

Paula Curi de Freitas

**ANÁLISE CITOGENÉTICA E MOLECULAR DO
GENE *FOXO3* EM SÍNDROME MIELODISPLÁSICA**

**Dissertação apresentada para
obtenção do Título de Mestre
em Genética.**



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

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA

Paula Curi de Freitas

ANÁLISE CITOGENÉTICA E MOLECULAR DO GENE *FOXO3* EM SÍNDROME MIELODISPLÁSICA

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da UNESP de São José do Rio Preto, para a obtenção do Título de Mestre em Genética.

Orientadora: Profa. Dra. Agnes Cristina Fett Conte

São José do Rio Preto - SP

Freitas, Paula Curi de.

Análise citogenética e molecular do gene *FOXO3* em síndrome mielodisplásica / Paula Curi de Freitas. - São José do Rio Preto : [s.n.], 2011.

74 f. : il. ; 30 cm.

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

1. Biologia molecular. 2. Citogenética humana. 3. Câncer – Aspectos genéticos. 4. Síndromes mielodisplásicas. I. Fett-Conte, Agnes Cristina. II. Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas. III. Título.

CDU – 616.155.392

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

Paula Curi de Freitas

**ANÁLISE CITOGENÉTICA E MOLECULAR DO GENE
FOXO3 EM SÍNDROME MIELODISPLÁSICA**

Banca examinadora:

Titulares

Orientadora: Profa. Dra. Agnes Cristina Fett Conte

Profa. Dra. Cleide Largman Borovik

Profa. Dra. Cláudia Regina Bonini Domingos

AGRADECIMENTOS

Desejo expressar os meus sinceros agradecimentos:

À Deus.

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

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

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

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 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 e a Silvia Helena Pereira Nunes pelo auxílio técnico no final do sequenciamento.

A Profa. Eloiza Tajara por “ abrir as portas do seu laboratório” para a realização dos procedimentos moleculares iniciais.

A Andrea Salles, pela paciência no início do projeto, por todos os casos de citogenética corrigidos e principalmente pela comemoração junto comigo após cada caso analisado corretamente, me incentivado sempre.

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

Aos amigos de laboratório Adriana Barbosa, Ana Luiza Martins, Camila Oliveira e Carlos Fabián Mendiburu e a todos os amigos da graduação e pós-graduação, pelos momentos juntos, as experiências compartilhadas, e toda a ajuda durante esses anos.

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

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

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

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

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

Há, verdadeiramente, duas coisas diferentes: saber e crer que se sabe. A ciência consiste em saber; em crer que se sabe está a ignorância." (Hipócrates / médico grego 460-377 a.C)

RESUMO

Síndromes Mielodisplásicas (SMD) compreendem um conjunto heterogêneo de doenças hematopoéticas caracterizadas por hematopoese ineficaz, que geralmente apresentam citopenias no sangue periférico, medula óssea hiperclular, diferenciação celular displásica e propensão ao desenvolvimento de leucemia mielóide aguda. São classificadas em oito tipos e a incidência anual é estimada entre dois e 12 casos por 100.000 pessoas da população em geral e em até 50 casos por 100.000 indivíduos com idades superiores a 60 anos. A análise cromossômica das células da medula óssea dos doentes ao diagnóstico detecta alterações diretamente relacionadas com o prognóstico em aproximadamente 50% dos casos. Alguns genes também foram relacionados à etiologia e prognóstico das mielodisplasias. O gene *FOXO3*, um supressor de tumor, embora não estudado anteriormente em SMD, é um dos genes que mais se expressam no tecido hematopoético normal. Alterações neste gene poderiam resultar em hematopoese anormal, pois já foram relacionadas a outros tipos de câncer, com mutações descritas no éxon 1. O objetivo deste trabalho foi estudar células da medula óssea de doentes com SMD de qualquer tipo, ao diagnóstico, para investigar a presença de alterações cromossômicas e de mutações no éxon 1 do *FOXO3*. A análise citogenética foi realizada em metáfases submetidas ao bandamento GTG, obtidas de culturas de curta duração de células da medula, sem estimulação mitogênica. Para a análise molecular foi extraído o DNA, realizada a amplificação gênica pela Reação em Cadeia da Polimerase e realizado o sequenciamento direto do éxon 1. Entre os 25 casos analisados, três (12%) apresentaram alterações cromossômicas clonais isoladas: deleção intersticial do braço longo do cromossomo 5; monossomia do cromossomo 21 e monossomia do cromossomo 22. Todas puderam ser relacionadas ao diagnóstico e/ou prognóstico dos doentes. Não foram detectadas mutações no éxon 1, mas sim o polimorfismo 159C>T em 10 (41,7%) de 24 doentes e em 07 (29,2%) dos 24 controles saudáveis, o que não diferiu estatisticamente. Portanto, a análise citogenética em SMD é muito importante, com implicações diretas no manuseio clínico. Mutações no éxon 1 do *FOXO3* e o polimorfismo 159C>T não parecem estar relacionados com a SMD. Este último, inclusive, parece ser um achado comum na população em geral. Entretanto, o significado da frequência deste polimorfismo entre os pacientes merece ser melhor investigado em outros grupos de doentes antes de se descartar uma possível relação entre ele e a etiopatogenia da SMD.

Palavras-chave: Síndromes Mielodisplásicas, alterações cromossômicas, gene *FOXO3*.

ABSTRACT

Myelodysplastic syndrome (MDS) constitute a heterogeneous group of hematopoietic diseases characterized by ineffective hematopoiesis usually with peripheral blood cytopenia, hypercellular bone marrow, dysplastic differentiation and a tendency to evolve to acute myeloid leukemia. They are classified in eight categories by the World Health Organization. The annual incidence is estimated at between two and 12 cases per 100,000 individuals in the general population and up to 50 cases per 100,000 of over 60-year olds. A chromosomal analysis of bone marrow cells at diagnosis identifies changes directly related to prognosis in approximately 50% of cases. Additionally, some genes are also associated to the etiology and prognosis of myelodysplasia. Although not previously studied in respect to MDS, a tumor suppressor, *FOXO3*, is one of the most commonly expressed genes in normal hematopoietic tissue. Changes in this gene could therefore result in abnormal hematopoiesis, as mutations described in exon 1 have already been associated with other types of cancer. The aim of this study was to investigate chromosomal alterations and mutations in exon 1 of *FOXO3* in bone marrow cells from patients diagnosed with any type of MDS. Cytogenetic analysis was performed on metaphases submitted to GTG banding, obtained from short-term cultures of bone marrow cells without mitogenic stimulation. To evaluate mutations in the *FOXO3* gene, DNA was extracted from the bone marrow, gene amplification was achieved by polymerase chain reaction and direct sequencing was performed. Of the 25 cases analyzed, three (12%) showed clonal chromosomal abnormalities in isolation characterized as the interstitial deletion of the long arm of chromosome 5, monosomy 21 and monosomy 22. All were correlated to the diagnosis and/or prognosis of patients. No mutations were detected in exon 1, but the 159C>T polymorphism was detected in 10 (41.7%) of 24 patients and in 7 (29.2%) of 24 healthy controls (not statistically significant). Hence, the cytogenetic analysis of bone marrow cells of individuals with these diseases is very important with direct implications on clinical management. Mutations in exon 1 of *FOXO3* and the 159C>T polymorphism do not appear to be associated with MDS. The latter even appears to be a common finding in the general population. However, the significance of the frequency of this polymorphism among patients requires further investigation in other groups of patients before excluding a possible relationship between it and MDS.

Keywords: Myelodysplastic Syndrome, chromosomal abnormalities, *FOXO3* gene.

SUMÁRIO

1	Introdução.....	12
2	Objetivos.....	20
3	Material e Métodos.....	22
3.1	Casuística.....	22
3.2	Métodos.....	24
3.2.1	Obtenção de Células da Medula Óssea e Cultivo Celular.....	24
3.2.2	Análise Citogenética.....	24
3.2.3	Estudo Molecular.....	25
3.2.3.1	Extração de DNA	25
3.2.3.2	Amplificação do Éxon 1 do Gene <i>FOXO3</i>.....	26
3.2.3.3	Eletroforese em Gel de Agarose.....	28
3.2.3.4	Purificação dos Produtos de PCR para Sequenciamento.....	28
3.2.3.5	Sequenciamento Automático.....	29
4	Resultados.....	32
4.1	Análise Cromossômica.....	32
4.2	Análise Molecular.....	36
5	Discussão.....	45
6	Conclusões Preliminares	52
7	Referências	54
	Apêndice A - Artigo.....	61
	Anexo A - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.....	66

Lista de Figuras

Figura 1. Ação do gene <i>FOXO3</i> no núcleo e citoplasma.....	17
Figura 2. Metáfases submetidas à técnica de bandamento GTG do paciente 7. A seta vermelha indica o cromossomo 5 deletado e a seta azul o cromossomo 5 normal.....	34
Figura 3. Metáfases submetidas à técnica de bandamento GTG do paciente 9, com monossomia do cromossomo 22. A seta mostra o único cromossomo 22 presente.....	35
Figura 4 Metáfases do paciente 19 com monossomia do cromossomo 21. Setas indicam o único cromossomo do par.....	37
Figura 5. Perfil eletroforético em gel de agarose a 2% correspondente a amplificação do éxon 1 do gene <i>FOXO3</i> nas colunas 2-7. A coluna 8 representa o controle negativo e a 1 a marcação com <i>Ladder</i> de 100pb	39
Figura 6. Eletroferograma parcial das sequências do éxon 1 do gene <i>FOXO3</i> analisadas no programa DS Gene 2.0 (Accelrys, USA).....	40
Figura 7. Eletroferograma parcial das sequências do éxon 1, destacado a posição 159 com a presença da citosina como na sequência de referência ...	41
Figura 8. Eletroferograma parcial das sequências do éxon 1, destacado a posição 159 com a presença da timina, evidenciando a substituição C>T	42
Figura 9. Identificação das formas de polimorfismos encontradas nos pacientes com SMD.....	42

Lista de Tabelas

Tabela 1. Classificação e manifestações no sangue periférico e na medula óssea das Síndromes Mielodisplásicas, segundo a Organização Mundial da Saúde.....	13
Tabela 2. Sistema Internacional de Pontuação de Prognóstico (IPSS) de acordo com os achados cariotípicos.....	15
Tabela 3. Caracterização da casuística quanto a idade (em anos), sexo e diagnóstico (tipo de SMD).)	23
Tabela 4. Condições de reação utilizadas para a amplificação do éxon 1.....	27
Tabela 5. Programa de amplificação utilizado para os <i>primers</i> do éxon 1 do gene <i>FOXO3</i>	28
Tabela 6. Dados dos <i>primers</i> utilizados para o sequenciamento direto.....	30
Tabela 7. Condições para amplificação para reação de sequenciamento do éxon 1 do gene <i>FOXO3</i>	30
Tabela 8. Resultados dos procedimentos realizados em cada caso.....	33
Tabela 9. Caracterização da sequência polimórfica do éxon 1 do gene <i>FOXO3</i>	38

1. INTRODUÇÃO

Síndrome Mielodisplásica (SMD) é uma designação utilizada para definir um conjunto heterogêneo de doenças hematopoéticas. São displasias das células da medula óssea (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, em hemorragia (trombocitopenia), infecções (neutropenia), anemias, medula óssea hiperclular, diferenciação celular anormal e possibilidade de evoluir para Leucemia Mielóide Aguda (LMA). A etiologia, especialmente a base molecular destas doenças, permanece desconhecida (PFEILSTÖCKER et al., 2007; RIA et al., 2009; BARZI, SEKERES, 2010; ORTEGA, KOMROKJI, LIST, 2011; GATTERMANN, RACHMILEWITZ, 2011).

A incidência das SMD aumenta com a idade, o que é frequente nas doenças das células da MO (SHADDUCK et al., 2007). Atinge cerca de 2 a 12 casos por 100.000 pessoas, considerando-se todas as faixas etárias, e até 50 casos por 100.000 entre aquelas com idades superiores a 60 anos (COREY et al., 2007; JÄDERSTEN, HELLSTRÖM-LINDBERG, 2009; ORTEGA, KOMROKJI, LIST, 2011).

