, FOXO4, e FOXO6. A função e localização da FOXO3 dependem do seu estado de fosforilação. Os fatores de transcrição FOXO3, que agem como supressores tumorais, são os maiores alvos das quinases AKT, da família de proteínas AKT, cujos membros são também chamados de proteínas quinases B (PKB). A presença e posterior estimulação de fatores de crescimento como IGF-1, EGF, PDGF e insulina nos receptores cognitivos resultam na ativação do PI3-K (fosfoinosítide-3-quinase) e conseqüentemente a ativação da FOXO3 é desencadeada. Ocorre o recrutamento e ativação da Serina/Treonina quinase AKT, pela fosforilação e as proteínas FOXO são transferidas do núcleo para o citoplasma, impedindo a trans-ativação de genes alvos, como o *p130(RB2)*, *cyclin D*, *Bim*, *Fas ligand*, e *Bcl-X<sub>L</sub>*, que são importantes para a proliferação, morte e diferenciação celular (JAGANI et al., 2008; GOMES et al., 2013; NHO, HERGERT, 2014).

Na ausência de fatores de crescimento, as proteínas FOXO operam no núcleo e estão envolvidas em vários processos, como bloqueio do ciclo celular em G1 ou G2, reparo do DNA, diferenciação celular e apoptose. A Figura 3 apresenta o mecanismo biológico de ação do gene *FOXO3* conforme descrito acima (JAGANI et al., 2008; GOMES et al., 2013; NHO, HERGERT, 2014).



**Figura 3.** Ação do gene *FOXO3* no núcleo e citoplasma (JAGANI et al, 2008).

Estudos recentes demonstraram que a resposta aos danos no DNA está alterada durante a leucemogênese. A sinalização errônea em SMD e LMA facilita a aquisição da instabilidade genômica. A inibição da expressão e da atividade de *FOXO3* é fundamental para promover a transformação celular, progressão tumoral e angiogênese, entretanto, sua função específica e mecanismo de ação não estão bem esclarecidos (JAGANI et al, 2008). Há várias descrições sobre a participação do *FOXO3* em neoplasias humanas, como no câncer de mama, próstata, câncer de ovário e leucemias (THÉPOT et al., 2011; WARR et al., 2013; HU et al., 2014). Em um estudo sobre falência ovariana realizado por Wang e colaboradores (2010), os autores encontraram cinco mutações no gene *FOXO3* e três se encontravam no éxon 1.

Mas, a diversidade fenotípica em SMD não pode ser totalmente explicada pelas alterações citogenéticas e mutações gênicas, o que motivou a investigação de outros

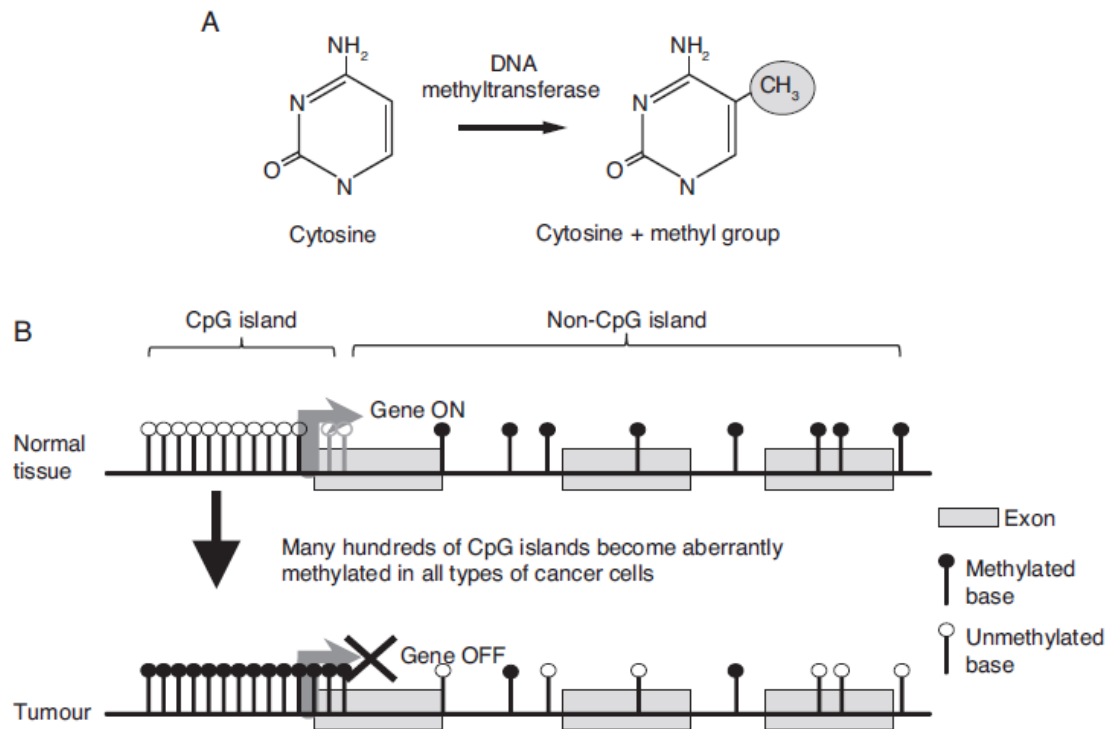
mecanismos responsáveis por essa doença, como o padrão de metilação do DNA (YAMAZAKI, ISSA, 2013; SANTINI et al., 2013).

Mudanças epigenéticas promovem variabilidade na expressão dos genes, sem afetar a sequência genética. O processo epigenético também pode resultar em diversidade biológica e variação fenotípica. É fundamental para a modulação de processos biológicos críticos, como embriogênese, senescência, inativação do cromossomo X, proliferação e diferenciação celular, além de transformação neoplásica (KARAGIANNIS, MAULIK, 2012; YAMAZAKI, ISSA, 2013, SANTINI et al., 2013, MELDI, FIGUEROA, 2014). Os três mecanismos envolvidos são a metilação do DNA, acetilação de histonas e RNA de interferência. Os dois primeiros mecanismos são mais favoráveis de ocorrer em SMD, de desempenhar um papel na hematopoese, através de bloqueio de expressão dos genes supressores tumorais (NYBAKKEN, BAGG, 2014).

A metilação do DNA é um processo bioquímico importante para o desenvolvimento normal de organismos superiores; corresponde a uma modificação covalente de citosinas, resultando na formação de 5-metilcitosina (5mC), uma base que muda as interações entre proteína e DNA (Figura 4-A). Este evento é mediado pela família de enzimas DNMT (DNA metiltransferases) que catalisam a transferência de um grupo metil da S-adenosil-metionina ao DNA (SHUZHEN et al., 2012; SANTINI et al., 2013).

Nas células de mamíferos adultos, a metilação do DNA normalmente afeta a citosina quando essa se situa em um dinucleotídeo citosina-fosfato-guanina (CpG). A metilação CpG pode ocorrer em qualquer parte do genoma, mas é particularmente relevante quando se trata de regiões ricas em CpG, chamadas ilhas CpG, definidas como regiões com mais de 200 bases com pelo menos 50% do conteúdo de G + C. Estas aparentemente estão presentes em cerca de metade das regiões promotoras dos genes humanos. A metilação destas ilhas está associada com a ausência de transcrição do promotor envolvido, que é estavelmente transmitida na mitose, garantindo assim uma herança clonal (Figura 4-B) (SANTINI et al., 2013, SEITER, 2013; YAMAZAKI, ISSA, 2013).

Embora a metilação de alguns genes seja relatada até como fator prognóstico em SMD, a maioria dos estudos das modificações epigenéticas em SMD, até o presente, têm focado principalmente a metilação do DNA de genes envolvidos na regulação do ciclo celular (*CDKN2A*), apoptose (*DAPK1* e *RIL*), adesão e motilidade (*CDH1* e *CDH13*), além de outros processos importantes, mas que aparentemente têm impacto funcional mínimo sobre a doença, porque eles não são expressos em células hematopoéticas normais (FONG et al., 2014).



**Figura 4. Metilação do DNA. (A) A metilação da base citosina. (B) Diagrama que ilustra os efeitos da metilação nas ilhas CpG na região promotora dos genes (SANTINI et al, 2013, com modificações).**

As ilhas CpG da região promotora da maioria dos genes não estão metiladas em tecidos normais, independentemente do estado de diferenciação. Entretanto, centenas delas tornam-se hipermetiladas nas SMD. Desde a descoberta de que a azacitidina prolonga a sobrevivência global dos doentes com SMD de alto risco, este agente foi incorporado no tratamento padrão para a doença. A ação de hipometilação da droga parece reativar a expressão de genes supressores tumorais em pacientes com SMD e LMA. No entanto, o sucesso clínico deste e de outros agentes hipometilantes também pode ser atribuído ao fato deles também ativarem os fatores de resposta a danos no DNA (THÉPOT et al., 2011).

A metilação anormal nas mielodisplasias pode ocorrer antes e muitas vezes independente de alterações citogenéticas. De fato, vários estudos têm demonstrado que o aumento da metilação do DNA e anomalias cromossômicas é diretamente proporcional à transição maligna de SMD para LMA. Estas alterações são altamente específicas, com padrões de metilação característicos capazes de diferenciar os tipos de malignidades hematológicas. Estudos mais recentes revelaram hipermetilação de 3% a 5% das ilhas CpG

das regiões genômicas promotoras em SMD, e que alguns dos genes envolvidos são expressos em células hematopoéticas normais, com prováveis consequências funcionais para as células neoplásicas (ISSA, 2013; BRAVO et al., 2014; MELDI, FIGUEROA, 2014; ZHAO et al., 2014).

Um exemplo é o regulador do ciclo celular *P15*, que aparentemente atua como um supressor de tumor em células hematopoéticas. A hipermetilação da sua região promotora é observada em 10% a 30% dos casos de SMD, o que está associado com um prognóstico ruim (ISSA, 2013). Entretanto, a literatura tem progressivamente apresentado resultados de estudos que revelam hipermetilação anormal de vários outros genes supressores tumorais em SMD e leucemias, envolvidos principalmente no ciclo celular e apoptose (LEE et al., 2012; SHUZHEN et al., 2012; GARCIA-MANERO, 2014).

Em Leucemia Linfoblástica Aguda (LLA), em crianças e adultos, entre os genes com diminuição significativa na expressão, o *FOXO3* hipermetilado já foi observado e proposto como relevante na etiopatogenia da doença (DAVIDSSON et al., 2009; OKAMOTO et al., 2010).

A hipótese científica testada no presente estudo é que além de alterações citogenéticas que são comumente encontradas em SMD, mutações, polimorfismos ou hipermetilação da região promotora do gene *FOXO3*, podem estar relacionadas com a etiopatogenia destas doenças.





## 2. OBJETIVOS

### Geral

Realizar a investigação de mutações e polimorfismos no éxon 1 do gene *FOXO3*, o padrão de metilação da sua região promotora e a presença de alterações cromossômicas em células da medula óssea de indivíduos com Síndromes Mielodisplásicas.

### Específicos:

- 1- Investigar a presença de mutações e polimorfismos no éxon 1 do gene *FOXO3*, por sequenciamento direto, nas células da medula óssea de pacientes com SMD ao diagnóstico;
- 2- Analisar o padrão de metilação das ilhas CpGs da região promotora do gene *FOXO3*, com a utilização da técnica de MSP-PCR;
- 3- Estudar a presença e identificar alterações cromossômicas, por bandamento GTG, nas células da medula óssea de pacientes com SMD ao diagnóstico;
- 4- Relacionar os achados com o diagnóstico ou prognóstico destas doenças.



### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 Casuística

Após a aprovação do Comitê de Ética da FAMERP (nº4372/2011) e obtenção do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Resolução 196/96), foram estudados de forma prospectiva descritiva amostras de medula óssea de 100 indivíduos diagnosticados com Síndrome Mielodisplásica primária, antes de qualquer tipo de tratamento para a doença; 54 (54%) do sexo feminino e 46 (46%) do sexo masculino. As idades variaram de três a 83 anos ( $\bar{x}$ = 52,64; DP= 18,39). A Tabela 3 apresenta a caracterização da casuística quanto ao sexo, idade e diagnóstico (tipo de SMD). A figura 5 apresenta a relação entre os diagnósticos e a idade dos pacientes, classificadas de acordo com a OMS, crianças de 0 a 14 anos, jovens de 15 a 30 anos, adultos de 31 a 60 anos e idosos acima de 61 anos.

Todos os doentes foram procedentes do Serviço de Hematologia e Hemoterapia (Hemocentro) do Hospital de Base da Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto. Neste Serviço são recebidos cerca de 50 casos novos suspeitos por ano, entretanto, a confirmação do diagnóstico ocorre em cerca de 70% dos casos (RICCI JR, 2014, comunicação pessoal).

O diagnóstico de SMD seguiu os critérios da Organização Mundial da Saúde (OMS), revisada em 2008, e foi realizado e confirmado por dois hematologistas, que de forma independente analisaram o hemograma, o mielograma e exames complementares de cada caso, e estabeleceram o diagnóstico conclusivo. Foram excluídos cerca de 20 casos em que não houve concordância e/ou necessidade de maiores investigações por tempo prolongado para conclusão diagnóstica.

Entre os 100 indivíduos estudados, 46 (46%) apresentavam CRDM, 25 (25%) AREB-2, 24 (24%) AREB-1, 03 (3%) ARSA, 01 (1%) SMD com 5q- isolada e 01 (1%) apresentava CRDU.

Como controles, para comparação de resultados moleculares, após obtenção do TCLE, foram utilizadas amostras de DNA de sangue periférico de 100 indivíduos saudáveis, doadores de sangue do Hemocentro de São José do Rio Preto.

Só foram estudadas amostras obtidas de pacientes que concordaram em participar do estudo e assinaram o TCLE, que foi obtido pelas pesquisadoras ou médicos responsáveis pelos pacientes. Os resultados foram disponibilizados para os hematologistas e sua aplicação clínica ou não seguiu os critérios da equipe médica.

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 necessariamente e rotineiramente submetidos. Foram obtidos cerca de 5ml de MO de cada caso, divididos em amostra para cariótipo (heparinizada) e amostra para estudo molecular (em EDTA).

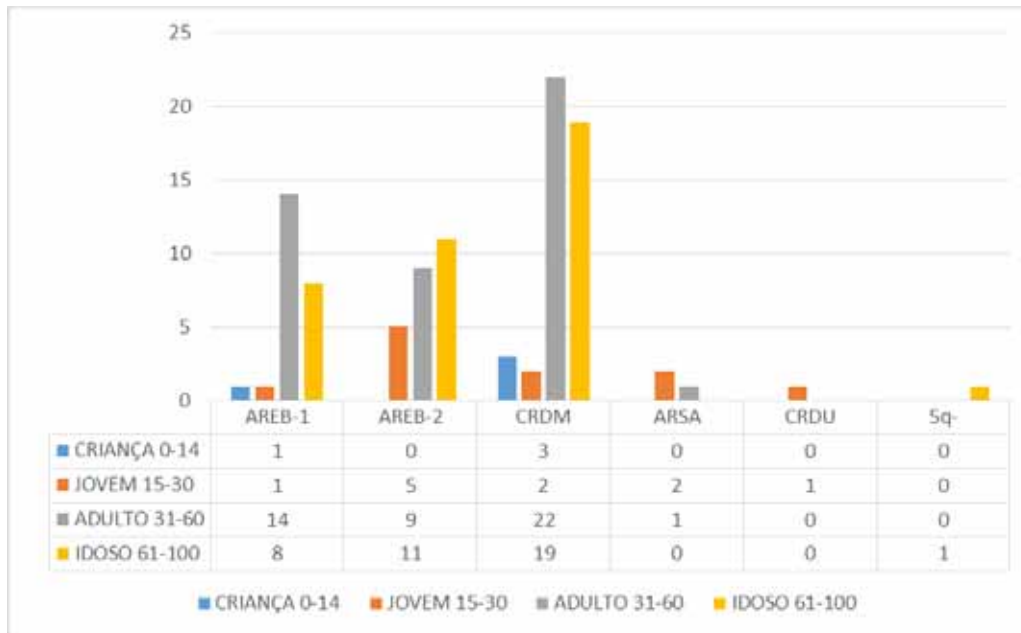
**Tabela 3. Caracterização da casuística quanto a idade (em anos), sexo e diagnóstico (tipo de SMD).**

<b>Pacientes</b>	<b>Idade</b>	<b>Sexo</b>	<b>Diagnóstico</b>
1	22	M	CRDM
2	22	M	AREB-2
3	76	M	AREB-2
4	65	M	AREB-2
5	30	F	AREB-2
6	63	M	AREB-2
7	78	F	5q-
8	59	M	AREB-1
9	66	M	AREB-2
10	66	M	AREB-2
11	43	F	ARSA
12	49	M	AREB-1
13	69	M	AREB-1
14	68	F	AREB-1
15	47	M	AREB-2
16	66	F	CRDM
17	36	F	AREB-2
18	60	F	AREB-2
19	34	M	AREB-2
20	49	F	CRDM
21	41	F	AREB-1
22	67	F	AREB-2
23	57	M	AREB-2
24	69	F	AREB-2
25	58	F	CRDM
26	35	M	CRDM
27	63	M	CRDM
28	39	F	CRDM
29	53	F	CRDM
30	3	F	AREB-1
31	62	M	CRDM
32	70	M	AREB-1
33	73	F	CRDM
34	41	M	AREB-1
35	58	F	AREB-1
36	50	M	CRDM
37	56	M	CRDM
38	15	M	AREB-1
39	45	M	AREB-1
40	83	M	CRDM
41	74	F	AREB-2
42	22	M	AREB-2
43	76	F	CRDM

Continuação da Tabela 3.

44	28	F	CRDM
45	69	F	CRDM
46	57	F	CRDM
47	65	F	AREB-1
48	48	F	CRDM
49	44	M	CRDM
50	35	F	CRDM
51	67	F	CRDM
52	42	F	CRDM
53	70	F	AREB-1
54	63	F	AREB-1
55	69	F	CRDM
56	82	F	CRDM
57	12	M	CRDM
58	69	M	CRDM
59	66	F	AREB-1
60	56	M	CRDM
61	29	F	ARSA
62	4	M	CRDM
63	50	M	AREB-1
64	57	F	AREB-1
65	65	M	CRDM
66	55	M	CRDM
67	23	F	CRDU
68	50	M	CRDM
69	46	M	AREB-2
70	4	F	CRDM
71	40	F	CRDM
72	47	M	AREB-1
73	79	F	AREB-1
74	62	F	AREB-2
75	41	F	CRDM
76	73	M	AREB-2
77	51	F	CRDM
78	63	F	CRDM
79	46	F	AREB-1
80	54	F	CRDM
81	51	M	AREB-2
82	61	F	CRDM
83	58	F	AREB-1
84	29	F	ARSA
85	17	M	AREB-2
86	62	F	CRDM
87	58	F	CRDM
88	63	M	CRDM
89	68	M	CRDM
90	82	M	CRDM
91	15	M	AREB-2
92	57	M	CRDM
93	55	M	AREB-1
94	74	F	AREB-2
95	53	F	CRDM
96	60	M	AREB-1
97	60	F	AREB-2
98	68	F	CRDM
99	60	M	AREB-1
100	54	F	AREB-2

F= feminino; M= masculino; CRDM= Citopenia refratária com displasia de multi-linhagem; AREB-1= Anemia refratária com excesso de blastos 1; AREB-2=Anemia refratária com excesso de blastos 2; ARSA= Anemia refratária com sideroblastos em anel; CRDU= Citopenia refratária com displasia em uma linhagem.



**Figura 5 Relação dos diagnósticos e das idades dos pacientes com SMD.**

## 3.2 Métodos

### 3.2.1 Extração de DNA

O DNA genômico dos 100 indivíduos do grupo de estudo foi obtido a partir das células da MO. Tal procedimento foi realizado segundo a técnica descrita por Miller e colaboradores (1998), com modificações.

O volume de 1-3ml de MO foi coletado em tubo *vacutainer* com EDTA. Em um tubo de polipropileno de 15ml foram adicionados 3,5ml de FICOLL PAQUE e 1-3ml do material coletado, este último transferido pela parede do tubo com pipeta Pasteur descartável. O material foi, então, centrifugado por 30 minutos a 3.500 rpm, o sobrenadante retirado e desprezado e o material transferido com pipeta Pasteur descartável para outro tubo. Foi completado o volume para 15ml com PBS 1x e realizada nova centrifugação a 3.500 rpm por 12 minutos. O sobrenadante foi retirado com pipeta Pasteur descartável; o “pellet” foi ressuspenso e novamente completado o volume de 15ml com PBS 1x. O material foi mais uma vez centrifugado a 3.500 rpm por 12 minutos e o sobrenadante recolhido com pipeta descartável. O “pellet” foi ressuspenso e, em seguida, foram adicionados 1ml de PBS 1x, 3ml de *Lysis Buffer*, 0,2ml de SDS a 10%, 50µl de proteinase K (20mg/ml) e 40µl de RNase (20mg/ml). Então, o material foi agitado e incubado à 37°C *overnight*.