A SMD foi descrita pela primeira vez em 1.900 por Leube como “leukanamie” (anemia progressiva para leucemia aguda), que acreditou ter etiologia infecciosa. Muitas décadas depois, foram relatados pacientes que desenvolveram leucemia aguda depois de terem anemia macrocítica e foram descritas as características clínicas mais comuns. O diagnóstico de “pré-leucemia” foi utilizado até o início dos anos 70, mas muitos pacientes não evoluíam para leucemia aguda e iam a óbito por complicações das citopenias. Foi, então, introduzido o termo síndrome mielodisplásica, que é aceito até o presente (MALCOVATI, NIMER, 2008).

As SMD são classificadas pela Organização Mundial da Saúde (OMS) em oito tipos: Anemia Refratária (AR); Anemia Refratária com Sideroblastos em Anel (ARSA); Citopenia Refratária com Displasia de Multi-Linhagem (CRDM); Citopenia Refratária com Displasia Multi-Linhagem com Sideroblastos em Anel (CRDM-SA); Anemia Refratária com Excesso de Blastos 1 (AREB-1); Anemia Refratária com Excesso de Blastos 2 (AREB-2); SMD sem classificação e SMD Associada com del(5q) (Tabela 1) (MALCOVATI, NIMER, 2008; RIA et al., 2009). Também são denominadas primárias ou *de novo* e secundárias. Estas últimas são originadas a partir do tratamento de outras doenças, realizado com quimioterapia e/ou radioterapia.

Tabela 1. Classificação e manifestações no sangue periférico e na medula óssea das Síndromes Mielodisplásicas, segundo a Organização Mundial da Saúde.

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

Os fatores de risco são desconhecidos, mas entre os sugeridos estão à exposição ao benzeno, a outros solventes, ao óleo diesel, a pesticidas e a fumaças, além do uso de imunossupressores (COREY et al., 2007; NIMER, 2008; BARZI, SEKERES, 2010).

A análise citogenética das células displásicas da MO é determinante para a patogênese, diagnóstico, prognóstico e escolha terapêutica em SMD, além de permitir o entendimento dos mecanismos biológicos envolvidos e poder caracterizar a evolução clonal da doença (NIMER, 2008; POZDNYAKOVA, 2008).

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 análise citogenética também pode ser usada para monitorar a frequência das células clonais na MO, ou seja, a resposta terapêutica (HAASE et al., 2007; JÄDERSTEN, HELLSTRÖM-LINDBERG, 2009; WANG et al., 2010).

Os afetados possuem prognóstico amplamente variável, que também depende das anomalias cromossômicas, alterações gênicas e alterações epigenéticas observadas. É considerado de risco alto ou de risco baixo de acordo com a probabilidade de transformação para LMA. Os indivíduos com risco baixo sobrevivem em torno de três a sete anos após o diagnóstico, enquanto aqueles com risco alto são considerados patologicamente semelhantes aos que têm LMA, pois podem desenvolver essa doença ou evoluir para óbito por complicações da SMD, com sobrevida em torno de 1,5 anos (MIHARA, TAKIRA, KIMURA, 2007; BARZI, SEKERES, 2010).

O Sistema Internacional de Pontuação de Prognóstico (IPSS) é utilizado para medir a probabilidade de sobrevivência e risco para a progressão de LMA em pacientes sem tratamento e auxilia nas decisões terapêuticas, baseia-se nos dados do cariótipo, citopenia e no percentual de blastos encontrados na MO (RIA et al., 2009). A Tabela 2 apresenta a classificação do prognóstico pelo IPSS com base no cariótipo.

Ao contrário do que ocorre na maioria das neoplasias hematológicas malignas, com translocações cromossômicas balanceadas que resultam em mutações dominantes e ativação de oncogenes, as anomalias cromossômicas encontradas em SMD geralmente consistem em deleções, perdas e ganhos de cromossomos inteiros, que promovem alteração da dosagem gênica. As mais frequentemente observadas incluem del(5q), del(7q), -7, +8, del(11q), del(12p), del(20q) e -Y, além de alterações variadas dos cromossomos 1 e 3. Tais alterações

podem contribuir para o surgimento ou desenvolvimento de doenças por hiperexpressão ou hipoexpressão de genes importantes, pela perda da heteroziguidade e haploinsuficiência, que estão relacionados com a inativação de genes supressores tumorais. Como as translocações são mais raramente observadas, a ativação de oncogenes parece ser menos relevante e o mecanismo molecular principalmente envolvido nas SMD provavelmente é a perda ou inativação de genes supressores de tumor (HAASE, 2008; LI et al., 2010).

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

Fator	Valor Prognóstico	Cariótipo
Citogenético	Bom	Normal; -Y isolado; 5q- isolado; 20q- isolado
	Intermediário	Outras alterações (até duas) que não boas ou ruins
	Ruim	Complexo; três ou mais alterações; alterações no cromossomo 7

Comparadas às leucemias, as mielodisplasias são muito pouco conhecidas quanto ao aspecto molecular, mas já foram descritas mutações em alguns genes, incluindo o *RAS*, um oncogene envolvido na regulação do crescimento e diferenciação celular, o *TET2*, um outro oncogene relacionado com regulação da transcrição, o *Runx1*, um supressor tumoral responsável pelo desenvolvimento normal da hematopoese e o *JAK2*, um oncogene que codifica uma proteína tirosina-quinase, fosforilada em resposta à ação de diversas citocinas, que ativa diferentes vias de sinalização intracelular e participa do processo de transdução de sinal (ISSA, 2010, JEKARL et al, 2010).

Também foi relatado um polimorfismo relacionado à predisposição a SMD. Este ocorre na região promotora do gene da eritropoietina (EPO) e está envolvido no controle da produção eritróide e de outras células hematopoéticas. 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 gênica. Sua presença ou ausência pode auxiliar na estimativa da probabilidade de sobrevivência e de risco para a progressão de LMA em pacientes sem tratamento (MA et al, 2010).

Um gene que tem despertado interesse científico quanto à sua participação em processos neoplásicos é o *FOXO3*. Há várias descrições sobre sua participação em neoplasias

humanas, como no câncer de mama, próstata, glioblastoma, câncer de ovário e leucemias (YANG et al., 2010; WEIDINGER, KRAUSE, FUHRER, 2011). Contudo, não há estudos sobre sua ação em SMD, embora se saiba que o tecido hematopoético seja um dos tecidos onde mais este gene se expressa (TOTHOVA, GILLILAND, 2007).

Um estudo recente 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 hipoexpressão (MENDIBURU, comunicação pessoal).

O gene *FOXO3* é um supressor de tumor. Está mapeado em 6q21 e tem três éxons e 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*”. Estes fatores estão envolvidos em várias vias de sinalização e desempenham papéis críticos em uma série de processos fisiológicos e patológicos (SHIOTA et al., 2010).

FOXO3 desencadeia, por exemplo, a apoptose modulando a expressão de outros genes envolvidos neste processo. Sua expressão aumentada é observada não só no sistema hematopoético, mas em muitos outros locais, como no tecido adiposo, cérebro e coração (TOTHOVA, GILLILAND, 2007; WEIDINGER, KRAUSE, FUHRER, 2011).

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 (fosfoinositide-3-quinase) e consequentemente 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)*, *ciclina D*, *Bim*, *Fas ligand*, e *Bcl-X_L*, que são importantes para a proliferação, morte e diferenciação celular (MIYAMOTO, 2007; JAGANI et al., 2007; ZUNA et al., 2009; HUI, 2008; SAKOE et al., 2010).

Na ausência de fatores de crescimento, as proteínas FOXO não são fosforiladas, 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 1 apresenta o mecanismo biológico de ação do gene *FOXO3* conforme descrito anteriormente (MIYAMOTO, 2007; JAGANI et al., 2007; ZUNA et al., 2009; HUI, 2008; SAKOE et al., 2010).

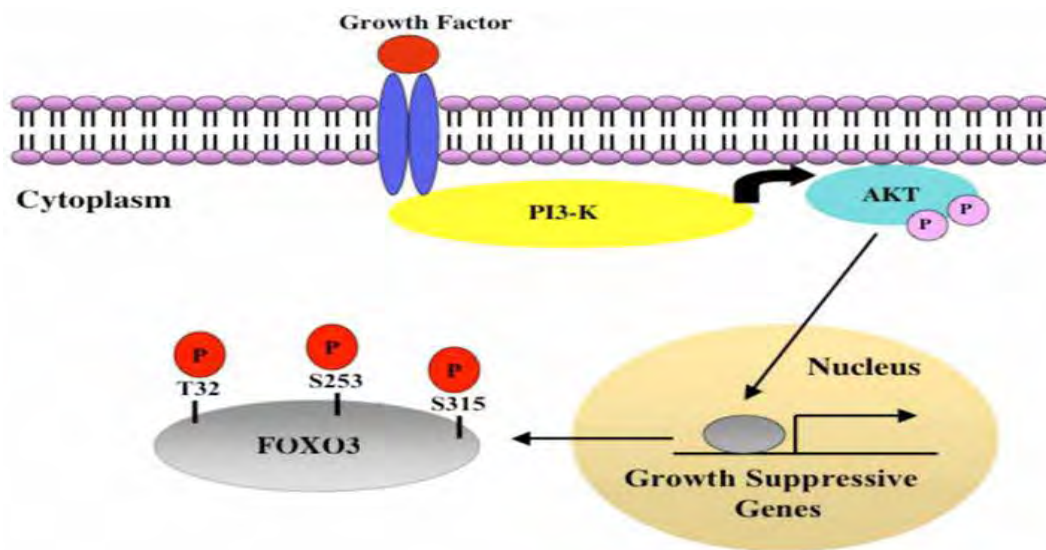


Figura 1. Ação do gene *FOXO3* no núcleo e citoplasma. (JAGANI et al., 2007).

Mais recentemente, foi relatado que *FOXO3* desempenha um papel importante na manutenção de um *pool* de células-tronco hematopoéticas pela modulação da resposta fisiológica ao estresse oxidativo (SHIOTA et al., 2010; SAKOE et al., 2010).

Interessante também é que algumas mutações no *FOXO3* já foram relacionadas com falência ovariana precoce. Wang e colaboradores (2010) encontraram cinco mutações não sinônimas em pacientes [71C>A (p.Pro24His), 140C>T (p.Pro47Leu), 184G>A (p.Asp62Asn), 1652C>T (p.Ser551Phe) e 1697C>G (p.Gly566Ala)], as três primeiras localizadas no éxon 1 e nenhuma delas encontrada nos controles.

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., 2007; YANG et al., 2010). Pode ser um gene candidato ao envolvimento na etiologia e evolução de mielodisplasias.

A hipótese científica testada no presente estudo foi que em SMD podem ser observadas alterações cromossômicas que podem influenciar o diagnóstico e esclarecer o prognóstico e que o éxon 1 do gene *FOXO3* apresenta mutações ou polimorfismos que podem estar relacionados à etiologia destas doenças.

2. OBJETIVOS

Geral

Investigar o cariótipo e o éxon 1 do gene *FOXO3* de células da medula óssea de indivíduos com Síndrome Mielodisplásica ao diagnóstico.

Específicos:

- 1- Analisar a presença de alterações cromossômicas nas células da medula óssea de pacientes com SMD ao diagnóstico, por bandamento GTG;
- 2- Avaliar a presença de mutações no éxon 1 do gene *FOXO3*, por sequenciamento direto, nas células da medula óssea de pacientes com SMD ao diagnóstico;
- 3- Relacionar os achados cariotípicos e moleculares com o diagnóstico e prognóstico.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 - Casuística

Este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto (FAMERP) (Protocolo nº5580/2009). Após a obtenção do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (Anexo A), pela própria autora, foram estudados, de maneira prospectiva, amostras da MO de 25 pacientes, com diagnóstico de Síndrome Mielodisplásica de qualquer tipo, de acordo com a classificação da OMS, realizada por hematologistas, ao diagnóstico, sem tratamento prévio para esta doença, atendidos no Serviço de Hematologia e Hemoterapia do Hospital de Base de São José do Rio Preto (HB-FAMERP/FUNFARME).

Entre os indivíduos estudados, 14 (56%) eram do sexo masculino e 11 (44%) do sexo feminino. As idades variaram de 22 a 78 (\bar{x} = 53,96 anos; DP=16,28). Quanto ao diagnóstico, 15 (60%) apresentavam AREB-2, 05 (20%) AREB-1, 03 (12%) CRDM, 01 (4%) SMD Associada com del(5q) e 01 (4%) ARSA.

A Tabela 3 apresenta a caracterização da casuística quanto ao sexo, idade e diagnóstico.

Para avaliação de uma alteração molecular detectada no grupo de estudo, foram analisadas amostras de DNA do sangue periférico de um grupo controle constituído por 24 doadores saudáveis de sangue atendidos no Hemocentro (HB) de São José do Rio Preto.

As amostras de MO e amostra de sangue periférico (utilizada para o estudo molecular em um caso), dos doentes, foram obtidas de partes daquelas utilizadas nos procedimentos médicos hematológicos de rotina, aos quais os pacientes são necessária e rotineiramente submetidos. Portanto, não houve necessidade de punções ou procedimentos adicionais para atender aos objetivos deste projeto. Os resultados obtidos foram entregues diretamente para os hematologistas e sua aplicação clínica ou não ficou a critério da equipe médica.

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

Paciente	Idade	Sexo	Diagnóstico
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	SMD com 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	47	M	AREB 2
20	34	M	AREB 2
21	49	F	CRDM
22	41	F	AREB1
23	67	F	AREB2
24	57	F	AREB2
25	69	F	AREB2

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; SMD com 5q-= SMD Associada com del de 5q; ARSA= Anemia Refratária com Sideroblastos em Anel.

3.2 – Métodos

3.2.1. Obtenção de Células da Medula Óssea e Cultivo Celular

A coleta do material do osso esterno ou ilíaco, ou do sangue periférico, por punção aspirativa com seringa, foi realizada pela própria equipe médica, de acordo com critérios do protocolo utilizado pelo Serviço de Hematologia e Hemoterapia, em procedimento de rotina realizado para diagnóstico hematológico. Uma parte das amostras coletadas foi enviada para o Laboratório de Genética (HB-FAMERP/FUNFARME) para o estudo citogenético e molecular.

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 5,0 ml de meio RPMI 1640, 2,0 ml de soro fetal bovino, 02 gotas de estreptomicina (100U/ml), 04 gotas de penicilina (100U/ml) e 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 1.000rpm 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 1.000rpm, 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.

3.2.2. Análise Citogenética

A análise citogenética convencional foi realizada em metáfases submetidas à técnica de bandamento GTG segundo GROUCHY & TURLEAU (1984), com modificações.

O material fixado nas lâminas foi tratado em solução de tripsina (60 mL de PBS e aproximadamente 0,12g de tripsina) a 27°C, por um tempo variável de 02 a 15 segundos. Em

seguida, foi lavado em PBS por 01 minuto, corado com solução tamponada de Giemsa a 2% por 05 minutos e lavado em água.

Pelo menos 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.

Para esclarecimento do achado observado nas células de um dos casos, foram também analisados núcleos interfásicos da MO submetidas à técnica de Fluorescence *in situ* Hybridization (FISH). Foi utilizada a sonda MYH11 (16p13.1) *breakpoint region probe two colour direct labelled probe* (Aquarius - Cytocell). A técnica foi realizada segundo as instruções do fabricante e procedimento padrão do Laboratório de Genética (HB-FUNFARME), com a colaboração da Profa. Dra. Cristina Benitez Vendrame.

As alterações cariotípicas foram descritas conforme a nomenclatura padrão contida em *International System for Human Cytogenetic Nomenclature* (ISCN, 2009) e documentadas em fotografias.

3.2.3 Estudo Molecular

Após a extração do DNA das células da MO em 23 casos e do sangue periférico em 01 caso (caso 7) pela técnica *salting-out*, o gene *FOXO3* foi amplificado com a utilização da técnica de Reação em Cadeia da Polimerase (*Polymerase Chain Reaction - PCR*) e sua sequência foi determinada por sequenciamento direto. A sequência obtida foi comparada com a de referência para o gene, depositada no NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov), para detecção de mutações e polimorfismos.

3.2.3.1 Extração do DNA

O DNA genômico de 23 indivíduos do grupo de estudo foi obtido a partir das células da MO. Como referido anteriormente, em um caso, o DNA foi extraído do sangue periférico, em função da insuficiência do material coletado da medula. Tal procedimento foi realizado segundo a técnica descrita por Miller et al. (1998), com modificações.

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

material foi, então, centrifugado por 30 minutos a 3.500rpm, 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 3.500rpm 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 3.500rpm 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 3.500rpm por 15 minutos, o sobrenadante transferido para um novo tubo de 15ml e completado com 10 ml 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 14.000rpm por três minutos, o etanol 70% descartado e o tubo deixado em repouso por 15 minutos. O DNA foi diluído em água estéril e incubado a 37°C por três a quatro dias para diluição. Após este período, o material foi finalmente dividido em alíquotas e estocado a -20°C. A estimativa da concentração foi realizada pela leitura em espectrofotômetro *NanoDrop ND 1000*.

3.2.3.2 Amplificação do Éxon 1 do Gene *FOXO3*

A amplificação do éxon 1 do gene *FOXO3* foi realizada pela técnica de SAIKI et al. (1998), com algumas modificações. As concentrações dos reagentes e condições de ciclagem da PCR para este gene foram realizadas segundo GALLARDO et al. (2008) e estão descritas nas Tabelas 4 e 5. A reação foi processada no termociclador GeneAmp® PCR System 9700 da Applied Biosystems, em volumes de 30µl e em todos os experimentos um dos tubos não recebeu DNA, que serviu como controle de contaminação.

Foi utilizado 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 de reação utilizadas para a amplificação do éxon 1.

Reagentes	Concentração final
Tampão	1X
MgCl ₂	1,5 Mm
dNTP	0,25 Mm
DMSO	5%
<i>Primer</i> Right	0,5µM
<i>Primer</i> Left	0,5 µM
Taq DNA Polimerase	5 U
Água Milli-Q	q.s.p. 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

3.2.3.3 Eletroforese em Gel de Agarose

Foram utilizados cinco microlitros de cada amostra, que foram aplicados em géis de agarose a 2%, com brometo de etídeo (0,5µg/ml) e submetidos à eletroforese horizontal por 30 minutos em corrente elétrica de 100V constantes, conduzida em tampão TEB 1x (Tris 89mM, EDTA 2,5mM e ácido bórico 89mM, com pH8,3). Em todas as eletroforeses realizadas foi utilizado como marcador o DNA Ladder de 100pb.

Os géis de agarose foram visualizados sob luz UV no transiluminador *Hoefler MAcroVue UVis-20* da *Amershan* e armazenados em fotodocumentador pelo sistema *EDAS 290*, o que permitiu observar se houve amplificação e se o tamanho do segmento obtido coincidiu com o esperado.

3.2.3.4 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). Os *amplicons* foram inicialmente transferidos para tubos de 1,5ml, onde foi realizada a purificação. A estes tubos foram adicionados 5µl de acetato de sódio 3M seguido de 150µl de etanol 100%. Os tubos foram, então, colocados em freezer a -20 °C *overnight*, para que o DNA fosse precipitado. Submeteu-se estes tubos a centrifugação a 15.000rpm na centrífuga *Sorvall Legend Match*

1.6R por 20 minutos, a 4 °C. O sobrenadante foi descartado e o precipitado lavado com 150µl de etanol a 70% (Merck). Em seguida, foi realizada centrifugação por 20 minutos, a 15.000rpm, a 4 °C, para obtenção de um precipitado, o qual foi homogeneizado em 20µl de água Milli-Q. As amostras foram novamente quantificadas em espectrofotômetro *NanoDrop ND 1000*.

3.2.3.5 Sequenciamento Automático

As amostras amplificadas e purificadas foram submetidas ao sequenciamento direto automático em sequenciador de capilaridade *3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems)*, gentilmente cedido para uso pelo Prof. Dr. Maurício Lacerda Nogueira, do Laboratório de Virologia (FAMERP).

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.

Na reação de PCR para sequenciamento foram utilizados 2,0µl de *Big Dye Terminator*, 4,0µl de solução tamponante (5X), 1,0µl de *primer* específico (3,2 µM), 1,0µl de DNA purificado com concentração aproximada de 200ng/ml e 12µl de água (Invitrogen), suficiente para completar 20µl de reação.

Para cada amostra foram realizadas seis reações, devido ao tamanho do éxon 1 do gene *FOXO3* (621pb), que impossibilita que toda sua extensão seja sequenciada com a utilização de um único par de *primers* inicial. 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, que estão descritos na Tabela 6. As condições da PCR para sequenciamento estão descritas na Tabela 7.

A análise das sequências foi realizada no programa DS Gene 2.0 (Accelrys, USA) e feita uma comparação com sequências existentes no GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov/blast).

Tabela 6. Dados dos primers utilizados para o sequenciamento direto.

<i>Primers</i>	<i>Função</i>	<i>Primers 5' a 3'</i>	<i>Posição</i>
F-279	<i>foward</i>	ACGATGAAGACGACGAGGAC	279pb
R-297	<i>reverse</i>	TCCTCGTCGTCTTCATCGTC	297pb
F-531	<i>foward</i>	AGCCGAGGAAATGTTCGTC	531pb
R-548	<i>reverse</i>	ACGAACATTTCTCGGCTGC	548pb

Tabela 7. Condições para amplificação para reação de sequenciamento do éxon 1 do gene *FOXO3*.

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

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

4. RESULTADOS

Foi realizada a análise citogenética convencional nas células da MO de 25 indivíduos com SMD e molecular em 24 deles. Nestes últimos, a análise molecular foi realizada em células da MO em 23 e do sangue periférico em 01 deles. A Tabela 8 apresenta os resultados obtidos em cada procedimento técnico realizado no grupo de estudo.

Entre os 25 casos analisados, a SMD era primária (*de novo*) em 24 (96%) e secundária em 01 (4%). O paciente 19, seis anos antes do diagnóstico de SMD, apresentou um Carcinoma Gástrico Indiferenciado e Linfoma de células grandes. Realizou gastrectomia total e quimioterapia por um ano. A SMD neste caso foi considerada secundária.

4.1 Análise Cromossômica

Com relação à análise citogenética por bandamento GTG, 22 casos (88%) apresentaram 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 técnica obtido (cerca de 400-450 bandas). Três casos (12%) apresentaram uma alteração cromossômica clonal isolada, ou seja, com um único evento cromossômico anormal, numérico ou estrutural.

No caso 7, com diagnóstico inicial de SMD sem a designação de subtipo, foi encontrada uma alteração cromossômica estrutural, a deleção de parte do braço longo do cromossomo 5, caracterizada como $del(5)(pter \rightarrow q13::q33 \rightarrow qter)$, a única alteração clonal observada em 09 (52,9%) das 17 células analisadas (Figura 2). Este achado permitiu o diagnóstico do subtipo da doença, de SMD Associada com $del(5q)$ e, conseqüentemente, a aplicação na predição do prognóstico da doente. Ela continuava viva e em tratamento até a confecção final deste texto científico (janeiro/2011), ou seja, após nove meses do diagnóstico.

No indivíduo 9, com AREB 2, foi encontrada uma outra alteração cromossômica numérica clonal única, que foi caracterizada como monossomia do cromossomo 22. Tal alteração foi observada em 03 (18,75%) das 16 células analisadas (Figura 3). Contudo, para esclarecimento do achado, pois a monossomia do cromossomo 22 já foi relatada em associação com inversão submicroscópica do cromossomo 16 em cariótipos complexos, (MUSILOVA, MICHALOVA, 1988), foi realizada a análise por FISH com a sonda específica, que mostrou dois sinais verdes e dois vermelhos com as fusões correspondentes

Tabela 8. Resultados dos procedimentos realizados em cada caso.

Caso	Cariótipo (GTG)/FISH	Sequenciamento do éxon 1
1	46,XY	Selvagem
2	46,XY	Selvagem
3	46,XY	Polimorfismo em heterozigose (159C>T)
4	46,XY	Polimorfismo em heterozigose (159C>T)
5	46,XX	Selvagem
6	46,XY	Polimorfismo em heterozigose (159C>T)
7	46,XX,del(5q)[9]/46,XX[8]	Polimorfismo em homozigose (159C>T)
8	46,XY	Selvagem
9	45,XY,-22[3]/46,XY[13] nuc ish 16p13.1(MYH11x2)[300]	Polimorfismo em heterozigose (159C>T)
10	46,XY	Selvagem
11	46,XX	Selvagem
12	46,XY	Polimorfismo em homozigose (159C>T)
13	46,XY	Polimorfismo em heterozigose (159C>T)
14	46,XX	Selvagem
15	46,XY	Polimorfismo em heterozigose (159C>T)
16	46,XX	Selvagem
17	46,XX	Selvagem
18	46,XX	Selvagem
19	45,XY,-21[10]/46,XY[7]	NR
20	46,XY	Polimorfismo em heterozigose (159C>T)
21	46,XX	Selvagem
22	46,XX	Selvagem
23	46,XX	Selvagem
24	46,XX	Polimorfismo em heterozigose (159C>T)
25	46,XX	Selvagem

NR= procedimento não realizado.