Ao “pellet” foi acrescentado 1ml de NaCl 6M saturado. O tubo foi agitado vigorosamente até formar espuma e colocado no gelo por 15 minutos. O material foi novamente agitado e centrifugado a 3.500 rpm 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. O DNA foi, então, “pescado” e colocado em um *ependorf* de 1,5ml com 500µl de etanol a 70% gelado. O material foi centrifugado a 14.000 rpm por três minutos, o etanol 70% descartado e o tubo deixado em repouso por 15 minutos. O DNA foi diluído em água ultrapura e incubado a 37°C por três a quatro dias para diluição. Após este período, o material foi finalmente dividido em alíquotas e estocado a -20°C. A estimativa da concentração foi realizada pela leitura em espectrofotômetro *NanoDrop ND 1000*.

### 3.2.2 Amplificação do éxon 1 do gene *FOXO3* e eletroforese em gel de agarose

A amplificação do éxon 1 do gene *FOXO3* foi realizada pela técnica de Saiki e colaboradores (1998), com algumas modificações. As concentrações dos reagentes e condições de ciclagem da PCR para este gene foram realizadas segundo Gallardo e colaboradores (2008) e estão descritas nas Tabelas 4 e 5. A observação em gel de agarose a 2% foi realizada posteriormente para verificar se houve amplificação e se o tamanho do segmento obtido era coincidente com o esperado.

Utilizou-se um par de *primers* para a amplificação total do éxon 1. As sequências de bases dos *primers* utilizados foram:

*Left*      5' AGAGGAGAGCGCGAGGC 3'  
*Right*     5' ACTCCGACGAATCCGAGAC 3'



**Tabela 4. Condições da reação de PCR utilizada para a amplificação do éxon 1.**

Reagentes	Concentração final
Tampão	1X
MgCl <sub>2</sub>	1,5 Mm
dNTP	0,25 Mm
DMSO	5%
<i>Primer Right</i>	0,5µM
<i>Primer Left</i>	0,5 µM
Taq DNA Polimerase	5 U
Água ultrapura	11 µl
DNA	50ng/ µl

**Tabela 5. Programa de amplificação utilizado para os primers do éxon 1 do gene *FOXO3*.**

Etapa	Temperatura (°C)	Duração
Hot Start	95	10 minutos
Desnaturação*	95	30 segundos
Anelamento*	55,4	30 segundos
Extensão*	72	02 minutos
Extensão final	72	10 minutos

\*O ciclo desnaturação-anelamento-extensão foi repetido 35 vezes

### 3.2.3 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 e Russel (2001).

### 3.2.4 Sequenciamento direto

As amostras amplificadas e purificadas foram submetidas ao sequenciamento automático em sequenciador de capilaridade *3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems)* e as sequências do éxon 1 do gene *FOXO3* foram determinadas utilizando-se o kit *Big Dye Terminator v3.1 (Applied Biosystems, USA)*, segundo recomendações do fabricante.

Para cada amostra foram realizadas seis reações, devido ao tamanho do éxon 1 do gene *FOXO3* (621pb), que impossibilitou que toda sua extensão fosse sequenciada com a

utilização de um único par de *primers*, no equipamento utilizado. Portanto, para o sequenciamento direto, além dos *primers right (reverse)* e *left (forward)* utilizados na amplificação, dois outros novos pares de *primers* também foram necessários:

<i>Forward</i>	5'ACGATGAAGACGACGAGGAC 3'
<i>Reverse</i>	5'TCCTCGTCGTCTTCATCGTC 3'
<i>Forward</i>	5'AGCCGAGGAAATGTTCGTC 3'
<i>Reverse</i>	5'ACGAACATTCCTCGGCTGC 3'

As condições da PCR para o sequenciamento estão descritas na Tabela 6.

As análises das sequências foram realizadas no programa DS Gene 2.0 (*Accelrys, USA*) e feita uma comparação com sequências existentes no GenBank ([www.ncbi.nlm.nih.gov/blast](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast)).

**Tabela 6. Condições para reação de sequenciamento do éxon 1 do gene *FOXO3*.**

<b>Etapa</b>	<b>Temperatura (°C)</b>	<b>Duração</b>
Desnaturação*	96	30 segundos
Anelamento*	50	15 segundos
Extensão*	60	04 minutos
Extensão final	4	∞

\*O ciclo desnaturação-anelamento-extensão foi repetido 25 vezes.

### 3.2.5 Análise do padrão de metilação

Após a extração de DNA da MO dos indivíduos com SMD, como descrito anteriormente, foi realizada a análise do padrão de metilação pela técnica de *Methylation-specific PCR* (MSP-PCR). O DNA da MO de um indivíduo saudável foi modificado e utilizado como controle positivo de metilação.

### 3.2.5.1 Metilação *in vitro* da amostra controle

Após a quantificação do DNA extraído, foi realizada a metilação *in vitro*, utilizando-se 20µg de DNA. A amostra foi incubada a 37°C durante 04 horas, e em seguida foram adicionados 5µl de SAM (S-adenosilmetionato) e 0,625µl de SS1 Methylase (MSssl CpG Methylase-BioLabs), e novamente incubado por 04 horas a 37°C. O material foi submetido a extração com 250µl de fenol:clorofórmio (1:1) e centrifugado por 15 minutos a 13.000 rpm. Para a precipitação, foram adicionados à amostra 625µl de etanol absoluto e 85µl de acetato de amônio a 7,5M, que foi incubada durante 16 horas a -20°C. Após a precipitação, O DNA foi centrifugado por 15 minutos a 13.000 rpm, seguido da adição de 700µl de etanol 70%. O material foi novamente centrifugado, o sobrenadante, descartado e o tubo foi invertido na bancada, para secar o “pellet” de DNA. O DNA foi dissolvido em 10µl de água ultrapura e novamente foi medida a concentração do DNA.

### 3.2.5.2 Conversão do DNA por bissulfito de sódio

Após a determinação da concentração, o DNA das amostras e do controle positivo foi submetido ao tratamento com bissulfito de sódio para a conversão de citosina não metiladas em uracila por desaminação, ocorrendo conservação das citosinas metiladas. Para este procedimento foi utilizando o Kit *EpiTec Bisulfite (QIAGEN)*, segundo recomendações do fabricante.

### 3.2.5.3 MSP-PCR

Após a conversão do DNA por bissulfito de sódio, foi realizada uma PCR em duas reações separadas, com dois pares de oligonucleotídeos diferentes, um par para sequência metilada e um par para sequência não metilada, de acordo com Herman e colaboradores (1996). As sequências de bases dos *primers* utilizados foram:

Sequência Metilada:

**Foward: 5' TTTGGGCGGGGATTCGTTT 3'**

**Reverse: 5' GCGACAACAACACAAAATTATAAACACACG 3'**

Sequência Não-Metilada:

**Foward: 5' TGTTTAGTTTTTTTTTTGGGTGGGGATTTGTTTG 3'**

**Reverse: 5' ACCACAACAACAACACAAAATTATAAACACACA 3'**

A reação de amplificação para o gene *FOXO3* está descrita na Tabela 7. Os parâmetros para a ciclagem estão descritos na Tabela 8.

Os produtos de amplificação foram submetidos à eletroforese em gel de poliácridamida 8%, para verificar o tamanho do produto amplificado (75pb) e avaliar o padrão de metilação do gene *FOXO3*; como controle positivo foi utilizado o DNA de MO metilado, para controle do gene não metilado, foi utilizada a mesma amostra de medula óssea normal, porém, sem o tratamento de conversão.

**Tabela 7. Condições de reação utilizadas para a amplificação do gene *FOXO3* para o estudo da metilação.**

Reagentes	Concentração final
Tampão	1X
MgCl <sub>2</sub>	1,5 Mm
Dntp	0,25 Mm
Primer Left	1µM
Primer Right	1µM
AmpliTaq DNA Polimerase	5 U
Água ultrapura	14,3µl
DNA	50ng/ µl

**Tabela 8. Parâmetros para amplificação da reação de metilação do gene *FOXO3*.**

Etapa	Temperatura (°C)	Duração
Desnaturação	95	10 minutos
Desnaturação*	95	45 segundos
Anelamento*	69	45 segundos
Extensão*	72	1 minutos
Extensão final	72	10 minutos

\*O ciclo desnaturação-anelamento-extensão foi repetido 40 vezes.

O estado de metilação foi inferido pela presença e/ou ausência de produtos de amplificação com os *primers* específicos para a condição metilado (M) e não metilado (U). A presença de banda na reação metilada é adotada como critério para os casos de hipermetilação. Assim, os casos U+M+ e U-M+ são considerados hipermetilados e os casos U+M- como não-metilados.

### **3.2.6 Cultivo celular e análise citogenética**

Para cada indivíduo foram realizadas culturas de curta duração (24 horas) de células da MO. Foram montados pelo menos dois frascos de cultura, cada um contendo 5,0ml de meio RPMI 1640, 2,0 ml de soro fetal bovino, 02 gotas de estreptomicina (100U/ml), 04 gotas de penicilina (100U/ml) e 03 a 10 gotas do material biológico.

Os frascos foram mantidos em estufa a 37°C por cerca de 24 horas e aproximadamente 20 minutos antes do término deste tempo, foram adicionados 100µl de Colchicina (5µl/ml).

Após o cultivo celular, o material foi centrifugado por 08 minutos a 1.000 rpm e o sobrenadante foi retirado. Em seguida, foi realizada a hipotonização com a adição lenta, pela parede do tubo, de 10 ml de solução hipotônica de KCl (0,075M) a 37°C. Após 20 minutos, o material foi novamente centrifugado, o sobrenadante removido e, então, foi realizada a fixação com metanol:ácido acético, na proporção de 3:1, em três etapas de 20, 10 e de 05 minutos, respectivamente. 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, parte do material obtido foi gotejado em lâminas úmidas e geladas, que foram envelhecidas por 20 minutos em estufa a 90°C e, posteriormente, submetidas à técnica de bandamento GTG.

#### **3.2.6.1 Bandamento GTG**

A análise citogenética convencional foi realizada em metáfases submetidas à técnica de bandamento GTG segundo Grouchy e Turleau (1984), com modificações.

O material fixado nas lâminas foi tratado em solução de tripsina (60 mL de PBS e aproximadamente 0,12g de tripsina) a 27°C, por um tempo variável de 02 a 10 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 15 metáfases foram analisadas, sempre por dois pesquisadores, com a utilização de microscópio óptico, com aumento mínimo de 1.000 vezes e todos os achados foram conferidos pela orientadora do projeto e discutidos em equipe.

As alterações cariotípicas foram descritas conforme a nomenclatura padrão contida em *International System for Human Cytogenetic Nomenclature* (ISCN, 2013) e documentadas em fotografias.



## 4. RESULTADOS

Os estudos moleculares e a análise citogenética convencional foram realizados em células da MO de 100 indivíduos com SMD primária (*de novo*) ao diagnóstico.

A maioria (54%) dos indivíduos estudados era do sexo feminino e a maior parte dos casos (46%) apresentou diagnóstico de SMD tipo Citopenia refratária com displasia multilinhagem (CRDM).

### 4.1 Resultados moleculares

#### 4.1.1 Sequenciamento do éxon 1 do gene *FOXO3*

A análise molecular por sequenciamento direto do éxon 1 do gene *FOXO3* de 74 indivíduos mostrou sequências consideradas normais (selvagens). Entretanto, em 26 (26%) casos, na posição 159, foi observada a presença de uma **timina** na posição que corresponde a de uma **citossina** na sequência selvagem (C>T), que altera o códon GCC para GCT, que é definida como um polimorfismo (NCBI 11757217). Trata-se de uma alteração silenciosa envolvendo o aminoácido alanina (p.Ala53Ala) (Tabela 9).

O achado molecular foi investigado em 100 indivíduos saudáveis do grupo controle. Entre eles, 84 (84%) apresentaram sequências selvagens e 16 (16%) apresentaram o polimorfismo.

Os resultados dos dois grupos foram comparados por meio do teste exato de Fisher e não mostraram diferença estatisticamente significativa ( $p = 0,1175$ ) (Tabela 10).

A Figura 6 apresenta o gel de agarose para os *amplicons* e as Figuras 7 e 8 apresentam os eletroferogramas correspondentes à sequência do éxon 1 do gene *FOXO3*.

Dois (7,69%) dos pacientes eram homozigotos para este SNP e 24 (92,31%) eram heterozigotos. No grupo controle os 16 (100%) eram heterozigotos. Estas frequências não diferiram estatisticamente ( $p=0,5168$ ). A Figura 9 apresenta a identificação dos polimorfismos em heterozigose e em homozigose.

Também, não houve diferença estatística entre as frequências do polimorfismo encontrado nos diferentes tipos de SMD (Tabela 11).



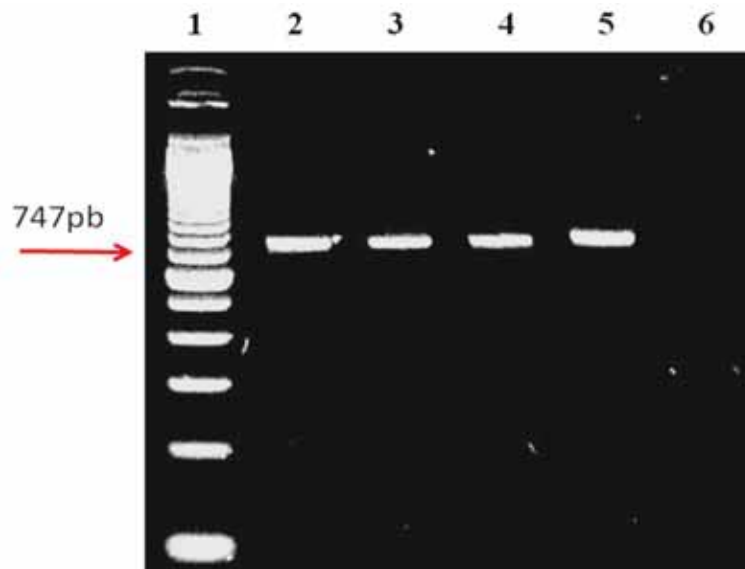
**Tabela 9. Caracterização da sequência polimórfica do éxon 1 do gene *FOXO3*.**

<b>Característica</b>	<b>Dados</b>
Posição do nucleotídeo	<b>159C&gt;T</b>
Sequência de referência	GCC.GCC.GAC
Varição encontrada	GCC.GCT.GAC
Tipo de alteração	Silenciosa
Aminoácido	A[Ala]→ A[Ala]
Banco de dados SNP	Referência: 11757217

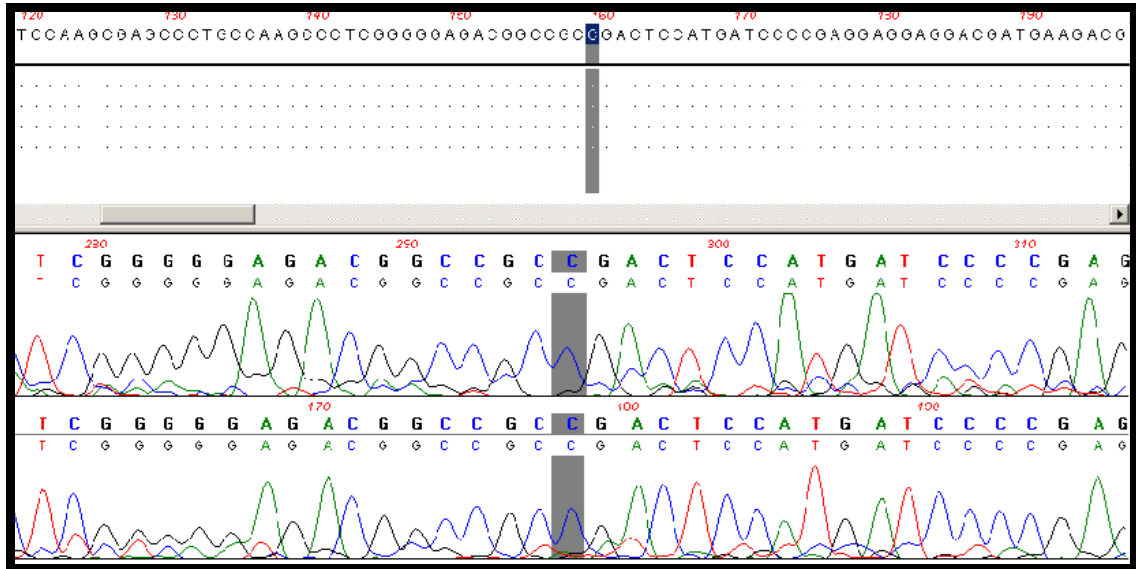
**Tabela 10. Frequência do polimorfismo nos indivíduos com SMD e em indivíduos controles.**

	<b>SMD</b>	<b>Controle</b>	
	<b>N (%)</b>	<b>N (%)</b>	<b>p</b>
<b>Presença do polimorfismo</b>	26 (26)	16 (16)	0,1175
<b>Ausência do polimorfismo</b>	74 (74)	84 (84)	
<b>TOTAL</b>	100	100	

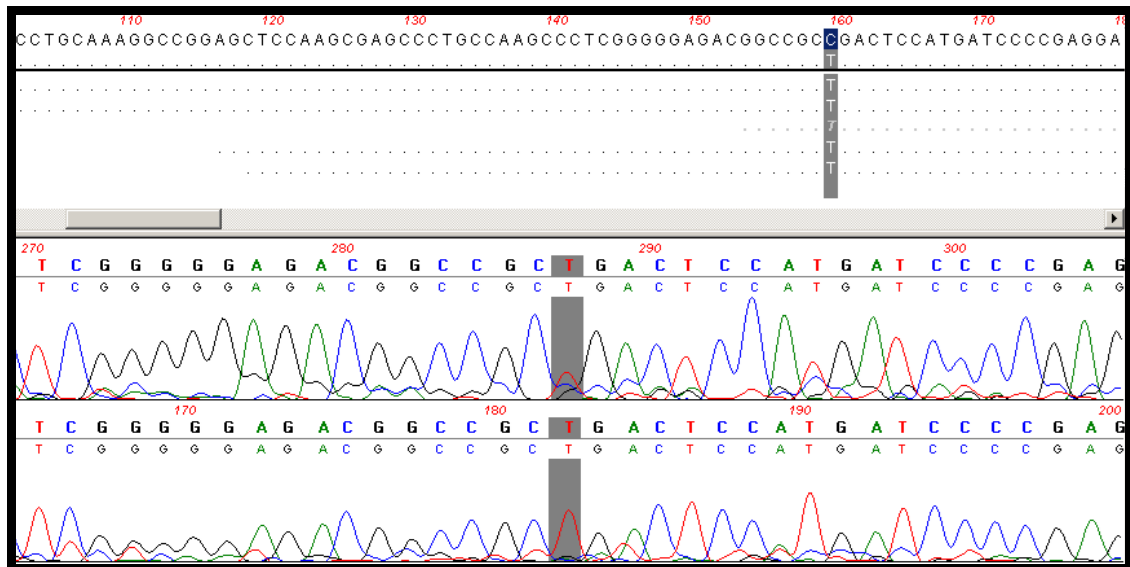
p\*= Calculado pelo Teste Exato de Fisher



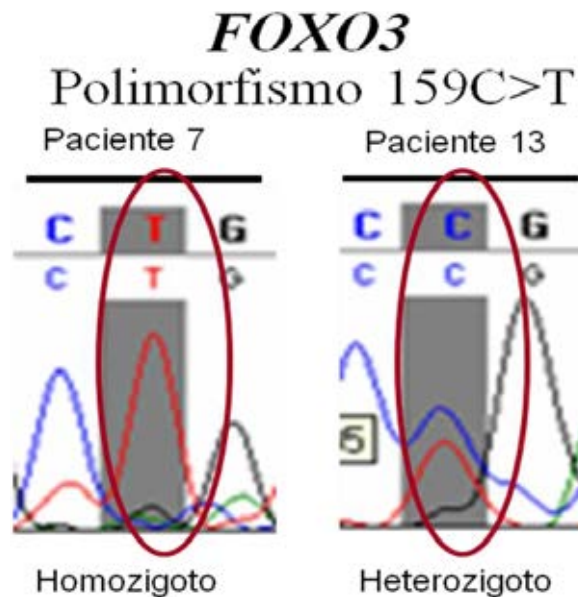
**Figura 6.** Perfil eletroforético em gel de agarose a 2%. Colunas 2-5 correspondem à amplificação do éxon 1 do gene *FOXO3*. A coluna 1 representa a marcação com Ladder de 100pb e a 6, o controle negativo.



**Figura 7.** Eletroferograma parcial das sequências do éxon 1, destacada a posição 159 com a sequência normal.



**Figura 8.** Eletroferograma parcial das sequências do éxon 1, destacada a posição 159 com a presença da timina, evidenciando a substituição C>T.



**Figura 9.** Identificação no eletroferograma das formas em homozigose e heterozigose do polimorfismo.

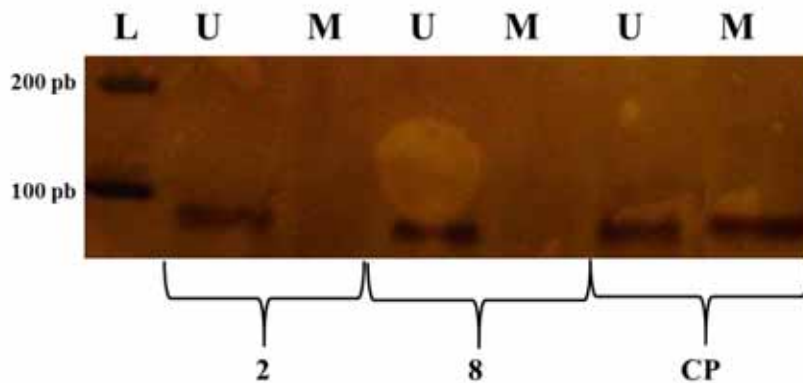
**Tabela 11.** Frequência do polimorfismo encontrado nos diferentes tipos de SMD.