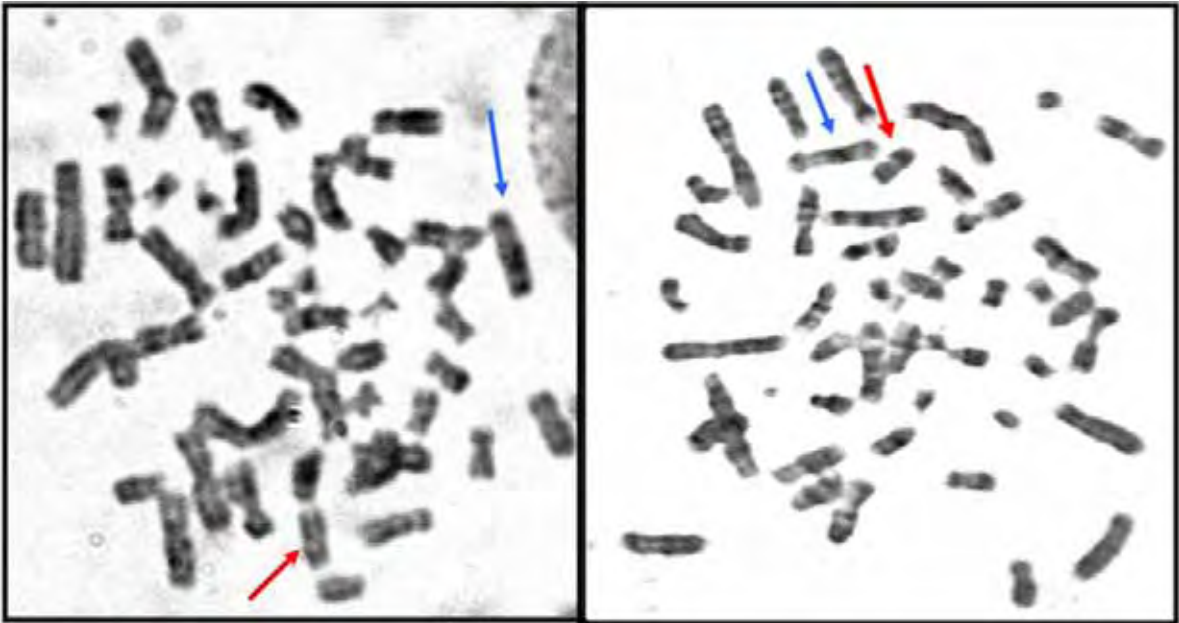


Figura 2. Metáfases submetidas à técnica de bandamento GTG do paciente 7. A seta vermelha indica o cromossomo 5 deletado e a seta azul o cromossomo 5 normal.

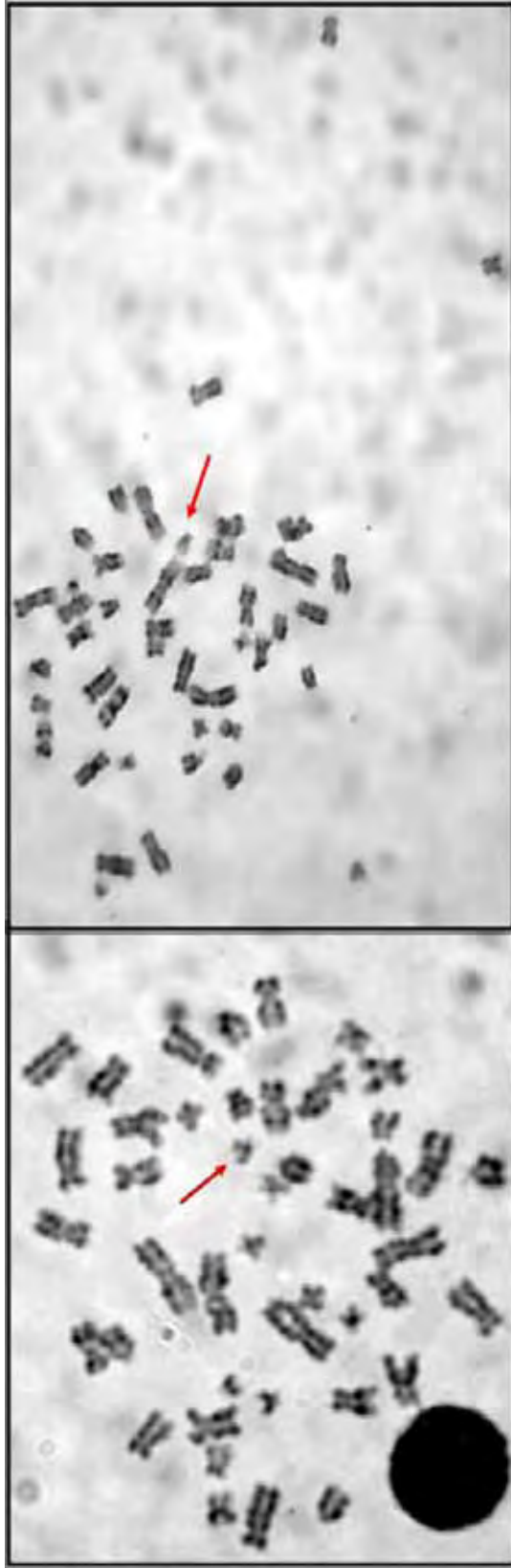


Figura 3. Metáfases submetidas à técnica de bandamento GTG do paciente 9, com monossomia do cromossomo 22. A seta mostra o único cromossomo 22 presente.

normais em 300 núcleos interfásicos analisados. Após também nove meses do diagnóstico, o paciente continuava vivo e em tratamento.

Em outro caso, também com AREB 2, caso 19, 10 (58,8%) das 17 células analisadas apresentaram monossomia do cromossomo 21 como evento cromossômico clonal único (Figura 4). Em função de o achado ser raro em SMD, foi elaborado um artigo científico com a descrição em detalhes do mesmo e suas implicações prognósticas. Tal artigo, já foi submetido à revista *Genetics and Molecular Research* e está apresentado como apêndice A.

4.2 Análise Molecular

A análise molecular por sequenciamento direto do éxon 1 do gene *FOXO3* de 14 indivíduos doentes mostrou sequências consideradas normais (selvagens). Entretanto, em dez (41,7%) casos, na posição 159, foi observada a presença de uma **timina** na posição que corresponde a de uma **citossina** na sequência selvagem (C>T), alterando o códon GCC para GCT, sendo esta uma alteração silenciosa, envolvendo o aminoácido alanina (p.Ala53Ala). Este resultado é compatível com a presença de um polimorfismo nessa posição (referência do banco de dados de SNP do *NCBI*, 2011) (Tabela 9).

Este resultado levou à necessidade de investigação do achado em um grupo controle, que foi constituído por 24 indivíduos doadores de sangue saudáveis, conforme citado anteriormente. O sequenciamento foi realizado a partir de DNA extraído de sangue periférico. Entre eles, 17 apresentaram sequências selvagens e 07 (29,2%) apresentaram a mesma alteração. Os resultados obtidos nos dois grupos não mostraram diferença estatisticamente significativa.

A Figura 5 apresenta os géis de agarose para os *amplicons* de 747 (pb) e as Figuras 6, 7 e 8 apresentam os eletroferogramas correspondentes a partes da sequência do éxon 1 do gene *FOXO3*.

Entre os pacientes, oito apresentaram o polimorfismo em heterozigose e dois em homozigose. Nos casos controles, seis apresentavam em heterozigose e um em homozigose, o que também não diferiu estatisticamente. A Figura 9 apresenta a identificação dos polimorfismos em heterozigose e em homozigose.

Em nenhuma outra posição do éxon 1 do gene *FOXO3* foi encontrada qualquer outra alteração.

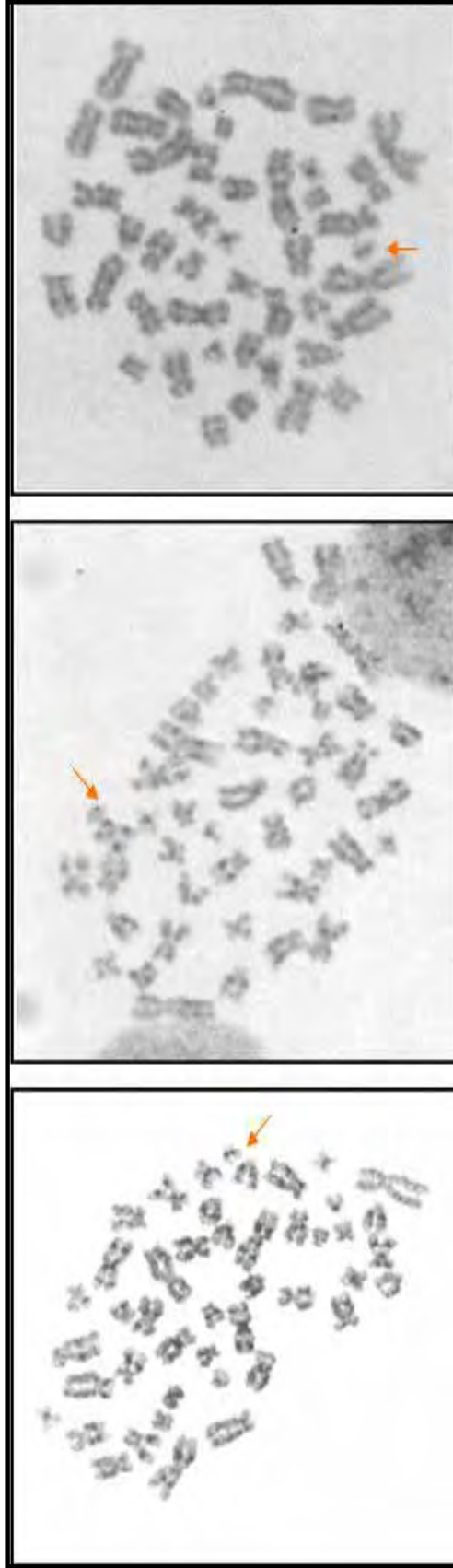


Figura 4. Metáfases do paciente 19 com monossomia do cromossomo 21. Setas indicam o único cromossomo do par.

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

Éxon 1 do gene <i>FOXO3</i>	
Posição do nucleotídeo	159C>T
Sequência de referência	GCC.GCC.GAC
Varição encontrada	GCC.GCT.GAC
Tipo de alteração	Silenciosa
Aminoácido	A[Ala]→ A[Ala]
Incidência nos doentes estudados	41,7%
Incidência nos controles	29,2%
Banco de dados SNP	Referência: 11757217

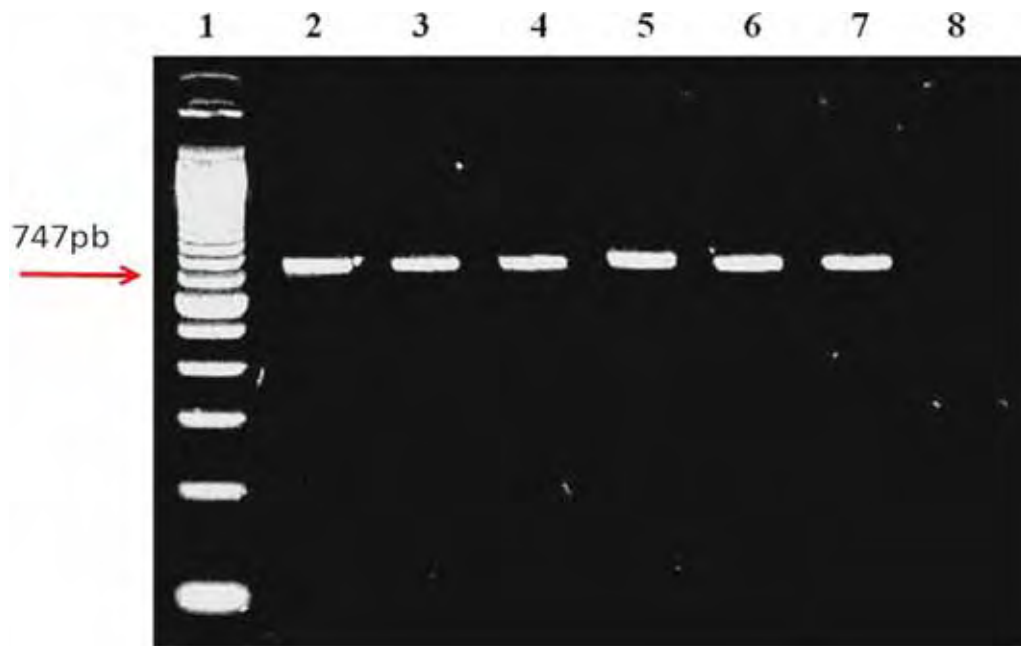


Figura 5. Perfil eletroforético em gel de agarose a 2% correspondente a amplificação do éxon 1 do gene *FOXO3* nas colunas 2-7. A coluna 8 representa o controle negativo e a 1 a marcação com *Ladder* de 100pb.

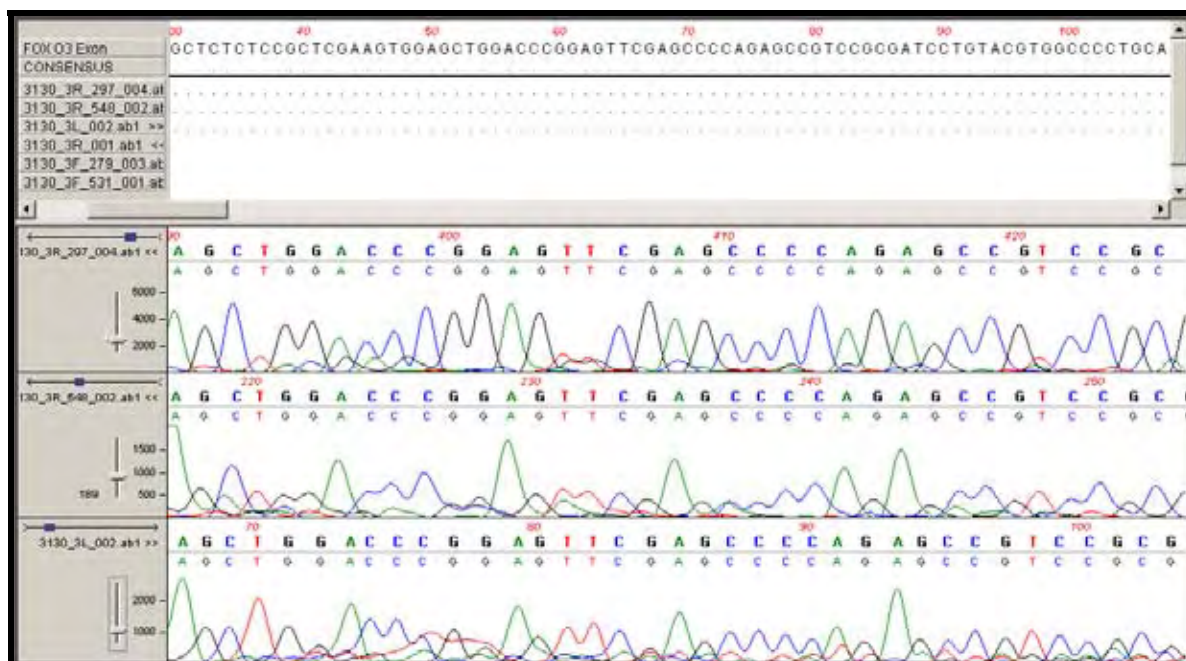


Figura 6. Eletroferograma parcial das seqüências do éxon 1 do gene FOXO3 analisadas no programa DS Gene 2.0 (Accelrys, USA).

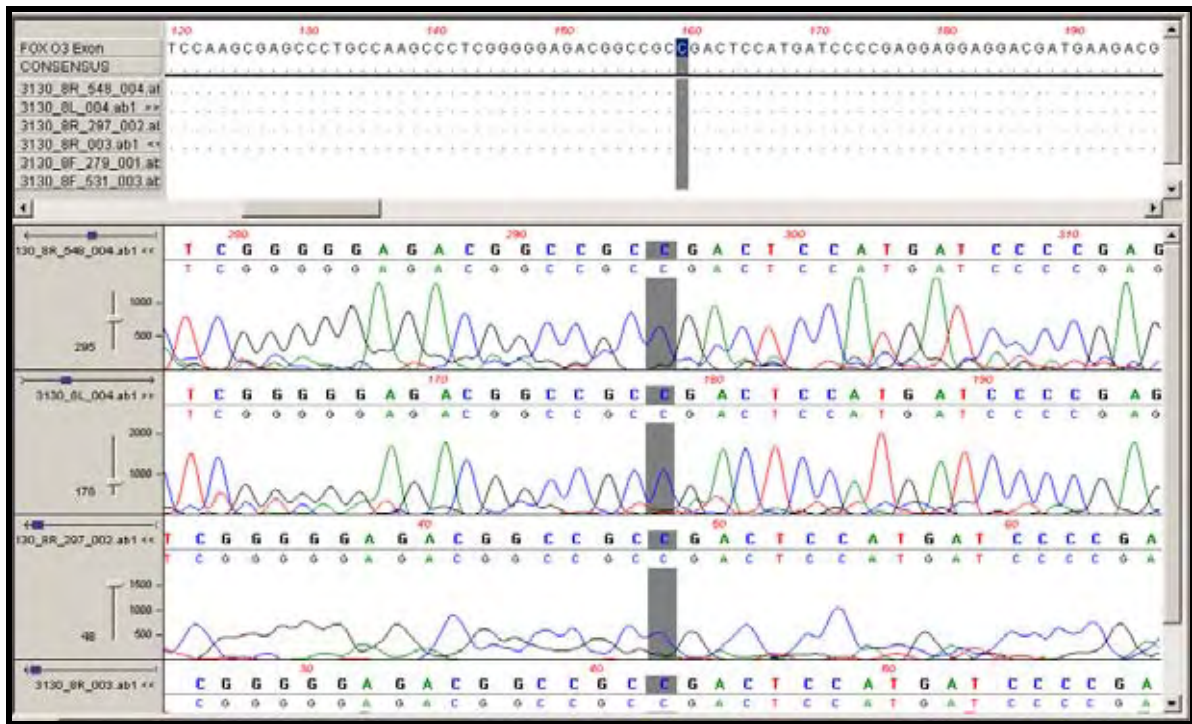


Figura 7. Eletroferograma parcial das sequências do éxon 1, destacado a posição 159 com a presença da citosina como na sequência de referência.

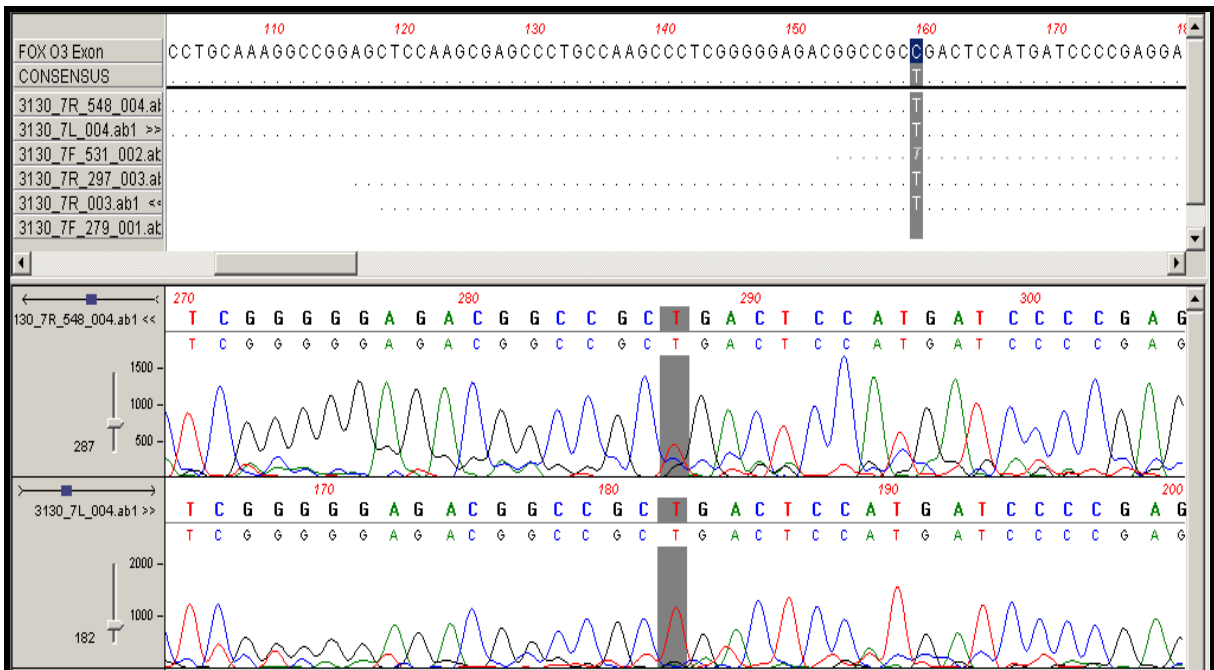


Figura 8. Eletroferograma parcial das sequencias do éxon 1, destacado a posição 159 com a presença da timina, evidenciando a substituição C>T.

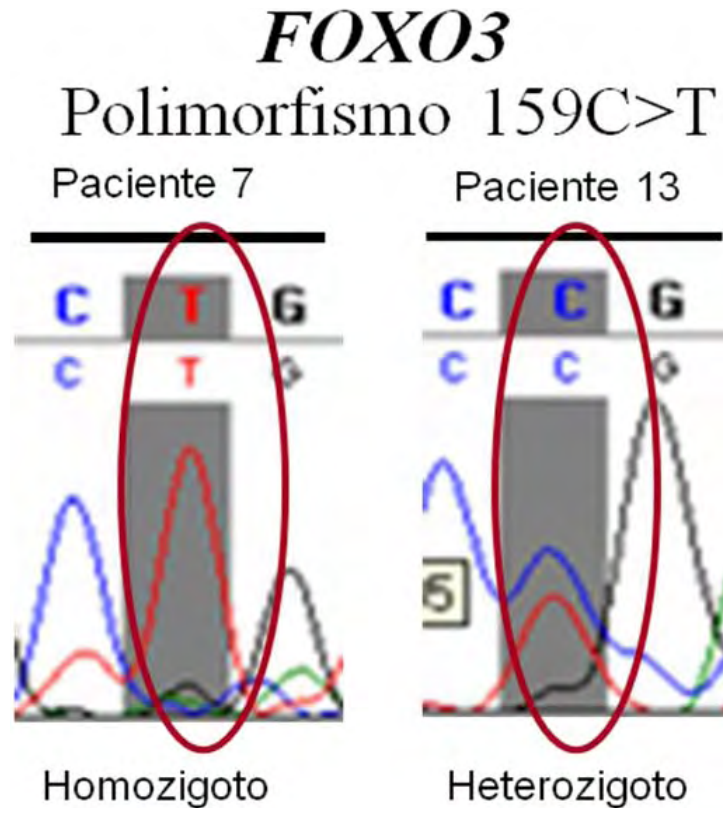


Figura 9. Identificação das formas de polimorfismos encontradas nos pacientes com SMD.

5. DISCUSSÃO

As Síndromes Mielodisplásicas estão entre as doenças hematológicas mais frequentes na população idosa e apresentam um alto risco de insuficiência medular e/ou evolução para leucemia mielóide aguda. São doenças graves e não curáveis por terapia medicamentosa. O transplante de medula óssea está indicado em poucos casos e, geralmente é realizado após a evolução para leucemia aguda (MALCOVATI, NIMER, 2008).

Modelos patogênicos mais atuais consideram a iniciação e a progressão da SMD como um processo de várias etapas associadas ao acúmulo de alterações no genoma. Os mecanismos moleculares envolvidos na etiologia e evolução, entretanto, não estão esclarecidos (WANG et al., 2010).