<b>Tipos de SMD</b>	<b>Valor de p</b>
CRDM	0.6619
AREB-2	0.3030
AREB-1	0.4231
ARSA	1
SMD com 5q- isolada	1
CRDU	1

p\* = Calculado pelo Teste Exato de Fisher

#### 4.1.2 Padrão de metilação

Em nenhum dos 100 casos estudados a reação de MSP-PCR com os *primers* específicos foi sugestiva de alteração no padrão de metilação do gene *FOXO3*. Todas as amostras apresentaram apenas bandas para a condição não-metilada (U+M-) (Figura 10).



**Figura 10.** Gel de poliacrilamida a 8% evidenciando o padrão de bandas do gene *FOXO3* após a técnica de MSP-PCR. L= marcador molecular de 100pb; U= reação para sequência não metilada; M= reação para sequência metilada, CP= controle positivo, 2 e 8 pacientes com SMD, com amplificado de 75pb em U e não em M, correspondente a não-metilação.

#### 4.2 Resultados citogenéticos

A análise citogenética por bandamento GTG revelou 93 casos (93%) com resultados compatíveis com cariótipo feminino ou masculino normal (46,XX ou 46,XY), o que significa ausência de alterações cromossômicas numéricas ou estruturais clonais no nível de resolução da técnica utilizada. Sete casos (7%) apresentaram alterações cromossômicas, conforme apresentado na Tabela 12.

**Tabela 12.** Alteração cromossômica clonal observada em cada caso.

Caso	Cariótipo
7	46,XX,del(5)(pter→q31:)[9]/46,XX
9	[8] 45,XY,-22[3]/46,XY[13]
26	41~45,XY[8]/46,XY[12]
30	45,XX,-7[20]
55	41~46,XX,inv(3)(q21q27),del(5)(q13),
56	del(11)(q14)[6]/46,XX[15]
88	43~45,XX[6]/46,XX[14] 46,XY,del(20)(pter→q11:)[12]/46,XY[8]

No caso 7, com diagnóstico inicial de SMD sem a designação de subtipo, foi encontrada uma alteração cromossômica estrutural caracterizada como deleção de parte do

braço longo do cromossomo 5 [46,XX,del(5)(pter→q31:)], a única alteração clonal observada em 09 (52,9%) das 17 células analisadas (Figura 11). Este achado permitiu o diagnóstico do subtipo da doença, ou seja, de SMD associada com del(5q) e, conseqüentemente, a aplicação na predição do prognóstico da doente.

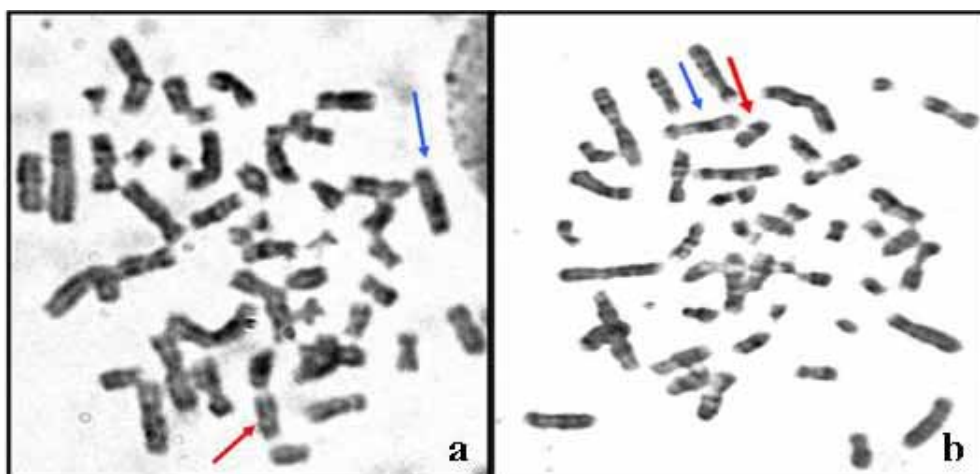
No indivíduo 9, com AREB-2, foi observada monossomia do cromossomo 22 clonal. Tal alteração foi observada em 03 (18,75%) das 16 células analisadas (Figura 12).

Em dois casos, 26 e 56, os pacientes apresentaram hipodiploidia, com número de cromossomos variando entre 41 a 45. No indivíduo 26, com CRDM, 8 (40%) células eram hipodiplóides, enquanto no indivíduo 56, também com CRDM, a hipodiploidia foi detectada em 06 (30%) células (Figura 13).

No caso 30, uma criança de três anos com AREB-1, foi observada uma alteração cromossômica numérica clonal única em 100% das células analisadas, que foi caracterizada como monossomia do cromossomo 7 (Figura 14).

No caso 55, com CRDM, foi observado cariótipo complexo em 06 (30%) das 21 células analisadas: número cromossômico de 41 a 46, inversão paracêntrica no braço longo do cromossomo 3, deleção do braço longo do cromossomo 5 del(5q) e deleção do braço longo do cromossomo 11 (Figura 15). O cariógrama de uma metáfase desse caso está representado na figura 16.

O caso 88, com CRDM apresentou uma alteração clonal caracterizada como deleção do braço longo do cromossomo 20 em 12 metáfases (60%) (Figura 17).



**Figura 11(a-b).**Metáfases do caso 7 submetidas a técnica de bandamento GTG. A seta vermelha indica o cromossomo 5 deletado e a seta azul o cromossomo 5 normal.

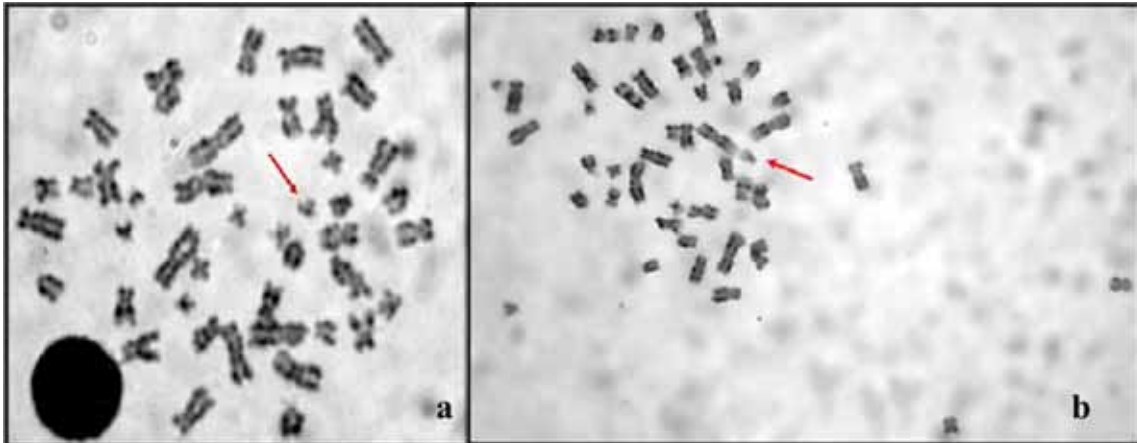


Figura 12(a-b). Metáfases do caso 9 submetidas à técnica de bandamento GTG. A seta mostra o único cromossomo 22 presente, caracterizando a monossomia do cromossomo 22.

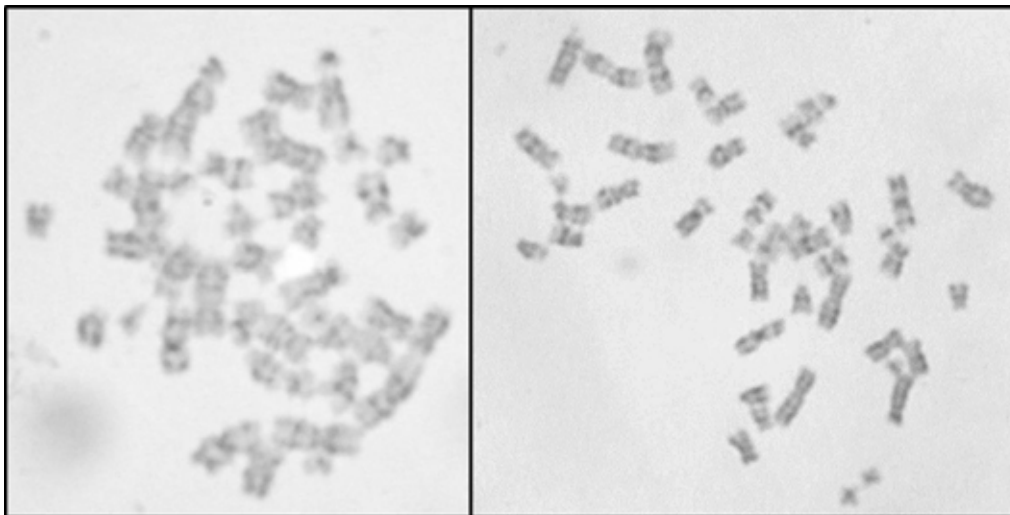


Figura 13. Metáfases submetidas a técnica de bandamento GTG: a) Metáfase hipodiplóide do caso 26, com 44 cromossomos, e b) Metáfase hipodiplóide do caso 56, com 43 cromossomos.

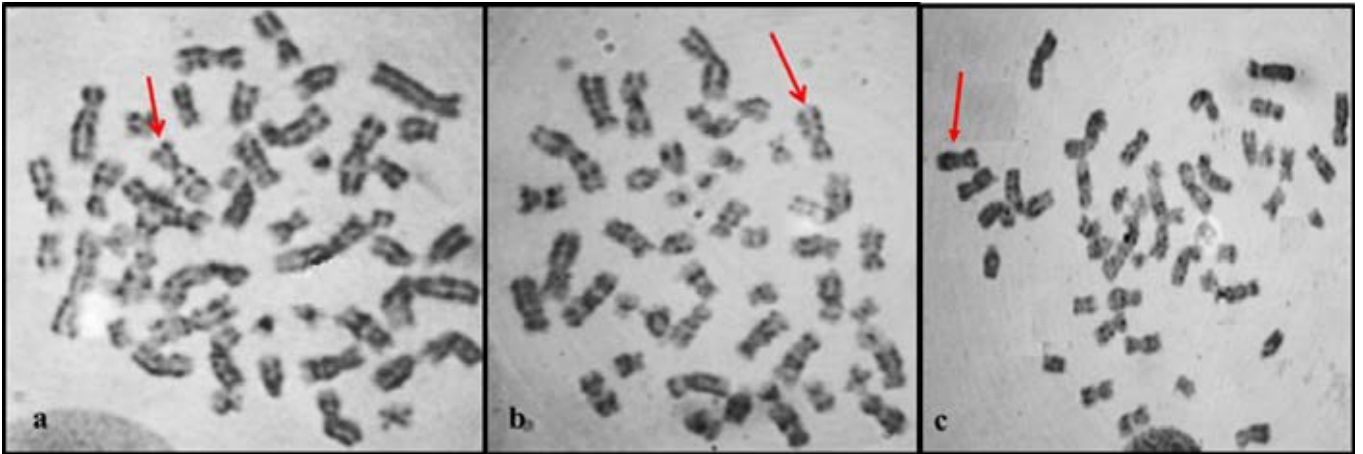


Figura 14(a-c). Metáfases do indivíduo 30 submetidas à técnica de bandamento GTG. A seta indica o único cromossomo 7 presente.

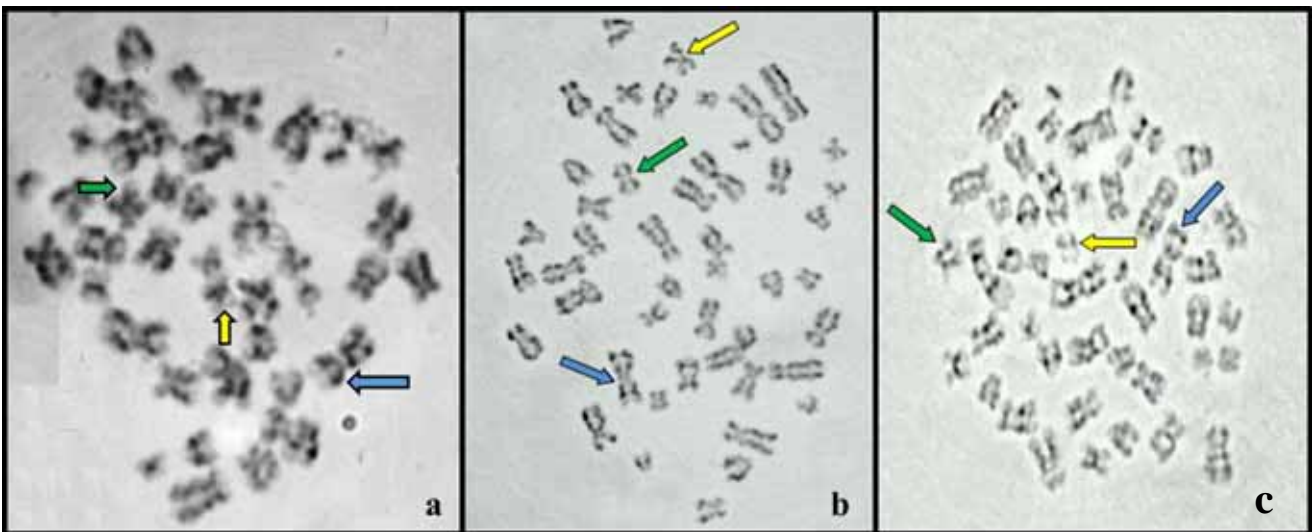


Figura 15. Metáfases em bandamento GTG do caso 55 (A e B); a seta azul indica cromossomo 3 invertido, a seta verde aponta o cromossomo 5 com deleção do braço longo e a amarela indica o cromossomo 11 com deleção do braço longo.

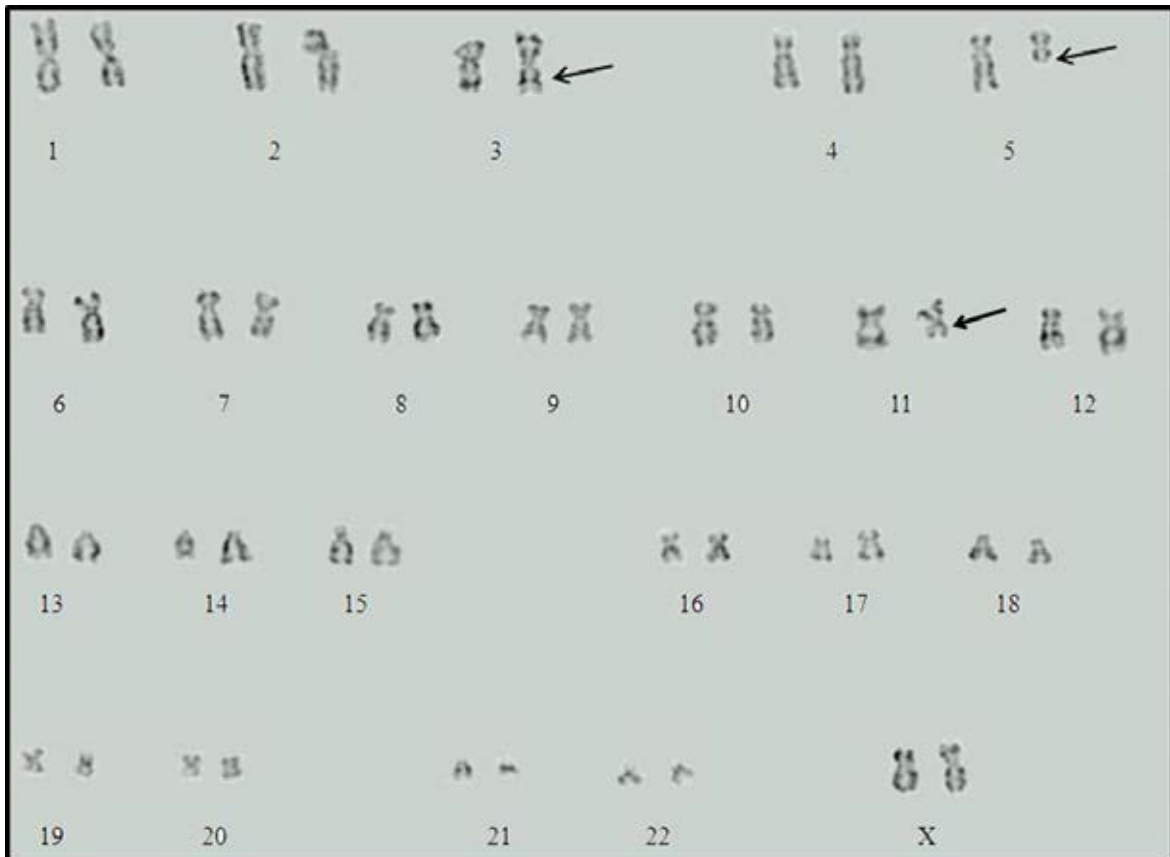


Figura 16. Cariograma da metáfase b do caso 55. As setas indicam as alterações observadas o cromossomos 3, 5 e 11 [46XX,inv(3)(q21q27),del(5)(q13),del(11)(q14)].

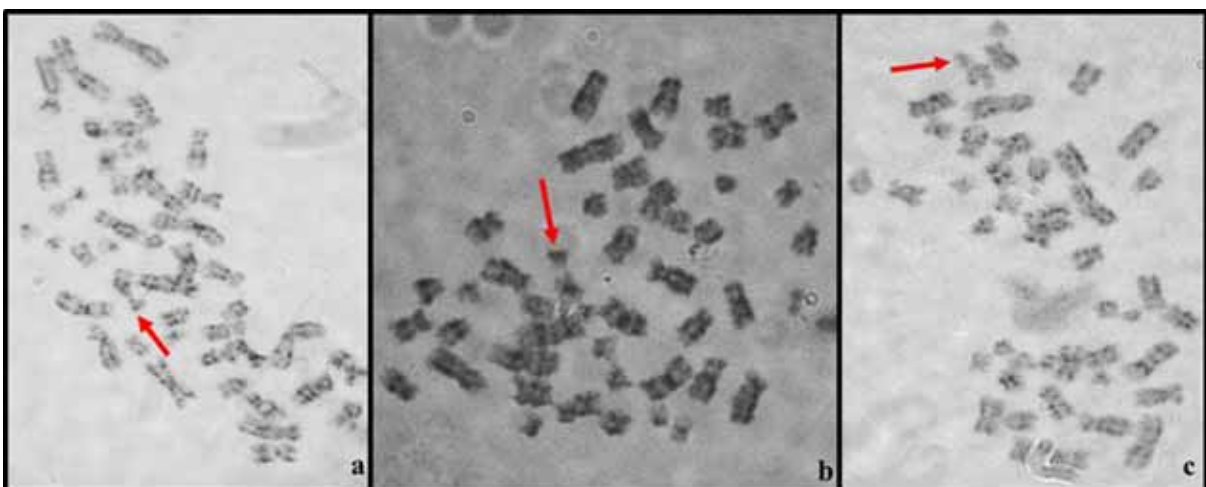


Figura 17. Metáfases em bandamento GTG do caso 88 (a-c); a seta indica o cromossomo 20 com deleção do braço longo.





## 5. DISCUSSÃO

Os estudos em SMD descritos na literatura mostram um número muito variável de indivíduos estudados. Estudos genéticos realizados entre 2012 e 2014 apresentam casuísticas compostas por 16, 48, 53, 122, 944, até 1.500 pacientes (SONG et al., 2012; FU et al., 2013; HUANLING et al., 2013; HAFERLACH et al., 2014; LARANJEIRA et al., 2014, RASHID et al., 2014). Casuísticas maiores são descritas em estudos colaborativos e de consórcios, com pacientes avaliados ao longo de vários anos. Assim, pela raridade da doença, tipo de estudo realizado, comparação com descrições da literatura e acesso possível aos doentes, 100 foi considerado um número adequado para atingir os objetivos propostos.

As Síndromes Mielodisplásicas são neoplasias de células-tronco hematopoéticas normalmente associadas a uma série de complicações clínicas. Estão entre as doenças hematológicas frequentes na população em idade mais avançada e apresentam um alto risco de insuficiência medular e/ou evolução para um tipo específico de leucemia, a LMA. (KERN et al., 2012; GARCIA-MANERO, 2014; NYBAKKEN, BAGG, 2014). Neste estudo pode ser observado que a doença acomete indivíduos em idades muito variáveis, mas com predomínio em idades iguais ou superiores a 50 anos.