A análise citogenética com a utilização de diferentes técnicas é fundamental, uma vez que determinadas alterações cromossômicas podem levar ao conhecimento de alguns genes envolvidos no desenvolvimento da doença. O diagnóstico de SMD, inclusive, é baseado nos achados de hemograma, citologia e do cariótipo da medula óssea (LORAND- METZE, 2009).

A análise cromossômica está indicada para ser realizada em todos os casos, preferencialmente nas células da MO, embora também possa ser feita nas células do sangue periférico. A técnica de bandamento GTG é a mais utilizada, o que justifica a escolha feita no desenho do presente estudo, pois além de ser uma técnica com custos baixos e de fácil realização, permite avaliar alterações cromossômicas numéricas e estruturais em geral, além das mais comumente relatadas (OLNEY, LE BEAU, 2007).

Segundo os dados disponíveis na literatura, a análise do cariótipo, o percentual de blastos, o tipo de linhagens celulares com displasia e a idade do paciente são os fatores prognósticos mais importantes. Particularmente, o cariótipo é útil para estabelecer o prognóstico em termos de evolução da doença, transformação para LMA e para seleção do melhor método terapêutico (HAASE et al., 2007; VALENT, 2009; SKONIECZNA et al., 2009).

Nesse estudo, alterações citogenéticas foram observadas em 12% dos casos avaliados e em todos, a alteração ou o cariótipo normal pode ser relacionado com o diagnóstico e com o prognóstico. Contudo, de acordo com os dados previamente publicados, eram esperadas alterações cariotípicas em cerca de 50% dos casos de SMD (HAASE, 2008). A frequência menor obtida aqui pode ter ocorrido casualmente, em função do número pequeno de casos analisados. Deve ser considerado, inclusive, que há limitações técnicas, pois o número de

células normais pode ser maior do que o de alteradas, por seleção *in vitro*, e a qualidade das mesmas pode não permitir a detecção de anomalias menores. Além disso, algumas vezes a porcentagem de células alteradas é pequena e a análise de 15-20 metáfases, embora corresponda a um número padrão utilizado internacionalmente, pode não ser suficiente para detectá-las, pois não permite detectar alterações que ocorrem em frequências menores do que 5% (SKONIECZNA et al., 2009).

Pode ser destacado, também, que a experiência do citogeneticista é um fator determinante na detecção de alterações. Citogeneticistas menos experientes podem não detectar alterações estruturais mais complexas ou menores. No presente estudo, isto provavelmente não ocorreu, pois a autora realizou as análises, que foram conferidas por um colaborador experiente e pela sua orientadora, também experiente na área.

Por outro lado, dois achados raros foram observados nesta casuística, entre os três detectados, o que também não era esperado pelo número pequeno de indivíduos analisados, em comparação com casuísticas maiores somadas de diferentes locais ou grupos de pesquisa, ou formadas por estudos de consórcios.

Em SMD, o resultado normal do cariótipo, como observado em 88% dos casos aqui estudados, é um fator de melhor prognóstico do que a presença de qualquer alteração cromossômica numérica ou estrutural. A ausência de alterações no exame citogenético pode resultar em uma terapia menos agressiva. Porém, alterações cromossômicas podem aparecer durante o curso da SMD ou um clone anormal pode desenvolver-se na MO de pacientes com cariótipo anteriormente normal, motivo pelo qual está indicada a avaliação citogenética periódica dos pacientes, particularmente quando há mudanças no quadro clínico e/ou laboratorial dos mesmos (HAASE, 2008; VALENT, WIESER, 2009).

Geralmente as SMD estão associadas com anomalias cromossômicas não-balanceadas. As anomalias estruturais ou numéricas (com adição de cromossomos) são consideradas eventos clonais se forem identificados em duas ou mais células, o que foi observado no caso 7. Já as perdas cromossômicas (cromossomos inteiros) só podem ser consideradas clonais quando ocorrem em três ou mais células do paciente, o que foi observado nos casos 9 e 19 (OLNEY, LE BEAU, 2007). Estes achados corroboram os dados da literatura que referem que entre as alterações encontradas em SMD, as monossomias e deleções são as mais frequentes (HAASE, 2008).

A deleção intersticial do braço longo do cromossomo 5, que foi observada no caso 7, 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 aqui apresentado, o prognóstico é geralmente favorável, entretanto, se fizer parte de um cariótipo complexo, o prognóstico é significativamente modificado por alterações citogenéticas adicionais (WANG et al., 2010).

Os progressos significativos alcançados nos últimos anos, baseados na determinação da região comumente deletada, demonstram a haploinsuficiência do gene ribossomal *RPS14*. A triagem funcional de todos os genes da região deletada determinou que este evento biológico é a causa provável dos defeitos eritróides que ocorrem na SMD Associada com del(5q). A maioria dos indivíduos afetados evolui para a dependência de transfusão de hemácias, mas pouco frequentemente sofre transformação para leucemia aguda (BOULTWOOD et al., 2010).

Pela heterogeneidade genética observada nas células dos doentes, o conhecimento e a investigação das alterações citogenéticas em SMD estão mais restritos às anomalias mais frequentes ($-5/5q-$, $-7/7q-$, $+8$, $20q-$, and $-Y$). Entretanto, alterações cromossômicas raras estão presentes em uma parcela substancial de casos (HAASE 2008; MALCOVATI, NIMER, 2008).

A monossomia do 22, por exemplo, é considerado um achado raro. Berger e colaboradores (1992) observaram a perda do cromossomo 22 em três pacientes de 12 estudados, mas todas associadas a cariótipos complexos. Também, Musilova e Michalova (1988) já haviam observado a monossomia em sete casos entre 57 com alterações cromossômicas e todas associadas com outras alterações. Em um estudo, mais recente, realizado por Li e colaboradores (2009) em 351 pacientes chineses com SMD primária foi observada a monossomia do cromossomo 22 em seis, mas sempre também associada com outras alterações.

A monossomia isolada do cromossomo 22 é pouco descrita em estudos de SMD. No presente estudo, a monossomia 22 foi a única alteração encontrada nas células da MO do caso 9. Há relato de que tal alteração pode estar associada com a inversão do cromossomo 16, de difícil detecção por técnicas de rotina, como o bandamento GTG (MUSILOVA, MICHALOVA, 1988). A associação destas alterações pode estar também relacionada com leucemia mielóide aguda (BERGER, et al., 1992). Para descartar tal associação, e talvez a presença da leucemia, mesmo antes das manifestações hematológicas e clínicas, foi realizada a técnica de FISH e nenhuma alteração no cromossomo 16 foi observada.

Segundo dados obtidos pelo Grupo de Estudo Alemão-Austríaco em SMD, entre as 2.370 alterações cromossômicas detectadas em 1.080 pacientes com estas doenças, 59% delas eram raras. A monossomia do cromossomo 21 como evento único nas células da MO, como detectado no caso 19 aqui apresentado, foi observada em três casos (0,3%), mas os autores não referiram o tipo de SMD dos pacientes, ou se eram primárias ou secundárias. Em associação com outras anomalias citogenéticas há 30 casos previamente descritos e o prognóstico é referido como favorável, com sobrevida média de 32 meses, mas apenas quando não há mais do que uma única outra alteração adicional associada (HAASE, 2008). No caso aqui estudado o prognóstico pode ser considerado desfavorável, uma vez que o paciente evoluiu para leucemia aguda e posteriormente para óbito após nove meses do diagnóstico de SMD.

O gene *FOXO3* é um supressor de tumor responsável por diversos processos biológicos. Participa de processos de diferenciação celular, parada do ciclo celular, resistência a drogas e apoptose (KOMBLAU et al., 2010). Estudos recentes revelaram que a inibição de *FOXO3* é um evento importante nas doenças hematológicas e também em diversos tipos de câncer (JAGANI et al., 2008; KOMBLAU et al., 2010). Consistente com a ativação constitutiva da AKT, a fosforilação de *FOXO3* já foi observada em leucemia mielóide crônica, leucemia mielóide aguda e mieloma múltiplo. Estes resultados sugerem que a perda da função transcricional de *FOXO3* por fosforilação está envolvida na fisiopatologia destas doenças (SAKOE et al., 2010).

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).

Um estudo mais recente demonstrou que a expressão aumentada de *FOXO3* nuclear foi associada com aumento da resistência a drogas em células leucêmicas, por meio do aumento na atividade PI3K/AKT fosfatidilinositol 3-quinase. (KOMBLAU et al., 2010).

Não há dados disponíveis sobre a relação entre *FOXO3* e SMD. Este gene, como referido, está envolvido em processos neoplásicos da medula óssea e de outros tecidos. Além disto, em uma investigação sobre o perfil de expressão gênica em SMD, desenvolvido por Mendiburu e colaboradores, que resultou na primeira descrição de uma biblioteca SAGE de SMD (MENDIBURU et al., 2008) os autores avaliaram a expressão de alguns genes e observaram que o *FOXO3* era um dos que estavam significativamente hipoexpressos (comunicação pessoal). Também, mutações no éxon 1 e no éxon 2 já foram observadas na

falência e no câncer ovariano (WATKINS 2006; WANG et al., 2010). No estudo de Wang e colaboradores (2010), além das cinco mutações não sinônimas encontradas, foram observadas três variantes sinônimas: 105G>A (p. Leu35Leu), 159C>T (p.Ala53Ala) e 1185G>A (p.Thr395Thr). A variante (polimorfismo) 159C>T também estava presente em frequência semelhante no grupo controle.

No presente estudo, o éxon 1 do gene *FOXO3* foi sequenciado e o polimorfismo de nucleotídeo simples foi encontrado na posição 159 da sequência de referência (C>T). Este polimorfismo foi observado em heterozigose e em homozigose e a frequência nos indivíduos com SMD não diferiu da obtida dos controles.

Este SNP também já foi observado em outros estudos realizados em mulheres com insuficiência ovariana e falha no desenvolvimento gonadal, mas a incidência nas pacientes (25%) também foi semelhante à encontrada no grupo controle (18%) (GALLARDO et al., 2008). Além disso, também consta no banco de dados do site do NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) como um polimorfismo. Parece não haver relação entre esta variante e a presença de SMD, mas estudos com casuísticas maiores devem ser realizados antes de maiores conclusões e outros fatores que podem alterar a expressão gênica merecem ser considerados.

Fatores epigenéticos respondem pela expressão alterada de alguns genes envolvidos na etiologia e evolução do câncer. Em SMD a maioria dos estudos destes fatores destaca a metilação do DNA. Um padrão de metilação anormal já foi descrito em genes envolvidos na regulação do ciclo celular (*CDKN2A*), apoptose (*DAPK1* e *RIL*), adesão e motilidade celular (*CDH1* e *CDH13*). Porém, alguns destes genes possuem impacto funcional mínimo sobre a doença, porque não são expressos em células hematopoéticas normais. Por exemplo, o gene *CDKN2B* (*P15*), responsável pelo controle do ciclo celular é o mais extensivamente estudado, está metilado (silenciado) em 30% a 80% dos casos de diferentes tipos de SMD (ISSA, 2010).

Os pacientes com SMD frequentemente apresentam hipermetilação de vários genes simultaneamente em células da medula óssea. Assim, este processo pode ser interpretado de forma semelhante à deficiência de reparo e instabilidade de microssatélites em câncer: muitos loci são afetados ao mesmo tempo, alguns dos quais levando a consequências funcionais, entre elas o desencadeamento de processos displásicos ou neoplásicos (MULERO-NAVARRO, ESTELLER, 2008; ISSA, 2010; MAHMUD, STEBBING, 2010).

Assim, mudanças epigenéticas também podem ser particularmente relevantes na patogênese das SMD, uma vez que a doença responde bem aos medicamentos que interferem

na metilação do DNA (MULERO-NAVARRO, ESTELLER, 2008; ISSA, 2010). Em SMD, a hipermetilação intensa já foi associada com a progressão rápida para LMA e com a diminuição da sobrevida. Acredita-se que metilação do DNA seja anormal no início da SMD e que a progressão da doença está associada ao acúmulo de outros eventos epigenéticos, mas isso ainda não está esclarecido (ISSA, 2010; MCCORMACK, WARLICK, 2010; RODRIGUES et al, 2010; TORMO et al, 2010).

Devido a metilação nas ilhas CpG estar associada com a repressão da transcrição e ser transmitida através da mitose, a metilação *de novo* em células transformadas é proposta como um mecanismo alternativo para a inativação de genes supressores de tumor (SOLOMON, et al, 2008; ISSA, 2010).

Em Leucemia Linfoblástica Aguda 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). Este pode ser um mecanismo de ação do gene em SMD, que ainda não foi investigado.

Assim, alterações epigenéticas podem ser a causa da hipoexpressão do gene *FOXO3*, o que poderia explicar a ausência de mutações no éxon 1 deste gene em SMD. Entretanto, o envolvimento de mutações em outros éxons não pode ser descartado.

Durante os últimos anos, a literatura apresentou um número crescente de relatos de anomalias cromossômicas e moleculares em pacientes com SMD. Várias destas alterações podem servir como marcadores diagnósticos, prognósticos e futuros alvos terapêuticos. Portanto, o conhecimento acumulado sobre as alterações genômicas em SMD certamente resultará em cura ou melhora da qualidade de vida e sobrevida dos doentes.

6. CONCLUSÕES

1. Alterações cromossômicas estruturais e numéricas frequentes e raras podem ser observadas ao diagnóstico das SMD;
2. 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 e prognóstico dos doentes;
3. A deleção do braço longo do cromossomo 5 e a monossomia do cromossomo 22 como evento clonal único parecem significar bom prognóstico em SMD;
4. A monossomia do cromossomo 21 como evento clonal único em SMD é sugestiva de prognóstico ruim;
5. Mutações no éxon 1 do *FOXO3* não parecem ocorrer em células da medula óssea de indivíduos com SMD ao diagnóstico e, portanto, não parecem estar relacionadas à etiopatogenia de SMD, mas mutações em outros éxons e alterações epigenéticas neste gene, ou em outros envolvidos na sua expressão, não podem ser descartadas;
6. O polimorfismo 159C>T parece ser frequente na população e não estar relacionado ao aparecimento de SMD, contudo, sua frequência nos doentes merece ser melhor investigada;
7. O estudo citogenético e molecular das SMD pode oferecer subsídios para a compreensão dos processos biológicos envolvidos na etiologia e evolução destas doenças.

7. REFERÊNCIAS

BARZI, A.; SEKERES, M. A. Myelodysplastic syndromes: A practical approach to diagnosis and treatment. **Cleveland Clinic Journal of Medicine**, v.77, n. 1, p. 37-44, Jan. 2010.

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.

BOULTWOOD, J.; PELLAGATTI, A; McKENZIE, A. N. J.; WAINSCOAT, J. S. Advances in the 5q- syndrome. **Blood**, v. 116, n. 26, p. 5803-5811, Dec. 2010.

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

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.

GALLARDO, T. D.; JOHN, G.B.; BRADSHAW, K.; WELT, C.; 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.

GATTERMANN, N; RACHMILEWITZ, E. A. Iron overload in MDS—pathophysiology, diagnosis, and complications. **Annals of Hematology**, v. 90, n.1, p.1-10, Jan. 2011.

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

HAASE, D.; GERMING, U.; SCHANZ, J.; PFEILSTÖCKER, M., NÖSSLINGER, T.; HILDEBRANDT. B.; KUNDGEN, A.; LÜBBER, M.; KUNZMANN. R.; GIAGOUNIDIS, A.A.; AUL, C.; TRÜMPER, L.; KRIEGER, O.;STAUDER, R.;MÜLLER, T. H.; WIMAZAL, F.;VALENT, P.; FONATSCH, C.; STEIDL, C. New insights into the prognostic impact of the karyotype in mds and correlation with subtypes: evidence from a core dataset of 2124 patients. **BLOOD**, v. 110, n. 13, p. 4385-4395, Aug. 2007.

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

HUI, R. C. Y.; GOMES, A. R.; CONSTANTINIDOU, D.; COSTA, J. R.; KARADEDU, C. T.; FERNADEZ DE MATTOS, S.; WYMAN, M. P.; BROSENS, J. J.; SCHULZE, A.; LAM, E. W.-F. The Forkhead Transcription Factor FOXO3a Increases Phosphoinositide-3 Kinase/Akt Activity in Drug-Resistant Leukemic Cells through Induction of PIK3CA Expression. **Molecular and Cellular Biology**, v. 28, n. 19, p. 5886-98, 2008.

INTERNATIONAL SYSTEM FOR HUMAN CYTOGENETIC NOMENCLATURE. **ISCN 2009: An International System for Human Cytogenetic Nomenclature**. Farmington: Karger, B. S. 2009.

ISSA, J.P. Epigenetic changes in the myelodysplastic syndrome. **Hematology/Oncology Clinics of North America**, v.24, n. 2, p. 317-330, Apr. 2010.

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.

JÄDERSTEN, M., HELLSTRÖM-LINDBERG, E. Myelodysplastic syndromes: biology and treatment. **Journal of Internal Medicine**, v. 265, p. 307–328, Mar. 2009.

JEKARL, D. W.; HAN, S. B.; KIM, M.; LIM, J.; OH, E. J.; KIM, Y.; KIM, H. J.; MIN, W. S.; HAN, K. JAK2 V617F mutation in myelodysplastic syndrome, myelodysplastic syndrome/myeloproliferative neoplasm, unclassifiable, refractory anemia with ring sideroblasts with thrombocytosis, and acute myeloid leukemia. **The Korean Journal of Hematology**, v. 45,n. 1, p. 46-50, Mar. 2010.

KOMBLAU, S. M.; SINGH, N.; QIU, Y.; CHEN, W.; ZHANG, N.; COOMBES, K. R. Highly Phosphorylated FOXO3A Is an Adverse Prognostic Factor in Acute Myeloid Leukemia. **Clinical Cancer Research**, v. 16, n. 6, p 1865- 1874, Mar. 2010.

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.

LORAND - METZE, I. A importância da integração de dados do diagnóstico das hemopatias. **Revista brasileira hematologia hemoterapia**, v. 31, n. 3, p.189-191, Junho 2009.

MA, W.; KANTARJIAN, H.; ZHANG, K.; ZHANG, X.; WANG, X.; CHEN, C.; DONAHUE, A. C.; ZHANG, Z.; YEH, 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.

MAHMUD, M.; STEBBING, J. Epigenetic modifications in AML and MDS. **Leukemia Research**, v.34, n. 2, p. 139–140, Feb. 2010.

MALCOVATI, L.; NIMER, S. D. Myelodysplastic syndromes: diagnosis and staging, **Cancer control**, Suppl:4-13, Oct. 2008.

MCCORMACK, S. E.; WARLICK, E. D. Epigenetic approaches in the treatment of myelodysplastic syndromes: clinical utility of azacitidine. **OncoTargets and Therapy**, v.7, n. 3, p.157-165, Sep . 2010.

MENDIBURU, C. F.; SILVA JR., W. A.; RICCI JR., O.; BONINI-DOMINGOS, C. R.; FETT-CONTE, A. C. Global gene expression profile in myelodysplastic syndromes using SAGE, **Genetics and Molecular Research**, v. 7, n. 4, p. 1245-1250, 2008.

MIHARA, K.; TAKIRA, Y.; KIMURA, A. Genetic and epigenetic alterations in myelodysplastic syndrome. **Cytogenetic and Genome Research**. v. 118 p.297-303, 2007.

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.

MIYAMOTO K, ARAKI, K. Y.; 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, K. I.; HARADA, M.; MOTOYAMA, N.; SUDA, T.; HIRAO, A. Foxo3a Is Essential for Maintenance of the Hematopoietic Stem Cell Pool, **Cell Stem Cell**, v 1, n 1, p.101-112, Jun. 2007.

MULERO-NAVARRO, S.; ESTELLER, M. Epigenetic biomarkers for human cancer: The time is now. **Critical Reviews in Oncology/Hematology**, v. 68, n. 1, p. 1-11, Oct. 2008.

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

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

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.

OLNEY, H. J.; LE BEAU, M. M. Evaluation of recurring cytogenetic abnormalities in the treatment of myelodysplastic syndromes. **Leukemia research**, v. 31, n. 4, p. 427-434, Apr. 2007.

ORTEGA, J.; KOMROKJI, R.; LIST, A. E. The Hematopoietic Growth Factors in the Myelodysplastic Syndromes. **Cancer Treatment and Research**, v. 157, p.363-382, Jan. 2011.

PFEILSTÖCKER, M.; KARLIC, H.; NÖSSLINGER, T.; SPERR, W.; STAUDER, R.; KRIEGER, O.; VALENT, P. Myelodysplastic syndromes, aging, and age: correlations, common mechanisms, and clinical implications. **Leukemia & Lymphoma**, v. 48, n. 10, p. 1900-9, Oct 2007.

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

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

RODRIGUES, E. F.; SANTOS-REBOUÇAS, C. B.; GONÇALVES-PIMENTEL, M. M.; MENCALHA, A. L.; DOBBIN, J.; DA COSTA, E. S.; FERNANDEZ, C. DE S.; BOUZAS, L. F.; ABDELHAY, E.; DE SOUZA- FERNANDEZ, T. Epigenetic alterations of p15(INK4B) and p16(INK4A) genes in pediatric primary myelodysplastic syndrome. **Leukemia & Lymphoma**, v. 51, n.10, p. 1887-1894, Oct. 2010.

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 thermostable DNA polymerase. **Science**, v. 239, n. 4839, p. 487-491, Jan. 1988.

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. 3787-3795, May 2010.

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.; QUEIZÁN, J.A.; RODRIGUEZ, J.N.; FERNÁNDEZ-ABELLÁN, P.; BÁREZ, A.; PEÑARRUBIA, 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.

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

SHADDUCK, R. K.; LATSKO, J. M.; ROSSETTI, J. M.; HAQ, B, ABDULHAQ, H. Recent advances in myelodysplastic syndromes. **Experimental Hematology**, v. 35, n. 4, suppl 1, p. 137-143, Apr. 2007.

SHIOTA, M.; YOKOMIZO, A.; KASHIWAGI, E.; TADA, Y.; INOKUCHI, J.; TATSUGAMI, K.; KUROIWA, K.; UCHIUMI, T.; SEKI, N.; Naito, S. Foxo3a expression and acetylation regulate cancer cell growth and sensitivity to cisplatin. **Cancer Science**, v.101, n. 5, p 1177-1185, May 2010.

SKONIECZNA, K.; DUSZEŃKO, E.; WYROWIŃSKA, E.; HAUS, O. Usefulness of classic cytogenetic testing compared to fluorescence in situ hybridization in genetic diagnosis of 58 patients with myelodysplastic syndromes. **Polskie Archiwum Medycyny Wewnętrznej**, v. 119, n. 6, p. 366-372, Jun 2009.

SNP, 2010. Disponível em: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/snp_ref.cgi?rs=11757217/. Acesso em: 28 out. 2010.

SOLOMON, P.R.; MUNIRAJAN, A. K.; TSUCHIDA, N.,; MUTHUKUMARASAMY, K.; RATHINAVEL, A.; SELVAM, G.S.; SHANMUGAM, G. Promoter hypermethylation analysis in myelodysplastic syndromes: diagnostic & prognostic implication. **The Indian Journal Medical Research**, v. 127, n. 1, p. 52-57, Jan. 2008.

TORMO, M.; MARUGÁN, I.; CALABUIG, M. Myelodysplastic syndromes: an update on molecular pathology. **Clinical & Translational Oncology**, v.12, n.10, p. 652-661, Oct. 2010.

TOTHOVA, Z., GILLILAND D. G., FoxO Transcription Factors and Stem Cell Homeostasis: Insights from the Hematopoietic System. **Cell Stem Cell**, v. 1, n. 2, p. 140-52, Aug. 2007.

VALENT, P. Clinical impact of genetic and molecular markers in myelodysplastic syndromes (MDS), **Magazine of European medical oncology**, v 2, supl. 1, p. 13-17, 2009.

VALENT, P.; WIESER, R. Update on genetic and molecular markers associated with myelodysplastic syndromes. **Leukemia & Lymphoma**, v. 50, n. 3, p. 341-348, Mar 2009.

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.

WANG H., WANG X.Q., XU X.P., LIN G.W. Cytogenetic evolution correlates with poor prognosis in myelodysplastic syndrome. **Cancer Genetics and Cytogenetics**, v. 196, n. 2, p. 159-166, Jan. 2010.

WANG, H.; WANG, H.Q.; XU, X. P.; LIN, G. W. Cytogenetic features and prognosis analysis in Chinese patients with myelodysplastic syndrome: a multicenter study. **Annals of hematology**, v. 89, n. 6, p. 535-544, Jun, 2010.