Embora raras entre as malignidades hematológicas pediátricas, SMD primária e secundária ocorrem em crianças e podem ser a primeira manifestação das síndromes hereditárias de falência da MO. Ao contrário do que ocorre no adulto, SMD pediátrica está mais frequentemente associada com MO hipocelular e monossomia do cromossomo 7 (GLAUBACH et al., 2014; MORIWAKI et al., 2014), exatamente o que foi observado no caso 30, uma menina de três anos de idade, com AREB-1. Mas, neste estudo quatro pacientes (4%) tinham idades iguais ou inferiores a 14 anos, caracterizando a SMD na infância numa frequência muito alta comparada com a incidência de 1,8-4 casos por milhão descrita na literatura (CHATTERJEE, CHOUDHRY, 2013). Provavelmente este dado se deveu ao fato de terem sido estudados pacientes de um Serviço que também é referência em neoplasias hematológicas pediátricas.

SMD são doenças complexas. A heterogeneidade clínica tem sido relacionada à variabilidade de alterações genéticas que culminam na apresentação final da doença. Estas alterações mudam a estrutura ou a expressão gênica (RAZA, GALILI, 2012; RIBEIRO JR et al., 2014). Modelos atuais de estudos patogênicos consideram a iniciação e a progressão das SMD como um processo de várias etapas associadas ao acúmulo de alterações no genoma. Os

mecanismos moleculares envolvidos nestes processos, entretanto, são pouco conhecidos (GARCIA-MANERO, 2014).

O gene *FOXO3* é um supressor de tumor responsável por diversos processos biológicos. Participa direta ou indiretamente de processos de diferenciação celular, parada do ciclo celular, resistência a drogas, apoptose, reparo de DNA, desintoxicação de espécies reativas de oxigênio, resposta inflamatória, apoptose e longevidade (CAMPA et al., 2011; CALNAN et al., 2012; NGUETSE et al., 2015; BROER et al., 2015). Estudos recentes revelaram que a inibição de *FOXO3* é um evento importante nas doenças hematológicas e também em diversos tipos de câncer. Consistente com a ativação constitutiva de AKT, a fosforilação de *FOXO3* já foi observada na leucemia mielóide crônica, leucemia mielóide aguda e mieloma múltiplo. Os dados indicam que perda da função transcricional de *FOXO3* por fosforilação está envolvida na fisiopatologia da tumorigênese (SAKOE et al., 2010; IKEDA et al., 2013; GENIN et al., 2014; SALAZAR et al., 2015).

Mutações e polimorfismos no gene *FOXO3* estão descritos em algumas neoplasias, incluindo as hematológicas (CAMPA et al., 2011; WONG et al., 2014). Recentemente, o polimorfismo 3'UTR FOXO3a 4946936 foi associado com um risco aumentado de leucemia linfoblástica aguda na população chinesa (WONG et al., 2014). Também, a via de sinalização fosfatidilinositol 3-quinase (PI3K)/AKT é frequentemente ativada em LMA e a sua ativação medeia a sobrevivência, proliferação e a transformação leucêmica das células mielóides (SANTAMARÍA et al., 2009; BUTT et al., 2012).

O éxon 3 do *FOXO3* não é transcrito. Mutações no éxon 1 e éxon 2 foram observadas no câncer do ovário e falência ovariana (WATKINS et al., 2006). No presente estudo foi estudado o éxon 1 e o sequenciamento das células da MO dos doentes revelou apenas um SNP caracterizado como um polimorfismo 11757217 159C>T (p.Ala53Ala), cuja frequência não diferiu estatisticamente da obtida no grupo controle.

Deve ser considerado que a maioria das mutações descritas em SMD tem incidência baixa. Além disso, os casos de SMD secundária são mais propensos a apresentar mutações do que casos *de novo*, como os aqui avaliados, e eles podem mostrar diferentes frequências de mutações individuais (NYBAKKEN, BAGG, 2014).

A variante encontrada já foi relatada em falência ovariana prematura em mulheres da China, Nova Zelândia, Eslovênia, Itália, América do Norte, França, Alemanha e Coreia do Sul. Entretanto, este SNP não parece ter impacto sobre o fenótipo, uma vez que também é observado em controles (GALLARDO et al., 2008; WANG et al., 2010).

Não há dados disponíveis sobre a relação entre mutação e polimorfismos no gene *FOXO3* e SMD. O polimorfismo detectado não está relacionado a neoplasias e, pelas frequências similares entre casos e controles obtidas no presente estudo, não há elementos sugestivos de que possa estar relacionado às SMD.

Assim, por se tratar de uma mutação silenciosa pode ter valor limitado no efeito clínico, a menos que altere o sítio de *splicing*, como sugerido pela literatura (WATKINS et al., 2006), mas isso não foi avaliado. Alterações sinônimas de códons nem sempre são neutras. Por poderem afetar a conformação de proteínas são importantes em estudos de associação. Os dados de variação em estudos de associação devem ser analisados utilizando-se valores de sítio específico de códons para inferir o potencial impacto fenotípico destas alterações (BHARDWAJ, 2014; CHU et al., 2014).

Deve ser considerado que mutações no éxon 2 do gene *FOXO3* não foram avaliadas e não pode ser excluído um papel no aparecimento ou progressão das SMD. Outras investigações envolvendo o éxon 1 em outras casuísticas e no éxon 2 devem ser realizadas antes de se excluir uma associação entre mutações/polimorfismos no gene *FOXO3* e SMD.

Mas, se tantos estudos sugerem que a regulação do *FOXO3* é essencial para a homeostase celular, conhecendo-se as funções deste gene no câncer e sua expressão elevada em células da MO normais, uma melhor compreensão dos mecanismos pelos quais ele é regulado pode ajudar na descoberta de marcadores de diagnóstico e prognóstico e, eventualmente, ajudar a desenvolver novas abordagens de manejo terapêutico. Este contexto motivou investigar o padrão de metilação deste supressor de tumor.

Processos epigenéticos como a metilação de regiões promotoras podem resultar em diversidade biológica e variação fenotípica, inclusive câncer (YAMAZAKI, ISSA, 2013). Anomalias epigenéticas em SMD coexistem com alterações citogenéticas em mais da metade dos pacientes e com mutações somáticas em praticamente todos os casos. O fato da diversidade fenotípica de SMD não poder ser totalmente explicado pelos cariótipos anormais recorrentes, tem revelado a importância da investigação de outros mecanismos responsáveis por essa doença. Assim, a manifestação completa da doença parecem exigir danos genéticos e epigenéticos concorrentes, mas não diretamente relacionados (ISSA, 2013; YAMAZAKI, ISSA, 2013).

A metilação do DNA nas ilhas CpG da região promotora dos genes ou em regiões reguladoras pode contribuir para a expressão gênica alterada em câncer, inclusive em leucemias (MELDI, FIGUEROA, 2014). As análises do padrão de metilação estão fornecendo descobertas sobre a relevância da hipermetilação também na patogênese das SMD. No

entanto, até o presente, poucos genes foram demonstrados experimentalmente para ter este papel etiológico nas SMD.

Neste estudo não houve associação entre o estado de hipermetilação da ilha CpG estudada da região promotora do gene *FOXO3* e SMD, porque em nenhuma amostra foi observado resultado sugestivo de alteração no padrão de metilação. No entanto, existe um problema ao associar uma região de modificações epigenéticas diferenciais para um gene alvo, pois, não é suficiente atribuir a região inicial da região de transcrição mais próxima como sendo a alterada. Regiões reguladoras podem regular genes distantes no cromossomo, múltiplos genes, e até mesmo genes em outros cromossomos. Esta complexidade tridimensional da arquitetura da cromatina e regulação do gene pode explicar a escassez de dados que ligam as mudanças epigenéticas na leucemia a correspondentes alterações na expressão gênica (MELDI, FIGUEROA, 2014). Neste caso, mesmo o gene *FOXO3* sendo um dos que mais se expressa na MO normal, a complexidade da arquitetura da cromatina e da regulação do gene poderiam explicar o resultado normal nos casos aqui estudados.

A análise citogenética com a utilização de diferentes técnicas é sempre fundamental em SMD, uma vez que além de determinadas alterações poderem levar ao conhecimento de genes envolvidos no desenvolvimento da doença, são os únicos marcadores genéticos comprovados e rotineiramente utilizados de diagnóstico e prognóstico (GIAGOUNIDIS, HAASE, 2013). No contexto deste trabalho foi realizada porque fornece dados importantes que podem ser utilizados na associação com resultados moleculares.

O cariótipo está indicado em todos os casos. A técnica de bandamento GTG é a mais utilizada, como foi a escolha no presente estudo, pois permite avaliar alterações cromossômicas numéricas e estruturais em geral, além das mais comumente relatadas. O cariótipo também é útil para estabelecer a evolução da doença e transformação para LMA (SCHANZ, HAASE, 2014).

Nesse estudo, alterações cromossômicas foram observadas em 7% dos casos avaliados e o cariótipo pode ser relacionado com o diagnóstico e com o prognóstico dos doentes. De acordo com os dados da literatura, era esperada uma frequência maior, de até 80%. Entretanto, frequências de 80% até 89% de casos sem alterações também estão descritas (BELLI et al., 2011; BACHERA et al., 2012; GIAGOUNIDIS, HAASE, 2013; CAO et al., 2014).

A frequência menor obtida pode ter ocorrido “casualmente” com esta casuística ou pode ter resultado de limitações técnicas, pelo fato da percentagem de células anormais obtidas das culturas de MO ser frequentemente menor comparada à de células normais e das

preparações nem sempre estarem em resolução suficiente para detecção de alterações menores. Por exemplo, Hemmat et al (2014) descreveu uma deleção em 5q- submicroscópica envolvendo genes supressores de tumor (*CTNNA1, HSPA9*) e a perda da hetererozigidade associada com mutações em *TET2 e EZH2* em casos de SMD com resultados normais para citogenética convencional e FISH.

Também, todos os casos foram investigados ao diagnóstico, ou seja, no início da doença, e algumas aberrações cromossômicas podem aparecer durante o curso da mesma ou um clone anormal pode desenvolver-se no paciente com cariótipo de MO anteriormente normal (ARENILLAS et al., 2013).

Um outro aspecto refere-se ao fato da frequência de cariótipo alterado ser menor em pacientes de baixo risco de evolução para LMA (PATNAIK et al., 2012; BURBURY, WESTERMAN, 2013), que foi o diagnóstico da maioria dos nossos casos.

Também, citopenias periféricas associadas com alterações morfológicas, não são isoladamente evidências de doença clonal e a falta de um marcador confiável pode comprometer o diagnóstico de SMD, considerado difícil. Por isso é recomendado um período de observação do doente e a realização de exames para exclusão de diagnósticos diferenciais (MAGALHÃES, LORAND-METZE, 2004), o que foi realizado pela equipe de hematologistas. Certamente que a dificuldade de diagnóstico conclusivo de SMD e consequente diagnóstico equivocado foi considerada, entretanto, foi refutada pelo fato de todos os critérios da OMS terem sido checados de forma independente por dois hematologistas que corroboraram o diagnóstico conclusivo.

Em SMD, o resultado normal do cariótipo, como observado em 93% dos casos aqui estudados, é um fator de bom prognóstico. A ausência de alterações no exame citogenético pode resultar em uma terapia menos agressiva. Entretanto, está indicada a avaliação citogenética periódica dos pacientes, particularmente quando há mudanças no quadro clínico e/ou laboratorial dos mesmos (NYBAKKEN, BAGG, 2014).

Entre os achados anormais, 5q- é detectada em aproximadamente 30% dos casos de SMD com alteração cariotípica, sendo a anormalidade citogenética mais frequentes nestas doenças. Se for observada como evento único, como no caso 7, o prognóstico geralmente é bom, entretanto, se fizer parte de um cariótipo complexo, como no caso 55, o prognóstico é significativamente modificado pelas alterações adicionais (KOMROKJI et al., 2013).

Dos tipos de SMD, a associada com 5q- tem a patogênese melhor compreendida. A deleção intersticial originária de células-tronco hematopoéticas promove a haploinsuficiência de um número variável de genes, de acordo com a extensão da região deletada. O segmento

mais curto deletado engloba cerca de 40 genes. Por exemplo, a haploinsuficiência para a subunidade ribossomal *RPS14* induz a p53 na proliferação e diferenciação eritróide, enquanto a haploinsuficiência de dois micro-RNAs, mir-145 e miR-146a, leva a dismegacariopoese e trombocitose (ADÈS et al., 2014; NYBAKKEN, BAGG, 2014). O prognóstico para a del(5q) isolado é considerado bom, ao contrário do associado. Após quatro anos do diagnóstico, a paciente 7 permanece em tratamento/acompanhamento para SMD e a 55, após dois anos do diagnóstico, está em tratamento para LMA há um ano.

A monossomia do 22 é considerada um achado raro em SMD. Musilova e Michalova (1988) observaram esta alteração em sete entre 57 casos com alterações cromossômicas e em todos estava associada com outras alterações. Berger e colaboradores (1992) observaram a perda do cromossomo 22 em três pacientes de 12 estudados, mas também como parte de cariótipos complexos, assim como observado por Li e colaboradores (2009), em seis de 351 pacientes chineses com SMD primária. O paciente 9, até a redação deste trabalho, após quatro anos do diagnóstico, permanece estável, em tratamento/acompanhamento para SMD.

A hipodiploidia que os casos 26 e 56 apresentaram é comum em SMD. As perdas aleatórias de material cromossômico apresentam-se em proporções significativas nesta doença e provavelmente estão relacionadas com instabilidade cromossômica. O prognóstico é bom, devido ao caráter randômico (SONG et al., 2012). Os dois casos não apresentaram evolução da doença no período deste estudo e também permanecem em tratamento/acompanhamento para SMD.

Geralmente as SMD estão associadas com anomalias cromossômicas não-balanceadas, como perdas específicas de cromossomos (GARCIA-MANERO, 2014), e isso foi observado no caso 30, uma criança de três anos. Até recentemente, devido à falta de consenso sobre os critérios para o diagnóstico da doença em crianças, muitos pacientes com anemia refratária não foram diagnosticados no início, como resultado, alguns pacientes foram a óbito devido a complicações, sem diagnóstico (CHOWDHRY et al., 2012; RAU et al., 2012). Vários estudos demonstram que 30% a 50% das crianças com SMD apresentam cariótipo alterado e a maioria é de alterações numéricas, sendo a monossomia do cromossomo 7 a alteração mais observada, ocorrendo em um terço dos pacientes (CHOWDHRY et al., 2012; RAU et al., 2012; VELLOSO et al., 2013). Embora esta alteração não seja formalmente associada com mal prognóstico em crianças, ao contrário dos adultos, alguns estudos têm sugerido evolução mais precoce para LMA (RAU et al., 2012). A paciente não apresentou evolução do quadro clínico e estava em tratamento/acompanhamento para SMD.

Cariótipos complexos são definidos pela ocorrência simultânea de pelo menos três ou mais alterações independentes na mesma célula e ocorrem em aproximadamente 30% dos casos de SMD com alterações cariotípicas (MORIWAKI et al., 2014). Estes cariótipos podem ser o resultado de um processo de múltiplos passos que promove o acúmulo de alterações e piora do doente (SCHANZ et al., 2012). Estão relacionados com prognóstico desfavorável nas neoplasias mielóides (GERMING et al., 2013). A paciente 55 apresentou cariótipo complexo que incluiu 5q- e 11q- alterações consideradas frequentes em SMD (MORIWAKI et al., 2014). Também, apresentou a inversão do cromossomo 3, que é considerada rara, detectada em cerca de 1% dos casos especialmente nos que evoluem para LMA (CUI et al., 2011; KAYSER et al., 2011). A doença da paciente evoluiu para LMA e a mesma foi para tratamento quimioterápico. Não foram encontradas descrições anteriores de pacientes com SMD e estas três alterações clonais em conjunto, nas mesmas células, o que caracteriza o evento como inédito.

A del(20q) é observada em 4% dos casos de mielodisplasias. O prognóstico nesses casos é considerado bom (PAN et al., 2014). Além disso, a sobrevida dos pacientes é descrita como consideravelmente maior. Um modelo semelhante ao da haploinsuficiência de 5q- também pode ser observado nos casos de del(20q). A deleção promove a perda do gene *L3MBTL1* localizado em q13, que codifica uma proteína associada com a instabilidade do genoma. Similarmente o gene *ASXLI*, responsável por regular a conformação da cromatina através da interação com as proteínas do complexo de repressão Polycomb, por estar localizado no ponto de quebra, está mutado em 10-20% dos casos (BACHER et al., 2013; ADÈS et al., 2014, JHANWAR, 2014). A paciente não apresentou evolução do quadro clínico.

Em conclusão, a análise citogenética das células da medula óssea de indivíduos com SMD ao diagnóstico é importante para a identificação de alterações cromossômicas envolvidas no diagnóstico, prognóstico e evolução da doença, com consequente escolha terapêutica. Além disso, a frequência destas alterações por técnicas convencionais varia entre as casuísticas, podendo ser menor do que as frequentemente descritas.

Nos últimos anos a literatura tem apresentado um número crescente de relatos de alterações cromossômicas, moleculares e epigenéticas em pacientes com SMD, que podem servir de marcadores diagnósticos e futuros alvos terapêuticos. A hipótese científica testada neste estudo é que, além de alterações citogenéticas, SMD apresenta mutações, polimorfismos ou hipermetilação do gene *FOXO3*, que podem estar relacionadas à etiopatogenia destas doenças e serem utilizadas com estes propósitos. Contudo, com exceção das alterações



cromossômicas, os resultados iniciais obtidos quanto ao estudo de mutações no éxon 1 e hipermetilação da região promotora do gene *FOXO3* não confirmam esta hipótese.

Conclusões

---

## 6. CONCLUSÕES

1. Mutações no éxon 1 do *FOXO3* provavelmente não parecem ocorrer em células da medula óssea de indivíduos com SMD ao diagnóstico e, portanto, não parecem estar relacionadas à etiopatogenia de SMD, embora mutações em outros éxons não podem ser descartadas.
2. O polimorfismo 159C>T parece ser frequente na população e não estar relacionado ao aparecimento de SMD, contudo, sua frequência merece ser melhor investigada em outras casuísticas.
3. O padrão de metilação da região promotora do gene *FOXO3* nos indivíduos com SMD ao diagnóstico não está alterado, e portanto, parece não estar relacionado com o início da doença.
4. A deleção do braço longo do cromossomo 5, do cromossomo 20 e a monossomia do cromossomo 22 como eventos clonais únicos em adultos, e a monossomia do cromossomo 7 como única alteração observada em crianças, parecem significar bom prognóstico em SMD.
5. O cariótipo complexo envolvendo inv(3)(q21q27), del(5)(q13) e del(11)(q14) em SMD sugere prognóstico ruim.
6. A análise citogenética das células da medula óssea de indivíduos com SMD ao diagnóstico é importante, pois permite a identificação de alterações cromossômicas envolvidas no diagnóstico, prognóstico e consequente escolha terapêutica.



## 7. REFERÈNCIAS

ADÈS, L.; ITZYKSON, R.; FENAUX, P. Myelodysplastic syndromes. **Lancet** v. 388, n. 9936, p.2239-52. Jun. 2014.

ARENILLAS, L.; MALLO, M.; RAMOS, F.; GUINTA, K.; BARRAGÁN, E.; LUMBRERAS, E.; LARRÁYOZ, M.J.; DE PAZ, R.; TORMO, M.; ABÁIGAR, M. et al. Single Nucleotide Polymorphism Array Karyotyping: A Diagnostic and Prognostic Tool in Myelodysplastic Syndromes with Unsuccessful Conventional Cytogenetic Testing. **Genes, Chromosome & Cancer** v. 52, n. 12, p. 1167-77, Dez. 2013.

BACHER, U.; HAFERLACH, T.; SCHNITTGER, S.; ZENGER, M.; MEGGENDORFER, M.; JEROMIN, S.; ROLLER, A.; GROSSMANN, V.; KRAUTH, M.T.; ALPERMANN, T. et al Investigation of 305 patients with myelodysplastic syndromes and 20q deletion for associated cytogenetic and molecular genetic lesions and their prognostic impact. **British Journal of Haematology** v. 164, n.6, p.822-33, Mar. 2013.

BACHERA, U.; KERNB, W.; ALPERMANN, T.; SCHNITTGER, S.; HAFERLACH, C.; HAFERLACH, 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.

BEJAR, R. Clinical and genetic predictors of prognosis in myelodysplastic syndromes, **Haematologica** v. 99, n.6, p. 956-64, Jun. 2014.

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.

BERGER, R.; LE CONIAT, M.; DERRÉ, J.; FLEXOR, M.A. Loss of chromosome 22 in patients with refractory anemia with excess of blasts (RAEB) in transformation and acute leukemia after RAEB. **Cancer Genetics and Cytogenetics** v. 61, n. 2, p. 210-212, 1992.

BHARDWAJ, A. Investigating the role of site specific synonymous variation in disease association studies. **Mitochondrion** v. 16, p. 83-8, Mai. 2014.

BRAVO, G.M.; LEE, E.; MERCHAN, B.; KANTARJIAN, H.M.; GARCIA-MANERO, G. Integrating genetics and epigenetics in myelodysplastic syndromes: advances in pathogenesis and disease evolution. **British Journal of haematology** v. 166, n.5, p. 646-59, Set. 2014.

BROER, L.; BUCHMAN, A.S.; DEELEN, J.; EVANS, D.S.; FAUL, J.D.; LUNETTA, K.L.; SEBASTIANI, O.; SMITH, J.A.; TANAKA, T.; YU, L. et al, GWAS of Longevity in CHARGE Consortium Confirms APOE and FOXO3 Candidacy. **The journals of gerontology** v. 70, n. 1, p. 110-8, Jan. 2015.

BURBURY, K. L.; WESTERMAN, D. A. Role of flow cytometry in myelodysplastic syndromes: diagnosis, classification, prognosis and response assessment. **Leukemia & Lymphoma** v. 55, n. 4, 749-60, 2013.

BUTT, A.M.; FENG, D.; IDREES, M.; TONG, Y.; LU J. Computational Identification and Modeling of Crosstalk between Phosphorylation, O- $\beta$ -glycosylation and Methylation of *FoxO3* and Implications for Cancer Therapeutics. **International Journal of Molecular Sciences** v. 13, n.3, p. 2918-2938, Mar. 2012.

CALNAN, D. R.; WEBB, A. E.; WHITE, J.L.; STOWE, T. R.; GOSWAMI, T.; SHI, X.; ESPEJO, A.; BEDFORD, M.T.; GOZANI, O.; GYGI, ; BRUNET A. Methylation by Set9 modulates FoxO3 stability and transcriptional activity. **Aging** v.4, n. 7, p. 462-479, Jul 2012.

CAMPA, D.; HÜSING, A.; DOSTAL, L.; STEIN, A.; DROGAN, D.; BOEING, H.; TJØNNELAND, A.; ROSWALL, N.; OSTERGAARD, J.N., OVERVAD, K. et al, Genetic variability of the forkhead box O3 and prostate cancer risk in the European Prospective Investigation on Cancer. **Oncology reports** v. 26, n.4, p. 979-86, Oct. 2011.

CAO, P.; LI, P.; LI, X.; ZHANG, G.; CHEN, F. Detecting chromosomal aberrations in myelodysplastic syndrome with fluorescence in situ hybridization and conventional cytogenetic analysis. **Journal of Central South University** v. 39, n. 6, p. 605-11, Jun. 2014.

CHATTERJEE, T.; CHOUDHRY, V.P. Childhood Myelodysplastic Syndrome. **Indian Journal of Pediatrics** v. 80, n. 9, p. 764-71, Set. 2013.

CHOWDHRY, M.; MAKROO, R.N.; SRIVASTAVA, P.; MISHRA, M. Refractory cytopenia of the childhood. **Indian Journal of Pathology & Microbiology** v. 55, n.2, p.274-276, Jun. 2012.

CHU, D., KAZANA, E.; BELLANGER, N.; SINGH, T.; TUIITE, M.F.; VON DER HAAR, T. Translation elongation can control translation initiation on eukaryotic mRNAs. **The Embo Journal** v. 33, n. 1, p. 21-34, Jan. 2014.

CUI, W; SUN, J.; COTTA, C.V.; MEDEIROS, L.J.; LIN, P. Myelodysplastic Syndrome With inv(3)(q21q26.2) or t(3;3)(q21;q26.2) Has a High Risk for Progression to Acute Myeloid Leukemia. **American Journal of Clinical Pathology** v.136, n.2, p. 282-288, Aug. 2011.

DAVIDSSON J.; LILLJEBJO, H.; ANDERSSON, A.; VEERLA, S.; HELDRUP, J.; BEHRENDTZ, M.; FIORETOS, T.; JOHANSSON, B. The DNA methylome of pediatric acute lymphoblastic leukemia. **Human Molecular Genetics** v. 18, n. 21, p. 4054-65, Nov. 2009.

FLACHSBART, F.; MÖLLER, M.; DÄUMER, C.; GENTSCHER, L.; KLEINDORP, R.; KRAWCZAK, M.; CALIEBE, A.; SCHREIBER, S.; NEBEL, A. Genetic investigation of FOXO3A requires special attention due to sequence homology with FOXO3B. **European Journal of human genetics** v. 21, n. 2, p.240-2, Fev. 2013.

FONG, C.Y.; MORISON, J.; DAWSON, M.A. Epigenetics in the hematologic malignancies. **Haematologica** v. 99, n. 12, p. 1772-83, Dez. 2014.

FORAN, J.M.; SHAMMO, J.M. Clinical presentation, diagnosis, and prognosis of myelodysplastic syndromes. **The American Journal of Medicine** v. 125, n.7, p. S6-13, 2012.

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.

GALLARDO, T.D; JOHN, G.B.; BRADSHAW, K.;REIJO-PERA, R; VOGT, P.H.; TOURAINE, P.; BIONE, S.; TONIOLO, D.; NELSON, L.M.; ZINN, A.R.; CASTRILLON, D.H. Sequence variation at the human FOXO3 locus: a study of premature ovarian failure and primary amenorrhea. **Human Reproduction** v. 23, n. 1, p. 216-221.Jan. 2008.

GARCIA-MANERO, G. Myelodysplastic syndromes: 2012 update on diagnosis, risk-stratification, and management. **American Journal of Hematology** v. 87, n.7, p. 692-701, Jul. 2012.

GARCIA-MANERO, G. CME Information: Myelodysplastic syndromes: 2014 update on diagnosis, risk-stratification and management. **American Journal of Hematology** v. 89, n.1, p. 97-1018, Jan. 2014.

GENIN, E.C; CARON, C.; VANDENBOSCH, R.; NGUYEN, L.; MALGRANGE, B. Concise Review: Forkhead pathway in the control of adult neurogenesis. **Stem Cells** v. 36, n. 6, p. 1398-407, Fev, 2014.

GERMING, U.; KOBBE, G.; HAAS, R.; GATTERMANN N. Myelodysplastic Syndromes: Diagnosis, Prognosis, and Treatment, **Dtsches Arzteblatt International** v.110, n.46, p. 783-793, Nov. 2013.

GIAGOUNIDIS, A.; HAASE, D.; Morphology, cytogenetics and classification of MDS. **Best Practice & Research Clinical Haematology** v.126, n.4, p.337-353, Dec. 2013.

GLAUBACH, T.; ROBINSON, L.J.; COREY, S.J. Pediatric myelodysplastic syndromes: they do exist! **Journal of pediatric/oncology**v.36, n. 1, p.1-7, Jan. 2014.

GLAUSER, T.A.; SAGATYS, E.M.; WILLIAMSON, J.C.; BURTON, B.S.; BERGER, C.; MERWIN, P.; SUGRUE, M.; BENNETT, J.M. Current pathology practices in and barriers to MDS diagnosis. **Leukemia Research**, v. 37, n .12 ,p. 1656-61, Dez. 2013.

GOMES, A.R.; ZHAO, F.; LAM, E.W.F. Role and regulation of the forkhead transcription factors *FOXO3a* and *FOXM1* in carcinogenesis and drug resistance, **Chinese Journal of Cancer** v. 32, n. 7, p. 365-70 , Jul. 2013.

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

HAFERLACH, T. Molecular genetics in myelodysplastic syndromes. **Leukemia Research** v. 36, n. 12, p.1459-1462, Dec. 2012.

HAFERLACH, T.; NAGATA, Y.; GROSSMANN, V.; OKUNO, Y.; BACHER, U.; NAGAE, G.; SCHNITTGER, S.; SANADA, M.; KON, A.; ALPERMANN, T. et al. Landscape of genetic lesions in 944 patients with myelodysplastic syndromes. **Leukemia** v. 28, n. 2, p. 241-7, Fev. 2015.

HE, Y.Z.; HU, X.; CHI, X.S.; ZHANG, Y.C.; DENG, X.B.; WEI, M.T.; WANG, Z.Q.; ZHOU, Y.H. Association between *RAD51* gene polymorphism (-135G/C) and susceptibility of myelodysplastic syndrome and acute leukemia: evidence based on a meta-analysis. **Tumour biology** v. 35, n.1, p. 615-21, Jan. 2014.

HEMMAT, M.; CHEN, W.; ANGUIANO, A.; NAGGAR, M.E.; RACKE, F.K.; JONES, D.; WANG, Y.; STROM, C.M.; CHANG, K.; BOYAR, F.Z. Submicroscopic deletion of 5q involving tumor suppressor genes (*CTNNA1*, *HSPA9*) and copy neutral loss of heterozygosity associated with *TET2* and *EZH2* mutations in a case of MDS with normal chromosome and FISH results. **Molecular Cytogenetics** v. 7, p. 35, Mai. 2014.

HERMAN J.G.; GRAFF J.R.; MYÖHÄNEN S.; NELKIN B.D.; BAYLIN S.B. Methylation-specific PCR: a novel PCR assay for methylation status of CpG islands. **Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of America** v. 93, n. 18, p. 9821–9826, Set. 1996.

HU, T.; CHUNG, Y.M.; GUAN, M.; MA, M.; MA, J.; BEREK, J.S.; HU, M. Reprogramming ovarian and breast cancer cells into non-cancerous cells by low-dose metformin or SN-38 through *FOXO3* activation, **Scientific Reports** v. 24, n. 4; p.5810, Jul. 2014.

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.

IKEDA, J.; TIAN, T.; WANG, Y.; HORI, Y.; HONMA, K.; WADA, N.; MORII, E.; Expression of FoxO3a in clinical cases of malignant lymphoma. **Pathology, research and practice** n. 209, v.11; p. 716-20, Nov. 2013.

INTERNATIONAL SYSTEM FOR HUMAN CYTOGENETIC NOMENCLATURE. **ISCN 2013: An International System for Human Cytogenetic Nomenclature**. Farmington: Karger, B. S. 2013.

ISSA, J.P. The myelodysplastic syndrome as a prototypical epigenetic disease. **Blood** v.121, n. 19, p.3811-3817, May. 2013.

JAGANI, Z.; SINGH, A.; KHOSRAVI-FAR, R. FoxO tumor suppressors and BCR-ABL-induced leukemia: a matter of evasion of apoptosis. **Biochimica e Biophysica** v. 1785, n. 1, p. 63-84, Jan. 2008.

JHANWAR, S.C., (2014) Genetic and epigenetic pathways in myelodysplastic syndromes: A brief overview. **Advances in Biological Regulation** v. 4926, n.14, p. 60-8.

KARAGIANNIS, T. C.; MAULIK, N. Factors Influencing Epigenetic Mechanisms and Related Diseases. **Antioxidant & Redox Signaling** v.17, n.2, p.192-194, Jul. 2012.



KAWANKAR, N.; JIJINA, F.; GHOSH, K.; VUNDINTI, B. R. Cytogenetic and comparative genomic hybridization study of Indian myelodysplastic syndromes. **Cancer Epidemiology** v.35, n. 4, e1-5, Aug. 2011.

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.

KERN, W.; HAFERLACH, C.; SCHNITTGER, S.; ALPERMANN, T.; HAFERLACH, T. Serial assessment of suspected myelodysplastic syndromes: significance of flow cytometric findings validated by cytomorphology, cytogenetics, and molecular genetics. **Haematologica** v. 98, n. 2, 201-7, Feb. 2012.

KOMROKJI, R.S.; PADRON, E.; EBERT, B.L.; LIST, A.F. Deletion 5q MDS: Molecular and therapeutic implications. **Best Practice & Research Clinical Haematology** v. 4, n. 26, p. 365-375, Dec 2013.

LARANJEIRA, P.; RODRIGUES, R.; CARVALHEIRO, T.; CONSTANCO, C.; MATARRAZ, S.; TRINDADE, H.; ÓRFÃO, A.; PAIVA, A. Expression of CD44 and CD35 during normal and myelodysplastic erythropoiesis. **Leukemia Research** v. S0145-2126, n. 14, Dez. 2014.

LEE, S.; KWON, H.C.; KIM, S.H.; OH, S.Y.; OH, S.Y.; LEE, J.H.; LEE, Y.S.; SEO, D.; HAN, J.Y.; KIM, H.J. Identification of genes underlying different methylation profiles in refractory anemia with excess blast and refractory cytopenia with multilineage dysplasia in myelodysplastic syndrome. **The Korean Journal of Hematology** v. 47, n. 3, p.186-193, Sep. 2012.

LI, L.; LIU, X.P.; NIE, L.; YU, M. H.; ZHANG, Y.; QIN, T. J.; XIAO, Z. T. Unique cytogenetic features of primary myelodysplastic syndromes in Chinese patients. **Leukemia research** v. 33, n. 9, p. 1194- 1198, Sep. 2009.

LI, Z.; ZHANG, H.; CHEN, Y.; FAN, L.; FANG, J. Forkhead transcription factor FOXO3a protein activates nuclear factor  $\kappa$ B through B-cell lymphoma/leukemia 10 (BCL10) protein and promotes tumor cell survival in serum deprivation. **The Journal of Biological Chemistry** v.287, p. 17737-17745, Mai, 2012.

LUKACKOVA, R.; BUJALKOVA, M. G.; MAJEROVA, L.; MLADOSIEVICOVA, B. Molecular genetic methods in the diagnosis of myelodysplastic syndromes. A review, **Biomedical Papers of the Medical Faculty of the University Palacky Olomouc Czech Repub** v. 158, n. 3, p. 339-45, Set. 2014.

MA, W.; KANTARJIAN, H.; ZHANG, K.; ZHANG, X.; WANG, X.; CHEN, C.; DONAHUE, A. C.; ZHANG, Z.; YE, C. H.; O'BRIEN, S.; GARCIA-MANERO, G.; CAPORASO, N.; LANDGREN, O.; ALBITAR M. Significant association between

polymorphism of the erythropoietin gene promoter and myelodysplastic syndrome. **BMC Medical Genetics** v. 11, p 163, Nov. 2010.

MA, X. Epidemiology of myelodysplastic syndromes. **The American Journal of Medicine** v. 125, n. 7, p. S2-5, Jul. 2012.

MAGALHÃES, S. M. M.; LORAND-METZE, I. Síndromes mielodisplásicas – protocolo de exclusão. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia** v. 26 n. 4, Dez. 2004.

MARSHALL, D.; ROBOZ, G.J. Standardizing the Initial Evaluation for Myelodysplastic Syndromes, **Current Hematologic Malignances Report** v. 8, n. 4, p. 361-9, Dez. 2013.

MELDI, K.M.; FIGUEROA, M.E. Epigenetic deregulation in myeloid malignancies. **Translational research: the journal of laboratory and clinical medicine** v. 165, n. 1, p.102-114, Jan. 2015.

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. 3, p. 1215, 1998.

MORIWAKI, K.; MANABE, A.; TAKETANI, T.; KIKUCHI, A.; NAKAHATA, T.; HAYASHI, Y. Cytogenetics and clinical features of pediatric myelodysplastic syndrome in Japan. **International Journal of Hematology** v. 100, n. 5, p. 478-84, Nov. 2014.

MUSILOVA, J.; MICHALOVA, K. Chromosome study of 85 patients with myelodysplastic syndrome. **Cancer Genetics and Cytogenetics** v. 33, n. 1, p. 39-50, 1988.

NEUKIRCHEN, J.; LAUSEKER, M.; BLUM, S.; GIAGOUNIDIS, A.; LÜBBERT, M.; MARTINO, S.; SIRAGUSA, S.; SCHLENK, R.F.; PLATZBECKER, U.; HOFMANN, W.K. et al, Validation of the revised International Prognostic Scoring System(IPSS-R) in patients with myelodysplastic syndrome:A multicenter study. **Leukemia Research** n. 38, v. 1, p.57-64, Jan. 2014.

NGUETSE, C.N.; KREMSNER, P.G.; VELAVAN, T.P. **FOXO3A regulatory polymorphism and susceptibility to severe malaria in Gabonese children.** *Immunogenetics* v. 67, n. 2, p. 67-71, 2015.

NHO, R.S.; HERGERT, P. FoxO3a and disease progression. **World Journal of biological chemistry** v.5, n. 3, p. 346-54, Aug. 2014.

NYBAKKEN, G.E.; BAGG, A. The Genetic Basis and Expanding Role of Molecular Analysis in the Diagnosis, Prognosis, and Therapeutic Design for Myelodysplastic Syndromes. **The Journal of Molecular Diagnosis** v.16, n. 2, p. 145-58, Mar. 2014.

OKAMOTO, R.; OGAWA, S.; NOWAK, D.; KAWAMATA, N.; AKAGI, T.; KATO, M.; SANADA, M.; WEISS, T.; HAFERLACH, C.; DUGAS, M.; RUCKERT, C.; HAFERLACH, T.; KOEFFLER, H. P. Genomic profiling of adult acute lymphoblastic leukemia (ALL) by single nucleotide polymorphism oligonucleotide microarray and comparison to pediatric ALL. **Haematologica** v. 95, n. 9, p. 1481-1488, Sep 2010.

PAN, J.; WU, C.; XUE, Y.; QIU, H.; CHEN, S.; ZHANG, J.; BAI, S.; WU, Y.; WANG, Y.; SHEN, J. et al, The characteristics and prognostic analysis in 213 myeloid malignancy patients with del(20q): a report of a single-center case series. **Cancer Genetics** v. 207, n. 2, p. 51-6, Mar. 2014.

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.

RASHID, A.; KHURSHID, M.; SHAIKH, U.; ADIL, S. (2014) Chromosomal Abnormalities in Primary Myelodysplastic Syndrome. **Journal of the College Physicians and Surgeons-Pakistan** v. 24, n. 9, p . 632-5, Set. 2014.

RAU, A.T.; SHREEDHARA, A.K.; KUMAR, S. Myelodysplastic syndromes in children: where are we today? **The Ochsner Journal**, v. 12, p.216-220, 2012.

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

RIBEIRO JR, H.L.; OLIVEIRA, R.T.G.; MAIA, A.R.S.; FERREIRA FILHO, L.I.P.; SOUSA, J.C.; HEREDIA, F.F.; MAGALHÃES, S.M.M; PINHEIRO, R.F. Polymorphisms of DNA repair genes are related to the pathogenesis of myelodysplastic syndrome. **Hematological oncology Out.** 2014.

SAIKI, R. K.; GELFAND, D. H.; STOFFEL, S.; SCHARF, S. J.; HIGUCHI, R.; HORN, G. T.; MULLIS, K. B.; ERLICH, H. A. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermo, 1998.

SAKOE, Y.; SAKOE, K.; KIRITO, K.; OZAWA, K.; KOMATSU, N.; FOXO3A as a key molecule for all-*trans* retinoic acid–induced granulocytic differentiation and apoptosis in acute promyelocytic leukemia, **BLOOD** v.115, n.18, p. 3787-95, May. 2010.

SALAZAR, M.; LORENTE, M.; GARCÍA-TABOADA, E.; PÉREZ GÓMEZ, E.; DÁVILA, D.; ZÚÑIGA-GRACÍA, P.; MARÍA FLORES, J.; RODRÍGUEZ, A.; HEGEDUS, Z.; MOSÉN-ANSORENA, D. et al, Loss of Tribbles pseudokinase-3 promotes Akt-driven tumorigenesis via FOXO inactivation. **Cell death and differetiation** v. 22, n. 1, p.131-44, Jan 2015.

SAMBROOK, J; RUSSEL, D. W. **Molecular Cloning a Laboratory Manual**. 3. ed. New York: Cold spring harbor laboratory press, 2001.

SÁNCHEZ-CASTRO, J.; MARCO-BETÉS, V.; GÓMEZ-ARBONÉS, X.; ARENILLAS L.; VALCARCEL, D.; VALLESPÍ, T. et al, Characterization and prognostic implication of 17 chromosome abnormalities in myelodysplastic syndrome. **Leukemia Research** v.37, n.7, p. 769-776, 2013.

SANTAMARÍA, C.M.; CHILLÓN, M.C.; GARCÍA-SANZ, R.; PÉREZ, C.; CABALLERO, M.D.; RAMOS, F.; DE COCA, A.G.; ALONSO, J.M.; GIRALDO, P.; BERNAL, T.; QUEINZÁN, J.A.; RODRIGUEZ, J.N.; FERNÁNDEZ-ABELLÁN, P.; BÁREZ, A.; PENÁRRUBIA, M.J.; VIDRIALES, M. B.; BALANZATEGUI, A.; SARASQUETE, M.E.; ALCOCEBA, M.; DÍAZ-MEDIAVILLA, J.; SAN MIGUEL, J.F.; GONZALEZ, M. High FOXO3a expression is associated with a poorer prognosis in AML with normal cytogenetics. **Leukemia Research** v. 33, n. 12, p. 1706-1709, Dec 2009.

SANTINI, V.; MELNICK, A.; MACIE, JEWISKI, J.P.; DUPREZ, E.; NERVI, C.; COCCO, L.; FORD, K.G.; MUFTI, G. Epigenetics in focus: Pathogenesis of myelodysplastic syndromes and the role of hypomethylating agents. **Critical reviews in oncology/hematology** v. 88, n. 2, p. 231-45, Nov. 2013.

SCHANZ J.; HAASE D. Cytogenetic features in myelodysplastic syndromes. **Novel Insights into Pathophysiology, Diagnostics and Treatment of Myelodysplastic Syndromes** p. 48-69, Jan. 2014.

SCHANZ, J. TUCHLER, H; SOLÉ, F.; MALLO, M, LUÑO, E.; CERVERA, J.; GRANADA, J.; HILDEBRANDT, B.; SLOVAK, M.L.; OHYASHIKI, K. 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.

SEITER, K. Myelodysplasia: new approaches. **Current Treatment Options Oncology** V. 14, n. 2, p. 156-69, Jun. 2013.

SHUZHEN, S.; ROU, M.; XIAOMEI, H.; XIAO-HONG, Y; YONG-GANG, X; HONGZHI, W.; XIU-PENG, Y. Karyotype and DNA-Methylation Responses in Myelodysplastic Syndromes following Treatment with Traditional Chinese Formula Containing Arsenic. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine** v. 2012, 2012.

SONG, L.X.; GUO, J.; HE, Q.; YANG, L.P.; GU, S.C.; ZHANG, X.; WU, L.Y.; LI, X.; CHANG, C.K. Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells in Myelodysplastic Syndromes: Cytogenetic Characterization. **Acta Haematology** v. 128, p. 170-177, 2012.

SOUZA, D.C.; FERNANDEZ, C.S.; CAMARGO, A.; APA, A.G.; COSTA, E.S.; BOUZAS, L.F.; ABDELHA, Y. E.; FERNANDEZ, T.S. Cytogenetic as an Important Tool for Diagnosis and Prognosis for Patients with Hypocellular Primary Myelodysplastic Syndrome, **Biomed Research International** v.2014, n. 542395, 2014.

THÉPOT, S.; LAINEY, E.; CLUZEAU, T.; SÉBERT, M.; LEROY, C.; ADÈS, L. et al Hypomethylating agents reactivate FOXO3A in acute myeloid leukemia. **Cell Cycle** v. 10, n.14, p.2323-2330, Jul, 2011.

TIKHANOVICH, I.; KURAVI, S.; CAMPBELL, R. V.; KHARBANDA, K. K.; ARTIGUES, A.; VILLAR M. T.; WEINMAN, S. A. Regulation of FOXO3 by Phosphorylation and Methylation in Hepatitis C Virus Infection and Alcohol Exposure. **Hepatology** v. 59, n.1, p.58-70, Jan, 2014.

UDAYAKUMAR, A.M.; FAWAZ, N.; PATHARE, A.V.; MEVADA, S.T.; WALI, Y.A. Cytogenetic, clinical, and hematological features of pediatric myelodysplastic syndrome in Oman. **Pediatric blood & cancer** 2015.

VARDIMAN, J. The classification of MDS: From FAB to WHO and beyond. **Leukemia Research** v. 36, n.12, p. 1453-8, Dez 2012.

VELLOSO, E.D.R.P.; CHAUFFAILLE, M.L.; PELICARIO, L.M.; TANIZAWA, R.S.S.; TOLEDO, S.R.C.; GAIOLLA, R.D.; LOPES L.F. Cytogenetic studies of Brazilian pediatric myelodysplastic syndrome cases: challenges and difficulties in a large and emerging country. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research** v. 1, n. 46, p.85-90, Jan. 2013.

VISCONTE, V.; SELLERI, C.; MACIEJEWSKI, J.P.; TIU, R.V. Molecular pathogenesis of myelodysplastic syndromes. **Translational medicine** v. 4, n. 8, p.19-30, Fev. 2014.

WANG, B.; MU, Y.; NI, F.; ZHOU, S.; WANG, J.; CAO, Y.; MA, X. Analysis of *FOXO3* mutation in 114 Chinese women with premature ovarian failure. **Reproductive Biomedicine Online** v. 20, n. 4, p. 499-503, Feb. 2010.

WARR, M.R.; BINNEWIES, M.; FLACH, J.; REYNAUD, D.; GARG, T.; MALHOTRA, R.; DEBNATH, J. PASSEGUÉ E, *FoxO3a* Directs a Protective Autophagy Program in Hematopoietic Stem Cells, **Nature** v. 494, n. 7437, p. 323-7, Fev. 2013.

WATKINS, W.J.; UMBERS, A.J.; WOAD, K.J.; HARRIS, S.E. WINSHIP IM, GERSAK K, SHELLING AN, Mutational screening of *FOXO3A* and *FOXO1A* in women with premature ovarian failure. **Fertility and Sterility** v. 86, n.5, p. 1518-1521, Nov. 2006.

WONG, J.J.; LAU, K.A.; PINELLO, N.; RASKO, J.E. 2014 Epigenetic modifications of splicing factor genes in myelodysplastic syndromes and acute myeloid leucemia. **Cancer Science**, v. 105, n, 11, p. 1457-63, Nov. 2014.

YAMAZAKI J.; ISSA, J. P. Epigenetic aspects of MDS and its molecular targeted therapy. **International Journal of Hematology** v.97, n. 2, p. 175-182, Fev. 2013.

ZHANG, L.; PADRON, E.; LANCET, J. The molecular basis and clinical significance of genetic mutations identified in myelodysplastic syndromes. **Leukemia Research** v. 39, n. 1, p. 6-17, Jan. 2015.

ZHAO, X.; YANG, F.; LI, S.; LIU, M.; YING, S.; JIA, X.; WANG, X. CpG island methylator phenotype of myelodysplastic syndrome identified through genome-wide profile of DNA methylation and gene expression. **British Journal of Haematology** v.165, n. 5, 649-58, Jun 2014.



**APÊNDICE A – Artigo 1 submetido a Leukemia Research****Would it be *FOXO3a* gene a candidate target for myelodysplastic syndrome?**

Paula C. Freitas<sup>1</sup>; Fernanda S. Monteiro<sup>1</sup>; Mauricio L. Nogueira<sup>2</sup>; Octávio Ricci Jr<sup>3</sup>;  
Agnes C.Fett-Conte<sup>4</sup>.

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

<sup>2</sup>*Dermatological, Infectious and Parasitic Diseases Department, Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto (FAMERP/FUNFARME), São Paulo, Brazil.*

<sup>3</sup>*Medicine Department, Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto (FAMERP/FUNFARME), São Paulo, Brazil.*

<sup>4</sup>*Molecular Biology Department, Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto, (FAMERP/FUNFARME), Sao Paulo, Brazil.*

**Corresponding Author:**

Paula Curi de Freitas  
Av. Brigadeiro Faria Lima, 5544  
São José do Rio Preto-SP  
Brasil  
CEP:15090-000  
Phone: 55+17+32015000, 1931  
e-mail: paulacuri.bio@gmail.com

**Abstract**

Myelodysplastic syndrome (MDS) is a heterogeneous group of clonal hematopoietic stem cell disorders characterized by peripheral cytopenias and ineffective hematopoiesis that can evolve to acute myeloid leukemia. MDS is an example of age-related malignancy and its increasing incidence can be attributed to a greater life expectancy. Some genes are associated with the etiology and prognosis. *FOXO3a*, is a tumor suppressor commonly expressed in hematopoietic tissue. Mutations in exon 1 are associated with several types of cancer. Alterations in this gene could result in abnormal hematopoiesis and leukemia, but it was not previously studied in MDS. This study investigated mutations in the exon 1 of *FOXO3a* in bone marrow cells of 100 patients diagnosed with any type of MDS at diagnosis. No mutations were found in exon 1, but the 159C>T polymorphism was detected in 26 (26%) patients and in 16 (16%) controls ( $p = 0.1175$ ). These findings suggest that alterations in exon 1 of *FOXO3a* not play an essential role in initial MDS and that it is not a marker of the disease. However, this hypothesis needs to be corroborated by further investigation, involving the exon 1 and the other two exons, before excluding an association between *FOXO3a* and MDS.

**Keywords:** Myelodysplastic syndrome; Polymorphism; Mutation.



## 1. Introduction

The myelodysplastic syndrome (MDS) is a group of acquired clonal hematopoietic stem cell disorders of ineffective hematopoiesis that characteristically demonstrate peripheral blood cytopenia, bone marrow hypercellularity, and morphologically defined dysplasia of one or more hematopoietic lineages with an increased risk of transformation to acute myeloid leukemia (AML). It is considered a malignant neoplasm because of frequent genetic aberrations and limited survival with progression to acute myeloid leukemia or death related to the consequences of bone marrow failure, including infection, hemorrhage, and iron overload [1,2,3]. In MDS, an abnormal malignant hematopoietic stem cell (HSC) acquires a growth advantage over its normal counterparts with the resulting daughter cells overwhelming the bone marrow. The result is a clonal dysplastic bone marrow but, unlike other hematopoietic malignancies, the clonal cells retain their ability to mature. In addition, this rapidly expanding cellular population is characterized by excessive apoptosis. These two characteristics (differentiation and apoptosis) are lost when MDS progresses to AML [1,2].

MDS can be difficult to diagnose due to the high rate of comorbidities and other health concerns related to advanced age, some of which, such as anemia, can mimic the presentations of the syndrome. MDS is probably the most common hematologic malignancy in over 60-year-old people and is a major source of morbidity and mortality among the older age groups. The incidence is around 4 per 100,000 head of population per year with a prevalence of about 7 in 100,000. The incidence of MDS rises sharply with advancing age, reaching over 50 per 100,000/year in the over 80-year-old age group. Median age at disease onset is around 70 years [4].

The widely accepted revised World Health Organization (WHO) classification (2008) [5] takes into consideration all available information, including clinical, morphologic, cytochemical, immunophenotypic, cytogenetic and other biologically significant data to define specific diseases. The following subgroups are defined: refractory cytopenia with unilineage dysplasia (RCUD), refractory anemia with ringed sideroblasts (RARS), refractory cytopenia with multilineage dysplasia (RCMD), refractory anemia with excess blasts-1 (RAEB-1), refractory anemia with excess blasts-2 (RAEB-2), unclassifiable myelodysplastic syndrome and myelodysplastic syndrome with isolated del(5q) [5,6].

MDS can be either primary (*de novo*) or secondary to chemotherapy, radiation therapy, or immunosuppressive medications. Heterogeneous clonal cytogenetic abnormalities are detected in 30 to >80% of patients depending on the MDS subtype and whether the

disease is *de novo* or mutagen-induced. There is a growing body of evidence that, in patients with a normal karyotype, submicroscopic alterations provide the genetic basis for the disease including point mutations, microdeletions, microamplifications, epigenetic changes and uniparental disomy. What all cytogenetic and molecular abnormalities have in common is that they either lead to a reduction or complete loss of function of protective factors such as suppressor gene products, or to a gain or amplification of oncogene products resulting in malignancy [7,8].

MDS is a disease that involves the cooperation of several different genetic events even in the early stages. Several papers have investigated molecular markers, especially mutations in MDS cells and it is well known that over 40 genes recurrently have somatic mutations. More than 80% of MDS patients have at least one abnormality in genes that control epigenetic regulation, RNA splicing, growth factor signaling, transcriptional regulation, apoptosis, or genomic stability [9].

The forkhead box protein O3 gene (*FOXO3* or *FOXO3a*) is a member of the Forkhead family of transcription factors. It is a tumor suppressor that encodes a protein that controls the transcription of a number of genes crucial for regulating a wide variety of biological processes including cell cycle regulation, longevity, DNA repair, apoptosis, aging, cancer, diabetes, antioxidant response, fertility, autophagy and neurogenesis, all of which are required for normal homeostasis and development [10,11].

The forkhead box class O (FOXO) subfamily of transcription factors (FOXO1, FOXO3a, FOXO4, and FOXO6) act downstream of the phosphoinositol-3-kinase (PI3K)-AKT signaling cascade. The PI3K-AKT cascade is a commonly deregulated signaling pathway in cancer. During tumorigenesis and the evolution toward cancer drug resistance, this oncogenic pathway is frequently hyperactivated, leading to FOXO inactivation [12]. Loss of function of *FOXO3a* has been linked to tumorigenesis and poor patient survival in breast cancer and ovarian cancer [13]. Some studies have identified vital functions of FOXO proteins in the maintenance of the hematopoietic stem cell pool, but it seems that the functions are diverse and probably cell type-specific. The overexpression of *FOXO3a* was found to be related with lymphoma and leukemia showing the complexity of the role of this gene in cancer [14,15,16]. However, no investigation about mutations in the *FOXO3a* gene in MDS has been carried out. We investigated mutations and polymorphisms in exon 1 of the *FOXO3a* gene in patients at diagnosis of primary MDS.

## 2. Material and Methods

### 2.1 Patients

After approval of the Research Ethics Committee of FAMERP, a prospective hospital-based case-control study was conducted of bone marrow samples from 100 patients newly diagnosed with primary MDS (*de novo*) and 100 cancer-free controls. Subjects ranged in age from 3-83 years old ( $\bar{X} = 52.02$ ); 46 were male and 54 were female. Regarding diagnosis, 48 had RCMD, 24 RAEB-1, 24 RAEB-2, 3 RARS and 1 had RCUD. MDS patients were enrolled in the study prior to being submitted to chemotherapy or radiation treatment. Informed consent was obtained from all participants.

Study subjects were genetically unrelated and from a Brazilian population. The cases were recruited between 2009 and 2014 in the Hematology and Hemotherapy Service of Hospital de Base (São José do Rio Preto, São Paulo State, Brazil) and the cancer-free control subjects were healthy blood donors from the Blood Bank of the same geographic region.

### 2.2 Molecular analyses

Genomic DNA was extracted from bone marrow cells of patients and from peripheral blood of controls. After DNA extraction performed according to the technique described by Miller et al. (1998) [17], exon 1 was amplified by polymerase chain reaction (PCR) was performed according to the technique of SAIKI et al. (1998) [18] with sequences being determined by direct sequencing. The forward and reverse used primers were:

*Left*      5' AGAGGAGAGCGCGAGGC 3'  
*Right*     5' ACTCCGACGAATCCGAGAC 3'

The amplified and purified samples were automatically sequenced in a capillary 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems). The sequences of exon 1 of *FOXO3a* were determined using the Big Dye Terminator kit v 3.1 (Applied Biosystems, USA) according to the manufacturer's recommendations. Six reactions were carried out for each sample due to the size of exon 1 (621 base pairs). In addition, to the two primers used in PCR (above), two other pairs were needed to complete the sequencing of exon 1:

*forward* 5' ACGATGAAGACGACGAGGAC 3'

*reverse* 5' TCCTCGTCGTCTTCATCGTC 3'  
*forward* 5' AGCCGAGGAAATGTTCGTC 3'  
*reverse* 5' ACGAACATTTTCCTCGGCTGC 3'

Sequence analysis was performed using DS Gene 2.0 software (Accelrys, USA). The obtained sequences were compared with the reference sequence available in NCBI [19].

### 3. Results

Molecular analysis by direct sequencing of exon 1 of the *FOXO3a* gene sequences showed that 74 (74%) individuals were considered normal. However, at position 159, a thymine was observed in the position corresponding to a cytosine in the wild-type sequence (159C>T) in 26 (26%) patients, thereby altering the codon GCC to GCT, which is a silent change involving the amino acid alanine (p.Ala53Ala).

Direct sequencing of 100 healthy control individuals was performed using DNA extracted from peripheral blood. Of these, 84 had normal wild-type sequences and 16 (16%) showed the same synonymous single nucleotide polymorphism (SNP - reference single nucleotide polymorphism database of the NCBI 11757217) [20]. The findings in the two groups were compared using the Fisher exact test and showed no statistically significant difference (p-value = 0.1175).

Two (2%) of the patients were homozygous for this SNP and 26 (26%) were heterozygous. In the control group no individual were homozygous and 16 (16%) were heterozygous.

Figures 1 and 2 show the electropherograms corresponding sequence of exon 1 of normal and altered gene *FOXO3a*, respectively.

### 4. Discussion

MDS is a group of clonal stem-cell disorders predominantly occurring in elderly people, most common in adults over the age of 60 [21, 22]. With the exception of a child of 03 years, most patients investigated here were older than 60 years. MDS is extremely rare in childhood; it accounts for less than 5% of all hematopoietic neoplasms in children below the age of 14 years with genetic changes predisposing to MDS in childhood remaining largely unknown [23].

*FOXO3a* has a wide range of functions: it promotes tumor suppression, cell cycle arrest, repair of damaged DNA, detoxification of reactive oxygen species, and apoptosis; it also plays a pivotal role in promoting longevity [24]. Recent studies have shown that it is an essential tumor suppressor that regulates the mechanisms of tumorigenesis and leukemogenesis. Inhibition of *FOXO3* is an important event in hematological diseases and in other types of cancer such as chronic myeloid leukemia, multiple myeloma and lymphoma [25, 26]. It has three exons and mutations/polymorphisms were found in different types of neoplasias, including hematological cancer [24, 27]. Recently, the 3'UTR\_*FOXO3a* polymorphism rs 4946936 was associated with an increased risk for childhood acute lymphoblastic leukemia in a Chinese population. [27]. However, data about a possible relationship between *FOXO3a* and MDS was not found.

Given the key roles of *FOXO3a* in cancer, including hematological roles, a better understanding of the mechanisms by which this gene is regulated, as well as the causative alterations, may help to discover diagnostic and prognostic markers, and eventually help to develop novel approaches to improve the therapeutic management of cancer.

Mutations in exon 1 and exon 2 have been observed in ovarian cancer and ovarian failure [28]. One study that investigated *FOXO3a* mutations in 114 Chinese women with premature ovarian failure found 159C>T (p.Ala53Ala), but this variant (polymorphism) was also present in the control group. The c.159C>T SNP detected is a common SNP that has been detected in women with premature ovarian failure from New Zealand, Slovenia, Italy, North America, France, Germany and South Korea. This SNP was reported previously to SNP databases, but it appears not to impact on the phenotype, since it is also observed in controls [29,30]. The SNP is more common in premature ovarian failure, however, polymorphisms that do not change the amino acid (silent) may have limited significance unless they change mRNA folding or splicing [28]. Mutations in the coding region of human *FOXO3a* might only explain a very low proportion of sporadic premature ovarian failure cases, but it cannot be ignored [31].

In this study, the 159C>T (p.Ala53Ala) SNP in exon 1 of the *FOXO3a* gene was found in MDS patients and controls. This polymorphism was observed in heterozygosity and homozygosity but its frequency in individuals with MDS did not differ significantly from controls. Thus, there is probably no relationship between the mutation in exon 1, the 159C>T SNP and MDS, at least in the population studied.

Despite challenges, genetic mutations can improve our ability to predict outcomes in MDS. Many other investigated markers have a very low incidence in MDS and might have no

impact on classification or prognostication really, similar to the polymorphism found in this study. However, mutations in other exons of the *FOXO3a* gene cannot be excluded as potential genetic markers.

MDS is probably the most common hematologic malignancy in the elderly and the number of cases is expected to rise as the average age of the population increases. 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.

Further investigation involving the exon 1 and the other two exons, should be performed, before excluding an association between *FOXO3a* and MDS.

### **Conflicts of interest**

The authors have no conflicts of interest to disclose.

### **Contributions**

PCF Conceptualized and designed the study, participated of data collection, carried out the molecular genetic studies and statistical analysis, drafted the initial manuscript, reviewed the manuscript and approved the final manuscript as submitted. FSM participated of data collection and approved the final manuscript as submitted. MLN participated at the support and molecular analysis. ORJ follow up the patient and carried out the clinical data collection. ACFC conceptualized and designed the study, supervised data collection, critically reviewed the manuscript, and approved the final manuscript as submitted.

### **Acknowledgement**

This study was supported by Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES). The authors would like to acknowledge all the participants in this study.

## 5. References

- [1] Nybakken GE, Bagg A, The Genetic Basis and Expanding Role of Molecular Analysis in the Diagnosis, Prognosis, and Therapeutic Design for Myelodysplastic Syndromes, *J Mol Diagn*, 2014;16( 2); 145-58.
- [2] Raza A, Galili N, The genetic basis of phenotypic heterogeneity in myelodysplastic syndromes, *Nat Rev Cancer*, 2012;12(12);849-59.
- [3] Natelson EA, Pyatt D., Acquired myelodysplasia or myelodysplastic syndrome: clearing the fog, *Adv. Hematol.*, 2013.
- [4] Germing U, Kobbe G, Haas R, Gattermann N, Myelodysplastic Syndromes: Diagnosis, Prognosis, and Treatment, *Deutsch Ärztebl Int*, 2013; 110(46);783-90.
- [5] Vardiman J, The classification of MDS: From FAB to WHO and beyond, *Leuk Res*, 2012; 36(12);1453-8.
- [6] Lukackovaa R, Bujalkovaa MG, Majerovaa L, Mladosevicovab B, Molecular genetic methods in the diagnosis of myelodysplastic syndromes. A review, *Biomed Pap Med Fac Uni*, 2013.
- [7] Giagounidis A, Haase D, Morphology, cytogenetics and classification of MDS, *Best Pract Res Clin Haematol*, 2013; 26(4); 337-53.
- [8] Garcia-Manero G, CME Information: Myelodysplastic syndromes: 2014 update on diagnosis, risk-stratification and management, *Am J Hematol*, 2014; 89(1); 97-108.
- [9] Bejar R, Clinical and genetic predictors of prognosis in myelodysplastic syndromes, *Haematologica*, 2014; 99(6); 956-64.
- [10] Tikhanovich I, Kuravi S, Campbell RV, Kharbanda KK, Artigues A, Villar MT, Weinman SA, Regulation of *FOXO3* by Phosphorylation and Methylation in Hepatitis C Virus Infection and Alcohol Exposure, *Hepatology*, 2014; 59(1); 58-70.
- [11] Genin EC, Caron N, Vandenbosch R, Nguyen L, Malgrange B, Concise Review: Forkhead Pathway in the Control of Adult Neurogenesis, *Stem Cells*, 2014; 32(6); 1398-407.
- [12] Gomes AR, Zhao F, Lam EWF, Role and regulation of the forkhead transcription factors FOXO3a and FOXM1 in carcinogenesis and drug resistance, *Chin J Cancer*, 2013, 32(7); 365-70.
- [13] Hu T, Chung YM, Guan M, Ma M, Ma J, Berek JS, Hu M, Reprogramming ovarian and breast cancer cells into non-cancerous cells by low-dose metformin or SN-38 through FOXO3 activation, *Sci Rep*, 2014; 4; 5810.
- [14] Miyamoto K, Araki KY, Naka K, Arai F, Takubo K, Yamazaki S, Matsuoka S, Miyamoto T, Ito K, Ohmura M, Chen C, Hosokawa K, Nakauchi H, Nakayama K, Nakayama KI, Harada M, Motoyama N, Suda T, Hirao A, *FOXO3a* Is Essential for Maintenance of the Hematopoietic, Stem Cell Pool, 2007;1(1);101-12.

- [15] Warr MR, Binnewies M, Flach J, Reynaud D, Garg T, Malhotra R, Debnath J, Passegué E, *FOXO3a* Directs a Protective Autophagy Program in Hematopoietic Stem Cells, *Nature*, 2013; 494(7437); 323-7.
- [16] Bakker WJ, van Dijk TB, Parren-van Amelsvoort M, Kolbus A, Yamamoto K, Steinlein P, Verhaak RG, Mak TW, Beug H, Lowenberg B, von Lindern M, Differential Regulation of *FOXO3a* Target Genes in Erythropoiesis, *Mol Cell Biol*, 2007; 27(10); 3839-3854.
- [17] Miller SA, Dykes DD, Polesky HF, A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res*, 1998;16(3)1215.
- [18] Saiki, R. K.; Gelfand, D. H.; Stoffel, S.; Scharf, S. J.; Higuchi, R.; Horn, G. T.; Mullis, K. B.; Erlich, H. A. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermo.
- [19] National Center for Biotechnology Information. National Library of Medicine, National Health Institutes. Washington, DC; [http:// www.ncbi.nlm.nih.gov/gene](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene) Aug. 25, 2014.
- [20] National Center for Biotechnology Information. National Library of Medicine, National Health Institutes. SNP. Washington, DC; [http:// www.ncbi.nlm.nih.gov/snp](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp), Aug. 25, 2014.
- [21] Adès L, Itzykson R, Fenaux P, Myelodysplastic syndromes, *Lancet*, 2014; 383(9936); 2239-52.
- [22] Samiev D, Bhatt VR, Armitage JD, Maness LJ, Akhtari M, A Primary Care Approach to Myelodysplastic Syndromes, *Korean J Fam Med*, 2014; 35(3);111-8.
- [23] Chatterjee T, Choudhry VP, Childhood myelodysplastic syndrome, *Indian J Pediatr.*, 2013; 80(9); 764-71.
- [24] Campa D, Hüsing A, Dostal L, Stein A, Drogan D, Boeing H, Tjønneland A, Roswall N, Østergaard JN, Overvad K, Rodríguez L, Bonet C, Sánchez MJ, Larrañaga N, Huerta JM, Ardanaz E, Khaw KT, Wareham N, Travis RC, Allen NE, Trichopoulou A, Zylis D, Karapetyan T, Palli D, Sieri S, Tumino R, Vineis P, Bueno-de-Mesquita HB, Lenner P, Johansson M, Jenab M, Cox D, Siddiq A, Kaaks R, Canzian F, Genetic variability of the forkhead box O3 and prostate cancer risk in the European Prospective Investigation on Cancer, *Oncol Rep*, 2011; 26(4); 979-86.
- [25] Sakoe Y, Sakoe K, Kirito K, Ozawa K, Komatsu N, *FOXO3a* as a key molecule for all-*trans* retinoic acid–induced granulocytic differentiation and apoptosis in acute promyelocytic leukemia, *Blood*, 2010; 115(18); 3787-95.
- [26] Ikeda J, Tian T, Wang Y, Hori Y, Honma K, Wada N, Morii E, Expression of *FOXO3a* in clinical cases of malignant lymphoma, *Pathol Res Pract.*, 2013;209(11); 716-20.



- [27] Wang Y, Zhou L, Chen J, Li J, He J, Wu P, Wang M, Tong N, Zhang Z, Fang Y, Association of the 3'UTR *FOXO3a* polymorphism rs4946936 with an increased risk of childhood acute lymphoblastic leukemia in a Chinese population, *Cell Physiol Biochem.*, 2014; 34(2); 325-32.
- [28] Watkins WJ, Umbers AJ, Woad KJ, Harris SE, Winship IM, Gersak K, Shelling AN, Mutational screening of *FOXO3A* and *FOXO1A* in women with premature ovarian failure. *Fertil Steril.*, 2006; 86(5); 1518-1521.
- [29] WANG B, MU Y, NI F, ZHOU S, WANG J, CAO Y, MA X, Analysis of FOXO3 mutation in 114 Chinese women with premature ovarian failure. *Reprod Biomed Online*, 2010; 20(4); 499-503.
- [30] Gallardo TD, John GB, Bradshaw K, Welt C, Reijo-Pera R, Vogt PH, Touraine P, Bione S, Toniolo D, Nelson LM, Zinn AR, Castrillon DH, Sequence variation at the human *FOXO3* locus: A study of premature ovarian failure and primary amenorrhea, *Hum Reprod*, 2008; 23(1); 216-21.
- [31] Vinci G, Cristin-Maitre S, Pasquier M, Bouchard P, Fellous M, Veitia RA, *FOXO3a* variants in patients with premature ovarian failure, *Clin Endocrinol*, 2008; 68(3); 495-7.

Figures:

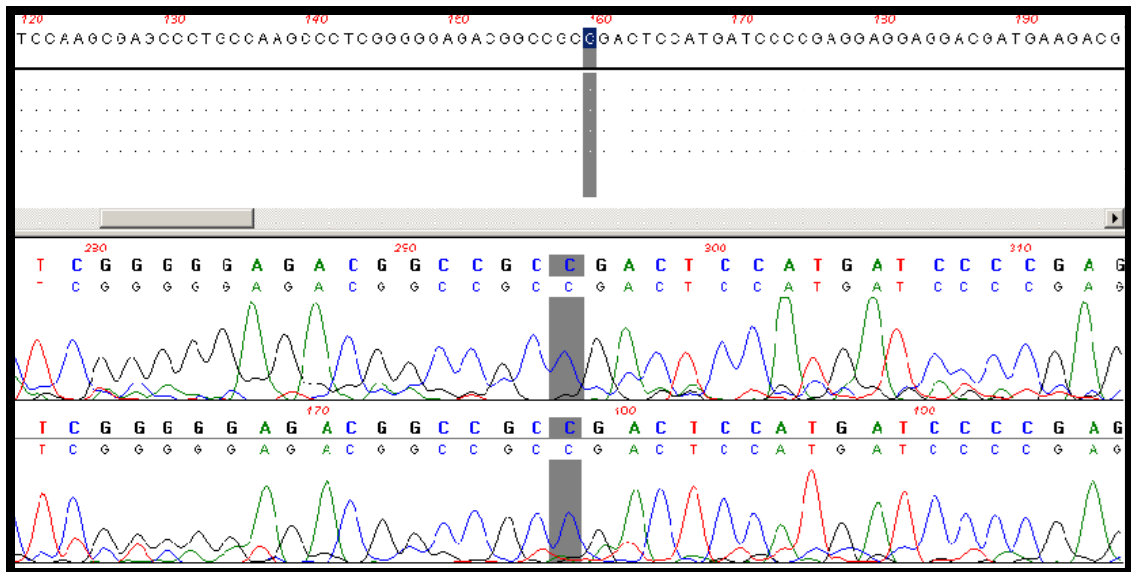


Figure 1. Electropherogram of partial sequences of exon 1, highlighted the position 159 in the presence of cytosine as the reference sequence.

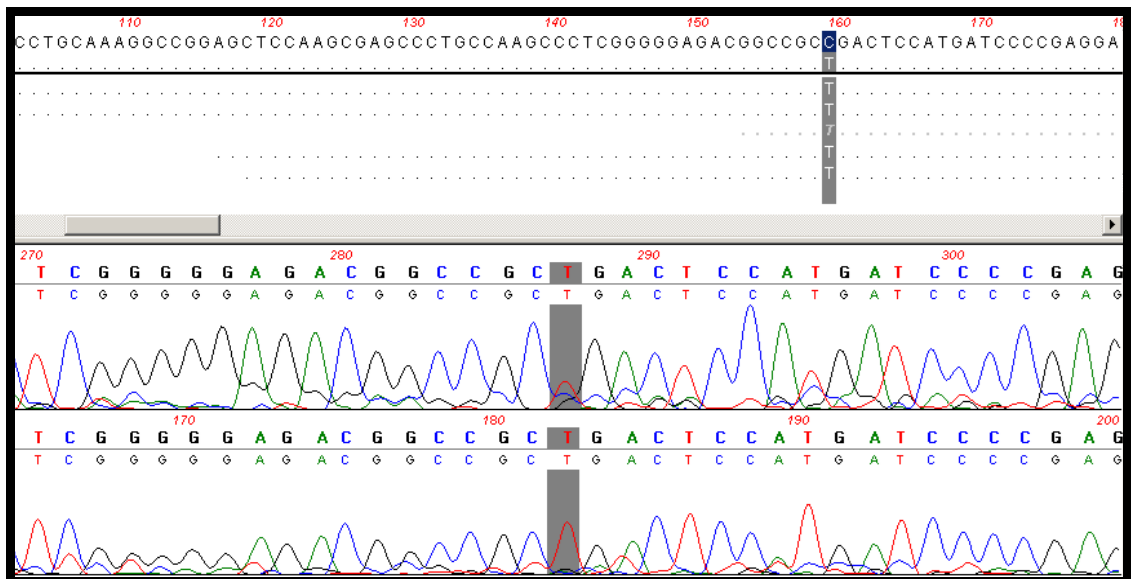


Figure 2. Electropherogram of partial sequences of exon 1, highlighted the position 159 in the presence of thymine, showing the substitution C> T.

**APÊNDICE B – Artigo 2 a ser submetido a Acta Haematologica****Brief Communication****Methylation analysis reveals normal pattern of *FOXO3* gene in MDS**

Paula C. Freitas<sup>1</sup>; Fernanda S. Monteiro<sup>1</sup>; Octávio Ricci Jr<sup>2</sup>; Agnes C.Fett-Conte<sup>3</sup>

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

<sup>2</sup>*Medicine Department, Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto (FAMERP/FUNFARME), São Paulo, Brazil.*

<sup>4</sup>*Molecular Biology Department, Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto, (FAMERP/FUNFARME), Sao Paulo, Brazil.*

**Short title: Methylation of *FOXO3* in MDS**

**Corresponding Author:**

Paula Curi de Freitas  
Av. Brigadeiro Faria Lima, 5544  
São José do Rio Preto-SP  
Brazil  
CEP:15090-000  
Phone: 55 17 32015000  
e-mail: paulacuri.bio@gmail.com

The fact that the phenotypic diversity of Myelodysplastic syndromes (MDS) is not explained by recurrent aberrant karyotypes alone, has emphasized the importance of searching for other factors responsible for their etiology. Recent advances have identified the participation of aberrant DNA methylation patterns as one key pathogenic factor in MDS, similar to myeloid malignancies and other hematopoietic neoplasias [1,2].

Single locus studies have demonstrated that promoter CpG islands (CGIs) become aberrantly hypermethylated in MDS. These include genes involved in cell-cycle regulation, apoptosis, and other cellular pathways [3,4]. The hypermethylation of promoters and chromosomal anomalies are implicated in the malignant transition of MDS to acute myeloid leukemia (AML). These methylation patterns can be used to distinguish between hematologic malignancies and even subtypes of these malignancies [5,6,7]. Understanding how these alterations contribute to the etiology of MSD is fundamental to develop novel therapeutic interventions.

*Forkhead box O3a (FOXO3 or FOXO3a)*, a member of the forkhead class of transcription factors mapped in 6q21, plays a major role in the regulation of several essential cell functions. In addition, it is a tumor suppressor and is considered a novel target for cancer therapies, for example in leukemia [8,9]. However, no descriptions of *FOXO3* have been found in MDS.

In this pilot study we evaluated promoter DNA methylation of *FOXO3* in newly diagnosed MDS.

After approval of the Research Ethics Committee of FAMERP, a prospective study was conducted of bone marrow samples from 100 patients with newly diagnosed MDS. Subjects ranged in age from 3-83 years old ( $\bar{x} = 52.64$ ;  $\sigma = 18.39$ ), 46 were male and 54 were female. All of them were genetically unrelated and were recruited between 2009 and 2014 in the Hematology and Hemotherapy Service of Hospital de Base (São José do Rio Preto, São Paulo State, Brazil). After extraction, performed according to the technique described by Miller et al. (1998) [10], genomic DNA was treated with sodium bisulfite to modify unmethylated cytosine to uracil. After the DNA conversion, hypermethylation was determined by the methylation-specific polymerase chain reaction (MSP-PCR) method (Herman, 1996) [11] to analyze the methylation pattern of the gene. The primers were specific for methylated and unmethylated DNA (Table 1). We used a positive control in the reactions. PCR products were separated on silver-stained polyacrylamide gel to observe the amplified

segment (75bp) and all samples showed only unmethylated bands (non-methylated reaction = U + M-).

In this study there was no association between hypermethylation of the CpG islands studied and the promoter region of the *FOXO3* gene in MDS. However, the closest region is not always altered or responsible for silencing the gene. Regulatory regions may be located in more distant regions on the same chromosome or even on other chromosomes. This is one of the reasons for the paucity of data on epigenetic modifications with corresponding changes in gene expression in leukemia [8]. In this case, the complexity of chromatin architecture and gene regulation could explain the normal results in our cases even though the *FOXO3* gene is one of the most expressed in normal bone marrow [12]. Therefore, although our preliminary results suggest that *FOXO3* is not epigenetically silenced in MDS, further studies are needed before reaching a final conclusion. DNA methylation profiles and epigenome-wide association studies need to be performed to identify specific CpG sites associated with MDS.

## Reference

Yamazaki J, Issa JP: Epigenetic aspects of MDS and its molecular targeted therapy. *Inte J Hematol* 2013; 97(2):175-182.

Jeong M, Goodell MA: New answers to old questions from genome-wide maps of DNA methylation in hematopoietic cells. *Exp. Hematol* 2014; 42(8):609-17.

Santini V, Melnick A, Maciejewski JP, Duprez E, Nervi C, Cocco L, et al, Epigenetics in focus: Pathogenesis of myelodysplastic syndromes and the role of hypomethylating agents. *Crit Rev Oncol Hematol* 2013;88( 2):231-45.

Fong CY, Morison J, Dawson MA: Epigenetics in the hematologic malignancies. *Haematologica* 2014; 99(12): 1772-83.

Zhao X, Yang F, Li S, Liu M, Ying S, Jia X, Wang X: CpG island methylator phenotype of myelodysplastic syndrome identified through genome-wide profiling of DNA methylation and gene expression. *Br J Haematol* 2014; 165(5):649-58.

Meldi KM, Figueroa, ME: Epigenetic deregulation in myeloid malignancies. *Transl Res* 2015;165(1):102-114.

Butt AM, Feng D, Idrees M, Tong Y, Lu J: Computational Identification and Modeling of Crosstalk between Phosphorylation, *O*- $\beta$ -glycosylation and Methylation of FoxO3 and Implications for Cancer Therapeutics. *Int J Mol Sci* 2012; 13(3):2918-2938.

Calnan DR, Webb AE, White JL, Stowe TR, Goswami T, Shi X, et al, Methylation by Set9 modulates FoxO3 stability and transcriptional activity. *Aging* 2012; 4(7):462-479.

Nho, RS, HERGERT P: FoxO3a and disease progression. *World J Biol Chem* 2014; 5(3):346-54.

Miller SA, Dykes DD, Polesky HF: A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res* 1998; 16(3):1215.

Herman JG, Graff JR, Myöhänen S, Nelkin BD, Baylin SB: Methylation-specific PCR: a novel PCR assay for methylation status of CpG islands. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93(18):9821–9826.

Zhang L, Padron E, Lancet J: The molecular basis and clinical significance of genetic mutations identified in myelodysplastic syndromes. *Leuk Res* 2015; 39(1):6-17.

Table 4 Primer sequences used for MSP- PCR reaction of *FOXO3* gene.

<b>Methylated sequence</b>	<b>Foward: 5' TTGGGGCGGGGATTCGTTC 3'</b>
	<b>Reverse: 5'GCGACAACAACACAAAATTATAAACACACG 3'</b>
<b>Unmethylated sequence</b>	<b>Foward: 5' TGTTTAGTTTTTTTTTTGGGTGGGGATTTGTTTG 3'</b>
	<b>Reverse: 5'ACCACAACAACAACACAAAATTATAAACACACA 3'</b>

**APÊNDICE C – Artigo 3 a ser submetido a Genetics and Molecular Biology****Short Communication****Cytogenetic features of primary myelodysplastic syndrome: Analysis of 100 Brazilians Patients**

Paula C. Freitas<sup>1</sup>; Fernanda S. Monteiro<sup>1</sup>; Andréa B. Carvalho-Sales<sup>2</sup>; Octávio Ricci Jr<sup>3</sup>;  
Agnes C.Fett-Conte<sup>2</sup>.

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

<sup>2</sup>*Molecular Biology Department, Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto, (FAMERP/FUNFARME), Sao Paulo, Brazil.*

<sup>3</sup>*Medicine Department, Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto (FAMERP/FUNFARME), São Paulo, Brazil.*

**Short title: Cytogenetic in primary myelodysplasia**

Corresponding author:

Paula Curi de Freitas  
Av. Brigadeiro Faria Lima, 5544  
São José do Rio Preto-SP  
Brasil  
CEP:15090-000  
Phone: 55+17+32015000, 1931  
e-mail: paulacuri.bio@gmail.com

## **ABSTRACT**

Myelodysplastic syndromes (MDS) are clonal hematopoietic neoplasms characterized by bone marrow morphological dysplasia, failure resulting in ineffective hematopoiesis leading to blood cytopenia and a risk of progression to acute myeloid leukemia (AML). We described the frequency of cytogenetic abnormalities in 100 individuals diagnosed as primary MDS at the time of diagnosis using conventional karyotyping, 54 (54%) females and 46 (46%) males with median age of 53 years. A bone marrow sample was used for conventional cytogenetic analysis after a 24-h non-stimulated culture. Clonal chromosomal abnormalities were detected in seven (7%) cases and characterized as an interstitial deletion of the long arm of chromosome 5, monosomy 7, monosomy 22, deletion of the long arm of chromosome 20; complex karyotype and hypodiploid in two cases. All these findings could be related to the diagnoses and prognosis. We discuss the frequency of karyotypic abnormalities that was obtained, smaller than those previously described.

**Key words:** Myelodysplasia, karyotype, chromosomal alteration.



The myelodysplastic syndromes (MDS) are hematopoietic stem cell neoplasms that have a high risk of transforming into acute myeloid leukemia (AML). They display variable clinical features and a diverse set of cytogenetic, molecular, genetic and epigenetic lesions (Germing *et al.*, 2013; Ades *et al.*, 2014; Jhanwar, 2014; Neukirchen *et al.*, 2014; Nybakken and Bagg, 2014). They are generally diseases of older people; 85% of cases are diagnosed after the age of 60 years and less than 10% of the patients are younger than 50 years, although MDS are also recognized as causes of bone marrow failure in the pediatric setting (Adès *et al.*, 2014; Nybakken and Bagg, 2014). Pediatric MDS is an uncommon disorder, accounting for less than 5% of hematopoietic malignancies (Moriwaki *et al.*, 2014; Souza *et al.*, 2014).

The annual incidence of myelodysplastic syndromes is about four cases per 100,000 people (reaching 40-50 per 100,000 after the age of 70 years) and the prevalence is about seven cases per 100,000 individuals. They can be primary (*de novo*) or secondary to chemotherapy, radiation therapy, or immunosuppressive medications (Rashid *et al.*, 2014) however the etiology is known in only 15% of cases. (Germing *et al.*, 2013; Adès *et al.*, 2014). The overall survival (OS) of patients with MDS is approximately 2-3 years, ranging from <3 months to more than 10 years (Glauser *et al.*, 2013; Neukirchen *et al.*, 2014).

The classification system of MDS is based on the World Health Organization (WHO) criteria (2008), based on cytomorphologic features, bone marrow blast count, chromosomal findings and cell counts. The aim of the classification is to define MDS types with different prognoses (Vardiman 2012; Germing *et al.*, 2013; Neukirchen *et al.*, 2014).

Cytogenetic abnormalities are clinically helpful in establishing a diagnosis and to assist in determining prognosis and therapeutic options. Most prognostic systems, including the International Prognostic Scoring System (IPSS-R) and the WHO classification based on the Prognostic Scoring System (WPSS), use cytogenetics as an element in determining risk (Glauser *et al.*, 2013; Nybakken and Bagg, 2014).

In MDS, clonal chromosome abnormalities can be observed in 11 to >80% of patients depending on the MDS subtype and whether the disease is primary or mutagen induced. In the remaining patients, with a normal karyotype, there is now a growing body of evidence related to submicroscopic genetic and epigenetic alterations (Giagounidis and Haase, 2013).

The most frequent chromosomal abnormalities in MDS are del(5q), del(7q)/-7, +8, del(11q), del(12p), del(17p), del(20q), and loss of chromosome Y. Due to the pronounced cytogenetic heterogeneity however, it is impossible, over the long term, to determine the true incidence of rarer abnormalities. Emerging data are slowly clarifying the pathogenic roles of specific genes that fall within chromosomal lesions, but these remain largely unknown in the

majority of frequently-identified abnormalities (Giagounidis and Haase, 2013; Marshall and Roboz, 2013; Souza *et al.*, 2014).

In this study we described the cytogenetic data on 100 patients with primary MDS assessed using conventional karyotyping at the time of diagnosis.

After approval of the Research Ethics Committee of FAMERP, a prospective study was conducted of bone marrow (BM) samples from 100 newly diagnosed MDS patients. Subjects ranged in age from 3-83 years old ( $\bar{X} = 52.64$ ;  $\sigma = 18.39$ ), 46 were male and 54 female. All were genetically unrelated Brazilians and were recruited between 2009 and 2014 in the Hematology and Hemotherapy Service of Hospital de Base (São José do Rio Preto, São Paulo State, Brazil).

The diagnosis of MDS followed the WHO criteria revised in 2008 (Vardiman, 2012), and was conducted and confirmed by two hematologists, who independently analyzed the complete blood count, a BM smear, BM biopsy and complementary examinations of each case. Cases in which there was a necessity of long-term investigations for a conclusive diagnosis were excluded.

Regarding diagnosis, 46 cases had Refractory cytopenias with unilineage dysplasia (RCUD), 25 refractory anemia with excess blasts-2 (RAEB-2), 24 refractory anemia with excess blasts-1 (RAEB-1), three refractory anemia with ring sideroblasts (RARS), one MDS associated with isolated del(5q) and one had refractory cytopenia with unilineage dysplasia (RCUD). All patients were enrolled in the study prior to being submitted to chemotherapy or radiation treatment and informed consent was obtained.

BM was used for cytogenetic analysis after a 24-h non-stimulated culture in RPMI-1640 medium with 20% fetal bovine serum. Conventional cytogenetic analysis was performed on around 20 metaphases submitted to the GTG banding technique. The karyotype was described according to the International System for Human Cytogenetic Nomenclature (ISCN, 2013).

The karyotype was compatible with normal male or female karyotype (46,XY or 46,XX) in 93 (93%) of the cases, however seven cases (7%) had clonal chromosomal alterations (Table 1; Figure 1).

Case 1, initially diagnosed with MDS without a subtype designation, presented an isolated deletion of the long arm of chromosome 5 in nine (52.9%) of the 17 cells analyzed. Case 2 (RAEB 2) presented monosomy of chromosome 22 in three (18.75%) of the 16 analyzed cells. Hypodiploid cells with chromosome numbers ranging from 41 to 45 were found in eight (40%) cells of patient 3 (CRDM) and in six (30%) cells of patient 6 (CRDM).

Case 4 (RAEB-2), a 3-year-old patient, presented with chromosome 7 monosomy in all analyzed cells. Case 5 (RCMD) had a complex karyotype in six (30%) analyzed cells characterized by paracentric inversion of the long arm of chromosome 3, and deletions of the long arm of chromosome 5 and of the long arm of chromosome 11. In case 7 (RCMD) there was a deletion of the long arm of chromosome 20 in 12 cells (60%). All these cited alterations or normal karyotype may be related to the diagnosis and prognosis.

MDS are complex diseases in which the clinical heterogeneity has been linked to variable genetic alterations resulting in the final presentation of the disease. These alterations change the structure or gene expression (Raza and Galili, 2012; Ribeiro Jr *et al.*, 2014). Current models of pathogenic studies consider a process of several steps associated with the accumulation of changes in the genome. The molecular mechanisms involved in these processes are poorly understood (Garcia-Manero, 2014).

In this context, cytogenetic analysis with the use of different techniques is essential to investigate MDS, because not only can certain changes lead to knowledge of genes involved in disease development, but they are the only proven genetic markers and are routinely used for diagnosis and prognosis (Giagounidis and Haase, 2013; Schanz and Haase, 2014).

In this study, chromosomal changes were observed in 7% of the cases evaluated. According to the literature, a higher rate of about 80% should be expected. However, frequencies of 80% to 89% of cases without changes have also been described (Belli *et al.*, 2011; Bachera *et al.*, 2012; Giagounidis and Haase, 2013; Cao *et al.*, 2014).

The low frequency obtained with this sample may have occurred "randomly", or may be the result of technical limitations because the percentage of abnormal cells obtained from BM cultures is often lower than that achieved from normal cells, and preparations do not always have a resolution sufficient to detect minor changes. For example, Hemmat *et al.* (2014) described a submicroscopic deletion of 5q involving tumor suppressor genes (*CTNNA1*, *HSPA9*) and copy neutral loss of heterozygosity associated with *TET2* and *EZH2* mutations in a case of MDS with normal chromosome and FISH results.

Also, all patients were investigated at diagnosis, that is, at an early stage of disease development, and some chromosomal aberrations arise during its evolution or abnormal clones can even develop in patients with a previously normal BM karyotype (Arenillas *et al.*, 2013).

Another aspect is related to the fact that the frequency of karyotype changes is reduced in patients with low risk of progression to AML (Patnaik *et al.*, 2012; Burbury and

Westerman, 2013), the diagnosis of most of our cases. Moreover, peripheral cytopenias associated with morphological changes by themselves is no evidence of clonal disease and the lack of a reliable marker may impair the difficult diagnosis of MDS. For this, a period of observation of the patient and complementary tests are recommended to rule out differential diagnoses (Magalhães and Lorand-Metze, 2004), as were performed by the hematologists of these patients. Certainly, the difficulty of conclusive diagnosis of MDS and possible mistaken diagnoses were considered, however, this was refuted as all the WHO criteria were checked independently by two hematologists who arrived at conclusive diagnoses.

In MDS, the normal result of the karyotype, as observed in 93% of cases studied here, is a favorable prognostic factor. The absence of changes in the cytogenetic examination may result in less aggressive therapy. However, periodic cytogenetic evaluations of patients are recommended, particularly when there are changes in the clinical or laboratory features (Nybakken and Bagg, 2014).

The most common cytogenetic abnormality, 5q-, is detected in approximately 30% of MDS cases with karyotype changes. If observed as a single event, such as in case 1, the prognosis is generally good, however, if it is part of a complex karyotype, such as in case 5, the prognosis is significantly modified by the other changes (Komrokji *et al.*, 2013).

Of all the types of MDS, the pathogenesis of those associated with 5q- is the best understood. The interstitial deletion originating from hematopoietic stem cells promotes haploinsufficiency of a variable number of genes, according to the length of the deleted region. The shortest segment deleted encompasses about 40 genes. For example, haploinsufficiency of the RPS14 ribosomal subunit induces p53 and the proliferation and differentiation of erythroid cells, while haploinsufficiency of two microRNAs, miR-145 and miR-146a, results in dysmegakaryopoiesis and thrombocytosis (Ades *et al.*, 2014; Nybakken and Bagg, 2014). The prognosis for patients with del(5q) alone is considered good, unlike when this is associated to other changes. Four years after diagnosis, patient 1 remains under treatment/monitoring for MDS however one year ago, two years after diagnosis, case 5 started treatment for AML.

Monosomy 22 is considered a rare find in MDS. Musilova and Michalova (1988) observed this change in seven out of 57 cases with chromosomal abnormalities with every one being associated with other changes. Berger *et al.* (1992) observed the loss of chromosome 22 in three of 12 patients studied, but also as part of complex karyotypes, similar to a report by Li *et al.* (2009) involving six out of 351 chinese patients with primary MDS. Patient 2, four years after diagnosis, was stable and under treatment/monitoring for MDS.

The hypodiploidy that cases 3 and 6 presented is common in MDS. The random loss of significant chromosomal material is seen in this disease and is probably related to chromosomal instability. The prognosis of these patients is good due to the random character of the losses (Song *et al.*, 2012). The two cases showed no disease progression during the period of this study but remain under treatment/monitoring for MDS.

Generally, MDS are associated with unbalanced chromosomal abnormalities, such as specific losses of chromosomes (Garcia-Manero, 2014) as was observed in case 4, a three-year-old child. Until recently, due to lack of consensus on the diagnostic criteria of this disease in children, many patients with refractory anemia were not diagnosed early. As a result, some patients died due to complications (Chowdhry *et al.*, 2012; Rau *et al.*, 2012). Studies show that 30 to 50% of children with MDS present abnormal karyotypes with most being numerical changes; chromosome 7 monosomy, occurring in about one third of patients, is the most significant alteration (Chowdhry *et al.*, 2012; Rau *et al.*, 2012; Velloso *et al.*, 2013). Although this change is not formally associated with poor prognosis in children unlike adults, some studies have suggested earlier progression to AML (Rau *et al.*, 2012). Patient 4 had no progression of the disease and is under treatment/monitoring for MDS.

Complex karyotypes are defined by the simultaneous occurrence of at least three independent changes in the same cell; this occurs in approximately 30% of MDS patients with karyotypic abnormalities (Moriwaki *et al.*, 2014). These karyotypes may be the result of a multistep process that promotes accumulation of changes and worsening of the patient (Schanz *et al.*, 2012). They are related to poor prognosis in myeloid neoplasms (Germing *et al.*, 2013). Patient 5 had a complex karyotype which included 5q- and 11q-, which are common changes in MDS (Moriwaki *et al.*, 2014). This patient also presented the inversion of chromosome 3, which is rare, being found in only about 1% of cases, especially in those progressing to AML (Cui *et al.*, 2011). The patient progressed to AML and was submitted to chemotherapy. There were no previous descriptions of patients with MDS and these three clonal alterations together in the same cells, which characterizes the event as unprecedented.

The del(20q) is observed in 4% of cases of myelodysplasia. The prognosis in these cases is considered good (PAN *et al.*, 2014) and the survival of patients is described as considerably high. A model similar to 5q- haploinsufficiency can be observed in cases of del(20q). Deletion promotes the loss of the *L3MBTL1* gene located in q13, which encodes a protein associated with genomic instability. Similarly, as the *ASXL1* gene, responsible for regulating the conformation of chromatin through interactions with proteins of the Polycomb

repressive complex, is located at the break point, it is mutated in 10-20% of cases (Bacher *et al.*, 2013; Ades *et al.*, 2014; Jhanwar, 2014). Patient 7 had no progression of the disease.

In conclusion, cytogenetic analysis of bone marrow cells from newly diagnosed MDS patients is important to identify chromosomal alterations involved in the diagnosis, prognosis and progression of the disease as they affect the therapeutic choice. The frequency of these changes by conventional techniques varies between subjects and may be lower than commonly reported.

## References

- Adès L, Itzykson R and Fenaux P, (2014) Myelodysplastic syndromes. *Lancet* 388:2239-52.
- Arenillas L, Mallo M, Ramos F, Guinta K, Barragán E, Lumbreras E, Larráyo MJ, De Paz R, Tormo M, Abáigar M et al. (2013) Single Nucleotide Polymorphism Array Karyotyping: A Diagnostic and Prognostic Tool in Myelodysplastic Syndromes with Unsuccessful Conventional Cytogenetic Testing. *Genes Chromosome Cancer*, 52:1167-77.
- Bacher U, Haferlach T, Schnittger S, Zenger M, Meggendorfer M, Jeromin S, Roller A, Grossmann V, Krauth MT, Alpermann T et al (2013) Investigation of 305 patients with myelodysplastic syndromes and 20q deletion for associated cytogenetic and molecular genetic lesions and their prognostic impact. *Br J Haematol* 164:822-33.
- Berger R, Le Coniat M, Derré J and Flexor MA, (1992) Loss of chromosome 22 in patients with refractory anemia with excess of blasts (RAEB) in transformation and acute leukemia after RAEB. *Cancer Genet Cytogenet*, 61:210-212.
- Burbury KL and Westerman DA, (2013) Role of flow cytometry in myelodysplastic syndromes: diagnosis, classification, prognosis and response assessment. *Leuk Lymphoma*, 55:749-60.
- Chowdhry, M.; Makroo, R.N.; Srivastava, P. and Mishra, M. (2012) Refractory cytopenia of the childhood. *Indian Journal of Pathology & Microbiology*, 55:274-276.
- Cui W, Sun J, Cotta CV, Medeiros LJ and Lin P (2011) Myelodysplastic Syndrome With inv(3)(q21q26.2) or t(3;3)(q21;q26.2) Has a High Risk for Progression to Acute Myeloid Leukemia. *American Journal of Clinical Pathology* 136:282-288.
- Garcia-Manero G, (2014) CME Information: Myelodysplastic syndromes: 2014 update on diagnosis, risk-stratification and management. *Am J Hematol* 89:97-108.
- Germing U, Kobbe G, Haas R and Gattermann N, (2013) Myelodysplastic Syndromes: Diagnosis, Prognosis, and Treatment. *Dtsch Arztebl Int* 110:783-90.
- Giagounidis A and Haase D, (2013) Morphology, cytogenetics and classification of MDS. *Best Pract Res Clin Haematol* 26: 337-53.

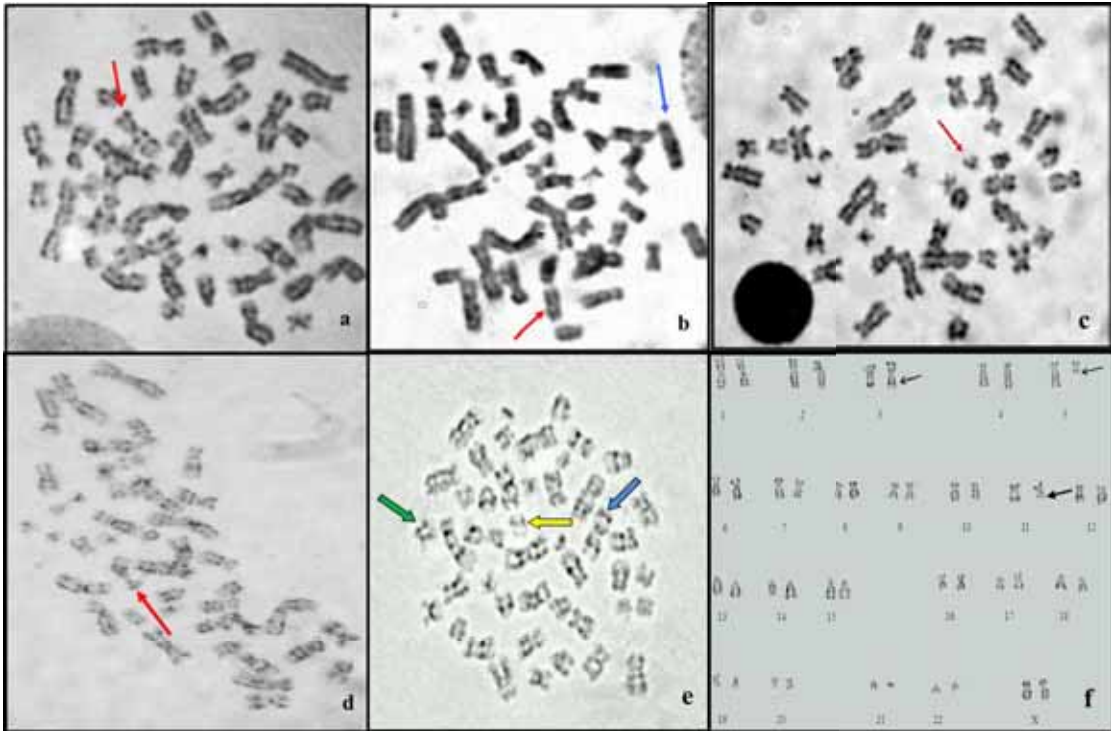
- Glauser TA, Sagatys EM, Williamson JC, Burton BS, Berger C, Merwin P, Sugrue M, Bennett JM et al, (2013) Current pathology practices in and barriers to MDS diagnosis. *Leuk Res* 37:1656-61.
- Hemmat M, Chen W, Anguiano A, Naggar ME, Racke FK, Jones D, Wang Y, Strom CM, Chang K and Boyar FZ, (2014) Submicroscopic deletion of 5q involving tumor suppressor genes (CTNNA1, HSPA9) and copy neutral loss of heterozygosity associated with TET2 and EZH2 mutations in a case of MDS with normal chromosome and FISH results. *Mol Cytogenet* 7:35.
- INTERNATIONAL SYSTEM FOR HUMAN CYTOGENETIC NOMENCLATURE. ISCN 2013: An International System for Human Cytogenetic Nomenclature. Farmington: Karger, B. S.
- Jhanwar SC, (2014) Genetic and epigenetic pathways in myelodysplastic syndromes: A brief overview. *Adv Biol Regul.*, 4926:60-8.
- Komrokji RS, Padron E, Ebert BL and List AF, (2013) Deletion 5q MDS: Molecular and therapeutic implications. *Best Pract Res Clin Haematol* 26:365-75.
- Li L, Liu XP, Nie L, Yu MH, Zhang Y, Qin TJ, and Xiao ZT, (2009) Unique cytogenetic features of primary myelodysplastic syndromes in Chinese patients. *Leukemia research*, 33:1194- 1198.
- Marshall D and Roboz GJ, (2013) Standardizing the Initial Evaluation for Myelodysplastic Syndromes, *Curr Hematol Malig Rep*, 8:361-9.
- Moriwaki K, Manabe A, Taketani T, Kikuchi A, Nakahata T and Hayashi Y (2014) Cytogenetics and clinical features of pediatric myelodysplastic syndrome in Japan. *Int J Hematol* 100: 478-84.
- Musilova J and Michalova K, (1988) Chromosome study of 85 patients with myelodysplastic syndrome. *Cancer Genet Cytogenet*, 33:39-50.
- Neukirchen J, Lauseker M, Blum S, Giagounidis A, Lübbert M, Martino S, Siragusa S, Schlenk RF, Platzbecker U, Hofmann WK et al, (2014) Validation of the revised International Prognostic Scoring System (IPSS-R) in patients with myelodysplastic syndrome: A multicenter study. *Leuk Res* 38:57-64.
- Nybakken GE and Bagg A (2014) The Genetic Basis and Expanding Role of Molecular Analysis in the Diagnosis, Prognosis, and Therapeutic Design for Myelodysplastic Syndromes. *J Mol Diagn* 16:145-58.
- Pan J, Wu C, Xue Y, Qiu H, Chen S, Zhang J, Bai S, Wu Y, Wang Y, Shen J et al, (2014) The characteristics and prognostic analysis in 213 myeloid malignancy patients with del(20q): a report of a single-center case series. *Cancer Genet* 207:51-6.
- Patnaik MM, Hanson CA, Hodnefield JK, Knudson J, Van Dyke DL and Tefferi A. (2011) Monosomal karyotype in myelodysplastic syndromes, with or without monosomy 7 or 5, is prognostically worse than an otherwise complex karyotype. *Leukemia*, 25:266–270.

- Rashid A, Khurshid M, Shaikh U and Adil S (2014) Chromosomal Abnormalities in Primary Myelodysplastic Syndrome. *J Coll Physicians Sugar Pak* 24: 632-5.
- Rau AT, Shreedhara AK and Kumar, S (2012) Myelodysplastic syndromes in children: where are we today? *The Ochsner Journal* 12:216-220.
- Song LX, Guo J, He Q, Yang LP, Gu SC, Zhang X, Wu LY, Li X and Chang CK (2012) Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells in Myelodysplastic Syndromes: Cytogenetic Characterization. *Acta Haematol.* 128:170-7.
- Souza DC, Fernandez CS, Camargo A, Apa AG, Costa ES, Bouzas LF, Abdelhay E and Fernandez TS (2014) Cytogenetic as an Important Tool for Diagnosis and Prognosis for Patients with Hypocellular Primary Myelodysplastic Syndrome, *Biomed Res Int* 542395.
- Vardiman J (2012) The classification of MDS: From FAB to WHO and beyond. *Leuk Res* 36:1453-8.
- Velloso, E.D.R.P.; Chauffaille, M.L.; Pelicario, L.M.; Tanizawa, R.S.S.; Toledo, S.R.C.; Gaiolla, R.D. and Lopes L.F. (2013) Cytogenetic studies of Brazilian pediatric myelodysplastic syndrome cases: challenges and difficulties in a large and emerging country. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 1:85-90.

**Table 5 Clonal chromosome changes observed in each case.**

Case	Karyotype
1	46,XX,del(5)(pter→q31:)[9]/46,XX[8]
2	45,XY,-22[3]/46,XY[13]
3	41~45,XY[8]/46,XY[12]
4	45,XX,-7[20]
5	41~46,XX,inv(3)(q21q27),del(5)(q13), del(11)(q14)[6]/46,XX[15]
6	43~45,XX[6]/46,XX[14]
7	46,XY,del(20)(pter→q11:)[12]/46,XY[8]





**Figure 1:** Metaphases submitted to GTG banding technique: (a) monosomy of chromosome 7 of case 4; (b) 5q- (red arrow) and normal chromosome 5 (blue arrow) of case 1; (c) monosomy of chromosome 22 of case 2; (d) 20q- observed in case 7; (e) complex karyotype of case 5 – inv(3) (blue arrow), 5q- (green arrow) and 11q- (yellow arrow) and (f) cariogram of case 5 with the complex karyotype, the arrows indicate the changes cited in (e).