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

WEIDINGER, C.; KRAUSE, K.; FUHRER, D. Novel insights into FOXology: FOXOs and their putative role in thyroid carcinogenesis. **Expert Review of Endocrinology and Metabolism**, v. 6, n.1, pp. 63-69, Jan. 2011.

YANG, J. Y.; CHANG, C. J.; XIA, W.; WANG, Y.; WONG, K. K.; ENGELMAN; J. A.; DU. Y.; ANDREEFF, M.; HORTOBAGYI, G. N.; HUNG, M. C. Activation of FOXO3a Is Sufficient to Reverse Mitogen- Activated Protein/Extracellular Signal-Regulated Kinase Kinase Inhibitor Chemoresistance in Human Cancer. **Cancer Research**, v. 70, n. 11, p 4709-4718, Jun. 2010.

ZUNA, J.; BURJANIVOVA, T.; MEJSTRIKOVA, E.; ZEMANOVA, Z.; MUZIKOVA, K.; MEYER, C.; HORSLEY, S.W.; KEARNEY, L.; COLMAN, S.; PTOSZKOVA, H.; MARSCHALEK, R.; HRUSAK, O.; STARY, J.; GREAVES, M.; TRKA, J. Covert preleukemia driven by MLL gene fusion. **Genes Chromosomes Cancer**, v. 48, n. 1, p. 98-107, 2009.

APÊNDICE A

Clonal Monosomy of Chromosome 21 in a Case of Myelodysplastic Syndrome

Freitas P.C.¹, Carvalho-Salles A.B.², Mendiburu C.F.¹, Ricci Jr. O.³, Fett-Conte A.C.²

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

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

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

Abstract

This study reports on an adult myelodysplastic syndrome type Refractory Anemia with Excess Blast (RAEB-2) patient with a clonal monosomy of chromosome 21 as the only alteration found in bone marrow cells. This uncommon cytogenetic abnormality in this disease may be associated to a poor clinical course.

Key words: Myelodysplastic syndrome, monosomy 21, clonal chromosomal abnormalities.

Myelodysplastic Syndromes (MDS) are clonal stem cell disorders characterized by ineffective hematopoiesis leading to bone marrow failure, peripheral blood cytopenias, dysplasia and a high risk of progression to acute leukemia (Wang, 2010). Complications from cytopenias lead to higher morbidity and mortality among patients with MDS compared to an age-matched population. The variable risk of progression to Acute Myeloid Leukemia (AML) is of major prognostic significance in early MDS without blast excess (Haase et al., 2007). MDS is generally classified as “primary” (or *de novo*) or “treatment-related” (secondary to cytotoxic chemotherapy) (Malcovati et al., 2008). Onset of disease in the majority of patients occurs in the seventh decade of life (Mufti et al., 2008). According to the WHO classification of MDS (2008), Refractory Anemia with Excess Blast (RAEB) includes patients with 5-19% of blasts in the bone marrow (Jadersten et al., 2009).

Chromosomal abnormalities are major determinants in the pathogenesis, diagnosis, and prognosis of MDS and are increasingly the basis to select drugs for individual patients. Cytogenetic analysis of the bone marrow is indicated in MDS not only to detect characteristic chromosomal abnormalities, but also to assess clonal evolution (Haase et al., 2007).

Most frequently, a loss of genetic material in the form of deletions and monosomies can be observed, although translocations with loss or gain can also occur (Haase 2008; Malcovati et al., 2008). Due to genetic heterogeneity, knowledge about distinct cytogenetic alterations is mainly restricted to the commonest abnormalities ($-5/5q-$, $-7/7q-$, $+8$, $20q-$, and $-Y$). However in MDS, rare chromosome abnormalities are present in a substantial portion of patients. In a recent review study of the German-Austrian MDS Study Group, 59% of 2370 abnormalities observed in 1080 patients with MDS were uncommon. Monosomy of chromosome 21 as the only cytogenetic abnormality in MDS was observed in three cases and thus this is a very rare alteration. There was no mention of the prognosis in these cases. An association of monosomy of chromosome 21 with other cytogenetic alterations was described in 30 cases with prognosis being reported as favorable with a median survival of 32 months. However this was true only when not more than one additional abnormality was present (Haase 2008).

Our study was approved by the Ethics Committee of FAMERP. We describe a patient with RAEB-2 who presented with monosomy 21 as the only clonal alteration in bone marrow cells.

The 47-year-old man was attended in April 2008. According to the patient, when he had been attended in another hospital six years previously, he was diagnosed as having

undifferentiated gastric carcinoma and large cell lymphoma. Total gastrectomy was performed and the patient was submitted to chemotherapy for one year. His whole blood count showed pancytopenia with hemoglobin at 6.8 g/dL, hematocrit at 28%, a white blood cell count of 2700/ μ L and platelets at 2300/ μ L. The myelogram showed 18% of blasts and a cytochemical test was Sudan-Black positive. These findings were consistent with the diagnosis of RAEB-2.

A bone marrow aspirate drawn at this diagnosis was used for cytogenetic analysis after a 24-h non-stimulated culture in RPMI1640 medium with 20% fetal calf serum. GTG-banding karyotype was described according to the International System for Human Cytogenetic Nomenclature (ISCN 2009). Of the 17 analyzed metaphases from different culture flasks, 10 (59%) demonstrated monosomy of chromosome 21 (45,XY,-21) and 7 were normal (46,XY). Figure 1 illustrates three metaphases with monosomy of chromosome 21; this was the only clonal chromosomal abnormality found.

Two months later, in June 2008, the patient presented AML type M2 with the bone marrow showing 54% of blasts and a high nucleus/cytoplasm ratio, evident nucleoli and positive peroxidase. Immunophenotyping showed an immunophenotypic profile of CD45+, CD34+, CD33+, CD117+, CD13+, HLADR+, CD14+, CD15+, CD4+, CD54+ and CD42a- consistent with a diagnosis of AML (M2). He began chemotherapy using a Doxorubicin and Cytarabine Protocol (7+3). The patient died in January 2009 due to a stroke nine months after the diagnosis of RAEB-2.

The presence of monosomy of chromosome 21 as the sole clonal cytogenetic abnormality in malignant cells seems to be related to an unfavorable prognosis in secondary MDS. Its role in the development of the disease should be further studied with detection being important for prognosis and therapeutic management.

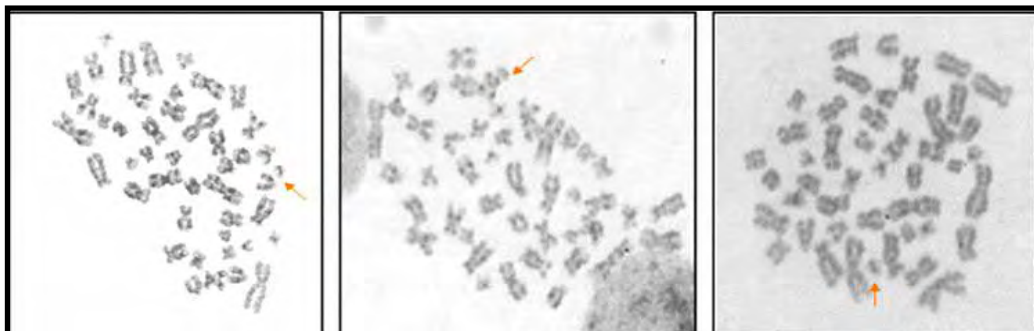


Figure 1 (a-c): Metaphases of a patient showing monosomy of chromosome 21 (arrows).

Acknowledgments

The authors wish to thank the parents and clinician for the data. Research supported by the Higher Education Professional Training Board (CAPES), Brazil.

References

Wang H, Wang XQ, Xu XP, Lin GW (2008). Cytogenetic evolution correlates with poor prognosis in myelodysplastic syndrome. *Cancer Genet Cytogenet.* 196(2):159-166.

Haase D (2008). Cytogenetic features in myelodysplastic syndromes. *Ann Hematol.* 7:515-526.

Haase D, Germing J, Schanz M, Pfeilstocker T, et al. (2007). New insights into the prognostic impact of the karyotype in MDS and correlation with subtypes: evidence from a core dataset of 2124 patients. *Blood.* 13:4385-4395.

Shaffer LG and Tommerup N (2009). An International System for Human Cytogenetic Nomenclature ISCN, (ed), S. Karger, Basel: 130 pp.

Jadersten M and Hellstrom-Lindberg E (2009). Myelodysplastic syndromes: biology and treatment. *J Intern Med* 3:307-328.

Malcovati L and S D Nimer (2008). Myelodysplastic syndromes: diagnosis and staging. *Cancer Contro.* 14-13.

Mufti GJ, Bennett JM , Goasguen J , Bain BJ, et al. (2008). Diagnosis and classification of myelodysplastic syndrome: International Working Group on Morphology of myelodysplastic syndrome (IWGM-MDS) consensus proposals for the definition and enumeration of myeloblasts and ring sideroblasts. *Haematologica.* 11:1712-1717.

ANEXO A

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO **(Conselho Nacional de Saúde, Resolução 196/96)**

Título da Pesquisa: Análise Citogenética e Molecular do gene *FOXO3* em Síndrome Mielodisplásica

Pesquisadores Responsáveis: Profa. Dra. Agnes Cristina Fett Conte, Depto. de Biologia Molecular – FAMERP, Chefe do Serviço de Genética; Paula Curi de Freitas – IBILCE/UNESP. Telefone para contato: (0xx17) 3201-5000 ramal 1931.

Para uma investigação científica honesta e segura, a pessoa que vai participar do estudo deve dar seu consentimento livremente, após ter sido muito bem informado sobre os riscos e benefícios do estudo.

É da responsabilidade do pesquisador dar toda e qualquer informação necessária e solicitada pelo participante do estudo. Este termo de consentimento, que foi aprovado por um Comitê de Ética em Pesquisa (CEP), tem a finalidade de proteger e informar o participante, que ficará com uma cópia do mesmo. Telefone/FAX do CEP: (17) 3201-5700, ramal 5813.

Fui esclarecido que este estudo tem como objetivo estudar algumas alterações genéticas nas células da medula óssea de pacientes com síndromes mielodisplásicas, no momento do diagnóstico, para investigar aspectos importantes da biologia da doença, que podem interferir na evolução do paciente.

Também fui informado que as técnicas que serão realizadas utilizarão apenas uma parte do material (medula óssea) obtida por coleta com seringa, um procedimento que já é realizado de rotina pelo meu médico hematologista, do Serviço de Hematologia do Hospital de Base.

Soube que os riscos para a minha saúde serão os mesmos daqueles que não participarem do projeto, ou seja, os dos procedimentos médicos de rotina, que neste caso, incluirão dor, ardência ou mancha roxa no local de retirada do material (entrada da agulha).

Fui informado que posso consultar as pesquisadoras responsáveis, pelo telefone ou pessoalmente, para esclarecimento de dúvidas. Também que todas as informações obtidas da minha participação serão consideradas confidenciais, ficando minha identidade mantida em sigilo, em qualquer situação.

As informações obtidas desta pesquisa só poderão ser divulgadas em reuniões ou revistas científicas e com minha identidade preservada.

Se eu decidir não participar ou interromper a minha participação, em qualquer época, não terei nenhum tipo de prejuízo, não perderei nenhum benefício e não precisarei dar justificativas da minha atitude.

Li este termo, recebi informações claras sobre a presente investigação, tive oportunidade de fazer perguntas e todas foram respondidas. Estou de acordo em participar livre e

espontaneamente deste estudo e sei que, sob hipótese alguma receberei qualquer tipo de gratificação pela minha participação.

Entendi que os resultados deste estudo poderão ser muito úteis para esclarecimento do diagnóstico, na conduta terapêutica (tratamento) e prognóstico (evolução) da minha doença.

Dou, portanto o meu consentimento.

Nome:

RG:

Data:/...../.....

Assinatura:

Paciente ou responsável legal

DECLARAÇÃO DE RESPONSABILIDADE: Expliquei a natureza, objetivos, riscos e benefícios desta investigação. Coloquei-me a disposição para perguntas e respondi a todas. Obtive o consentimento de maneira livre e me coloquei à disposição para qualquer outro esclarecimento pelo telefone (0xx17) 3201-5000 ramal 1931.

PESQUISADOR:

RG:

Data:/...../.....

Assinatura: