

**AVALIAÇÃO DA FREQUÊNCIA DE METILAÇÃO DE
PROMOTORES GÊNICOS NAS SÍNDROMES
MIELODISPLÁSICAS DA INFÂNCIA**

DANIEL ONOFRE VIDAL

**Dissertação apresentada à Fundação Antônio
Prudente para obtenção do título de Mestre em
Ciências**

Área de concentração: Oncologia

Orientador: Dr. Luiz Fernando Lopes

Co-Orientador: Dr. André Luiz Vettore

São Paulo

2005

FICHA CATALOGRÁFICA

**Preparada pela Biblioteca do Centro de Tratamento e Pesquisa
Hospital do Câncer A.C. Camargo**

Vidal, Daniel Onofre.

**Avaliação da frequência de metilação de promotores gênicos nas
síndromes mielodisplásicas da infância** / Daniel Onofre Vidal-- São Paulo,
2005.

78p.

Dissertação(mestrado)-Fundação Antônio Prudente.

Curso de Pós-Graduação em Ciências-Área de concentração: Oncologia.

Orientador: Luiz Fernando Lopes

Descritores: 1. SÍNDROMES MIELODISPLÁSICAS/genética. 2. MEDULA
ÓSSEA. 3. METILAÇÃO DE DNA. 4. CRIANÇA.

DEDICATÓRIA

Gostaria de dedicar esta dissertação as pessoas que me acompanham desde os primeiros passos, das primeiras palavras, das primeiras decepções, das alegrias e que muitas vezes deixaram seus sonhos de lado para me ajudar a realizar os meus. Meus pais, Dagoberto e Ângela.

Ao meu grande amigo, meu irmão Diego, companheiro pra qualquer coisa a qualquer hora, mas principalmente por me apoiar e dividir a felicidade de minhas conquistas e das suas também.

Especialmente a minha namorada, futura esposa, pelo apoio, compreensão e carinho que tem me dado nesses cinco anos de convivência diária. Isso só pode ser amor mesmo. Te amo!!!

As crianças com câncer que, em sua inocência, nunca abdicaram do direito de viver e sorrir, fazendo nossas vidas mais felizes e nos dando força para continuar...

Dedico a meu orientador e ao meu co-orientador por acreditarem em mim, pela paciência, pelo aprendizado, pela amizade e pela confiança.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a meu orientador Dr. Luiz Fernando Lopes por ter aberto as portas dessa nova fase da minha vida, pela confiança em mim e em meu trabalho, por tudo que me ensinou em relação a seu trabalho tão competente, pela paciência, pela dedicação, pela amizade e pelo agradável convívio durante esse período.

Ao meu co-orientador Dr. André Luiz Vettore pela imensa contribuição neste trabalho. Por contribuir em minha formação compartilhando seus conhecimentos, por ter acreditado em mim, pela amizade e pelas grandiosas discussões sobre os mais variados assuntos.

À Dra. Otávia Caballero, que apesar do pouco tempo de convivência contribuiu em muito para minha formação e engrandecimento, não apenas sendo um exemplo de uma ótima profissional, mas também por ser um exemplo de vida a ser seguido.

Ao Dr. André Carvalho, que foi muito importante para o fechamento deste trabalho por meio das discussões e opiniões e também pela orientação em algumas análises.

Às grandes amigas Mariana Brait e Márcia Dellamano, minhas irmãs mais velhas do lab, que me acolheram na minha chegada e que apesar da distância nunca deixaram de me ajudar. Companheiras de grandes comemorações e de muitas risadas durante o tempo em que estavam por aqui.

À Valéria Paixão, que com seu jeito meio elétrico se demonstrou uma grande pessoa com uma personalidade marcante, por ter me ensinado muitas coisas no lab. e pelas conversas sinceras e conselhos.

A Dra. Maria Isabel Achatz, pela amizade, por sempre me apoiar e também pelas conversas entre um experimento e outro. Te admiro, pelo seu exemplo de mulher, mãe e profissional, muito obrigado!!!

À Andréa Seixas pela grande amizade, pelo agradável convívio, pela paciência e principalmente pelo tabule que eu dividia com a Márcia.

À todo pessoal do laboratório pela agradável convivência e grande amizade: Adriana Bulgarelli, Danielle Renzoni; Fabio Piccoli; Fabrício de Carvalho, Roberta Félix, Luciane Kagohara, , Fernanda Góes, Dinamar Gaspar.

Aos amigos desde os tempos da faculdade e que hoje fazem parte da minha caminhada: Fabiana Bettoni, Lílian Pires e Raphael Bessa.

À Dra. Maria do Rosário Lattore, que em plena véspera de Natal teve disponibilidade e paciência me ensinando e me ajudando com as análises estatísticas deste trabalho.

Ao Dr. Julio César Santin, por ter ajudado com a coleta das amostras de MO dos pacientes e a toda equipe do Instituto Dante Pazzanese pela grande ajuda e disposição que demonstraram pra colaborar com este trabalho.

À Dra. Elizabete X. Souto e a Dra. Mary O. Santana por toda a ajuda com o arquivo de lâminas do qual foram retiradas as amostras.

À todos os profissionais que fazem parte do GCB-SMD-PED, pois sem o esforço de vocês não seria possível a realização deste trabalho.

À Amandina Morbeck, pela ajuda com todas as informações do banco de pacientes cadastrados no GCB-SDM-PED.

Ao Dr. Ricardo Renzo Brentani, diretor do Instituto Ludwig e Presidente do Hospital do Câncer A.C. Camargo pelas excelentes condições de trabalho.

Ao diretor da pós-graduação Dr. Luiz Fernando Lima Reis por apoiar e acreditar em nossa formação e trabalho.

À Ana Maria Kuninari e Marcia Hiratani, por todo carinho, pela atenção e por sempre estarem dispostas a escutar e ajudar no que fosse preciso.

À todas as meninas da biblioteca: Suely Francisco; Maria Adriana M. Bassols; Francyne Pólen G. Lima; e Rosinéia Aguiar Carneiro, pelo competente trabalho, pelo carinho e atenção, pela enorme ajuda e dedicação quando eu descia para ficar algum tempo na biblioteca trabalhando.

Aos médicos, residentes e funcionários do Departamento de Pediatria do Hospital do Câncer A.C. Camargo pela importante colaboração e paciência.

Aos membros da banca de qualificação desta dissertação: Dr. Alex Fiorini, Dra. Marilda de Souza e Dra. Helena Brentani pelo tempo atribuído à leitura dos relatórios e pelas sempre proveitosas sugestões.

À Isabel C. Carneiro (Bel) e Sirléia M. Sampaio (Léia), por todas as risadas e também por organizar nossa bagunça com os materiais que usamos no dia a dia.

Ao CNPq pela bolsa de estudos concedida, a FAPESP pelo apoio financeiro através do CEPID e ao Instituto Ludwig de Pesquisa Sobre o Câncer pelo apoio financeiro e pela oportunidade de desenvolver nosso projeto.

A todos que de alguma maneira contribuíram para a realização deste trabalho.

A Banca Julgadora da Dissertação pelo tempo atribuído à leitura desta dissertação.

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

Agradeço especialmente a minha família, por todo o amor que tem me dado durante esses anos.

Ao meu amor, Aninha, e a sua família, Senhor Valentim, Senhora Lourdes, Senhor Manuel e Valmor, por terem me acolhido muito bem em suas vidas e pela força e conselhos que tem me dado nesses anos de convivência.

À todas as crianças, que fazem nossas vidas mais felizes e surpreendentes.

À minhas grandes amigas, Letícia Olops e Edaíse M. Silva, por esses dois anos de convivência diária, pela compreensão, companheirismo e por me mostrar que o universo feminino pode ser mais complexo do que eu poderia imaginar. Nunca vou esquecer esses dias que passei com vocês.

À outras duas grandes amigas, Mariana Maschietto e Amanda Gonçalves, por tudo que tem feito por mim, por dividir suas alegrias e conquistas comigo e também por esses seis anos de uma forte amizade.

À minhas “irmãzinhas”, Aline Bolpetti e Vanessa Pereira, nunca vou esquecer o trio (FB) que formávamos na faculdade e pela amizade que se estenderá pelo resto de nossas vidas.

Às amigas Mariana Brait e Márcia Dellamano por tudo o que fizeram por mim, pelo meu aprendizado e principalmente pela grande amizade.

A todos que contribuíram de alguma forma para essa conquista.

RESUMO

Vidal DO. **Avaliação da frequência de metilação de promotores gênicos nas síndromes mielodisplásicas da infância.** São Paulo; 2005. [Dissertação de Mestrado-Fundação Antônio Prudente].

As Síndromes Mielodisplásicas (SMD) compreendem um grupo heterogêneo de desordens clonais de células-tronco hematopoéticas, sendo caracterizada por um processo de hematopoese deficiente e pela alta probabilidade de progressão para a Leucemia Mielóide Aguda (LMA). Apesar de rara na infância, o prognóstico para essa doença é desfavorável e a maioria dos pacientes pediátricos evoluem a óbito em consequência da transformação leucêmica ou devido a complicações decorrentes da evolução da doença (infecções e hemorragias). A metilação anormal, que ocorre na região promotora dos genes está associada ao silenciamento gênico. Esta alteração quando ocorre em genes com característica de supressão tumoral tem sido relacionada ao início e progressão do câncer e, por isso pode ser considerada como um marcador em potencial para a doença. Tais marcadores podem ser importantes para a detecção do câncer em estágios mais precoces, na determinação de prognóstico, no seguimento da doença e na determinação de resposta a terapia. Os objetivos deste estudo foram avaliar o padrão de metilação de 14 genes (*CDKN2B*, *CDKN2A*, *CALCA*, *CDHI*, *HIC1*, *GSTP1*, *p73*, *p14^{ARF}*, *MGMT*, *APC*, *RARβ*, *CDHI3*, *DAPK* e *TIMP-3*) com característica de supressão tumoral em 12 amostras de aspirado de medula óssea (a fresco) e 13 amostras de esfregaço de MO de pacientes pediátricos acometidos pela SMD e verificar a correlação desses dados com as características clínico-laboratoriais dos pacientes. Os DNAs foram extraídos a partir das amostras e submetidos a reação de *MSP*. Os genes que apresentaram maiores frequências de metilação nas amostras foram: *CALCA* (76%), *GSTP1* (52%) e *CDKN2B* (50%). Para os outros 11 genes analisados as frequências encontradas foram menores que 25% ou não foi possível detectar a presença de metilação em nenhuma das amostras analisadas. A metilação do promotor do gene *GSTP1* foi correlacionada, com significância estatística, a maiores taxas de hemoglobina e

hematócrito nesses pacientes. Os resultados do presente estudo sugerem que o padrão de metilação da SMD em crianças é semelhante ao de adultos e que a metilação nesses genes pode vir a ser usada como uma ferramenta para auxiliar no diagnóstico e tratamento da SMD. No entanto, estudos mais amplos que concentrem uma maior casuística são necessários para a confirmação destes achados.

SUMMARY

Vidal DO. [Aberrant methylation of gene promoter in childhood myelodysplastic syndrome]. São Paulo; 2005. [Dissertação de Mestrado-Fundação Antônio Prudente].

The myelodysplastic syndrome (MDS) encloses a heterogeneous group of clonal hematopoietic stem cell disorders and it is characterized by ineffective hematopoiesis and by a high incidence of progression to AML (Acute Myeloid Leukemia). Despite the rarity in childhood, the disease prognostic is poor and the majority of the patients die in consequence of the leukemic transformation or complications involved in the evolution of the MDS (infections and hemorrhage). The abnormal methylation in the promoter region of some genes is related to gene silence. The abnormal methylation could be involved with initiation and progression of cancer when it occurs in tumor suppressor genes. For this reason it has been evaluated as potential markers for the detection of the cancer in early stages (before the clinical manifestation), for the prognostic determination, for the follow-up of the disease progression and for the determination of the response to therapy. We analyzed the aberrant methylation profile of the promoter region of 14 genes (*CDKN2B*, *CDKN2A*, *CALCA*, *CDH1*, *HIC1*, *GSTP1*, *p73*, *p14^{ARF}*, *MGMT*, *APC*, *RAR β* , *CDH13*, *DAPK* e *TIMP-3*) with tumor suppression features in 12 bone marrow aspirate samples and 13 bone marrow smear samples of pediatric patients diagnosed with MDS. DNA of these samples was extracted and submitted to *MSP*. The most frequently methylated genes were *CALCA* (76%), *GSTP1* (52%) and *CDKN2B* (50%). For the other genes the methylation frequency was below 25%. We tried to correlate the methylation profile with clinic-laboratorial parameters. *GSTP1* promoter methylation was significantly correlated with higher rates of red blood parameters. Our results suggest that the methylation pattern in childhood MDS could be similar to the methylation pattern in adults MDS and that the methylation of the genes presented here can be used as a tool to improve the diagnostic and treatment of the MDS.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Esquema modificado representando a hierarquia da hematopoiese na medula óssea.	3
Figura 2	<i>MSP</i> do gene <i>CDKN2A</i> .	35
Figura 3	Amplificação de um fragmento de 252 pb do gene <i>hMLH1</i> a partir de amostras de DNA obtidas de esfregaços de MO corados e não-corados	36
Figura 4	Amplificação de um fragmento de 252 pb do gene <i>hMLH1</i> a partir de amostras de DNA obtidas de esfregaços de MO de diferentes períodos de estocagem.	37
Figura 5	Amplificação de um fragmento de 252 pb do gene <i>hMLH1</i> a partir de amostras de DNA obtidas de medula óssea total de 3 pacientes com SMD.	38
Figura 6	Perfil de metilação em uma amostra de MO a fresco (SMD41) e uma amostra de esfregaço de MO (L167) obtidas do mesmo paciente.	39
Figura 7	Perfil de metilação da região promotora dos genes <i>CALCA</i> , <i>GSTP1</i> e <i>CDKN2B</i> nas 25 amostras de MO incluídas neste estudo.	43
Figura 8.	Perfil de metilação na região promotora dos genes <i>CALCA</i> , <i>GSTP1</i> e <i>DAPK</i> .	44
Figura 9.	Curvas de sobrevida global em relação ao perfil de metilação da região promotora dos genes <i>CALCA</i> , <i>GSTP1</i> e <i>CDKN2B</i> .	51

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Seqüência dos iniciadores utilizados na <i>MSP</i> .	29
Tabela 2	Temperaturas utilizadas nas reações de <i>MSP</i> .	30
Tabela 3	Número e porcentagem de pacientes acometidos por SMD segundo características demográficas e clínicas.	32
Tabela 4	Descrição da média e desvio padrão das características clínico-laboratoriais dos pacientes acometidos por SMD.	33
Tabela 5	Frequência de metilação na região promotora dos 14 genes estudados nas amostras de MO de pacientes acometidos pela SMD e nas amostras de MO sem neoplasia.	42
Tabela 6	Correlação do padrão de metilação dos genes <i>CALCA</i> , <i>GSTP1</i> e <i>CDKN2B</i> com as características demográficas e clínicas dos pacientes acometidos pela SMD.	46
Tabela 7	Correlação do padrão de metilação dos genes <i>CALCA</i> e <i>GSTP1</i> combinados, com as características demográficas e clínicas dos pacientes acometidos pela SMD.	47
Tabela 8	Descrição da idade e das características laboratoriais segundo o padrão de metilação dos genes <i>CALCA</i> , <i>GSTP1</i> e <i>CDKN2B</i> .	49
Tabela 9	Descrição das características laboratoriais segundo o padrão de metilação combinado dos genes <i>CALCA</i> e <i>GSTP1</i> .	50

LISTA DE ABREVIATURAS

AA	anemia aplástica
APC	<i>adenomatosis polyposis coli</i>
CALCA	<i>calcitonin-related polypeptide (alpha)</i>
CCG	<i>Children's Cancer Group</i>
CDH1	<i>cadherin 1(E-cadherin)</i>
CDH13	<i>cadherin 13(H-cadherin)</i>
CDKI	<i>cyclin-dependent kinase inhibitor</i>
CDKN2A	<i>cyclin-dependent kinase inhibitor 2A (p16)</i>
CDKN2B	<i>cyclin-dependent kinase inhibitor 2B (p15)</i>
CT	células tronco
DAPK	<i>death-associated protein kinase</i>
DHL	desidrogenase láctica
DNA	ácido desoxirribonucleico
DNMT	<i>DNA methyltransferase</i>
dNTPs	deoxinucleotídeos fosfato
E.U.A.	Estados Unidos da América
E2F	<i>E2F transcription factor</i>
EDTA	<i>ethylenediaminetetracetic acid</i>
EWOG-MDS	<i>European Working Group in Myelodysplastic Syndrome</i>
FAB	<i>French-American-British Group</i> (classificação para SMD)
FAP	Fundação Antônio Prudente
GCB-SMD-PED	Grupo Cooperativo Brasileiro de Síndrome Mielodisplásica em Pediatria
GSTM1	<i>glutathione S-transferase M1</i>
GSTP1	<i>glutathione S-transferase pi</i>
GSTT1	<i>glutathione S-transferase theta 1</i>
HDAC	<i>histone deacetylases</i>
HIC1	<i>hypermethylated in cancer 1</i>
HL60	linhagem celular de leucemia promielocítica aguda
hMLH1	<i>humam Mut-L Homologue 1</i>
IDPC/SP	Instituto Dante Pazzanese de Cardiologia – São Paulo
IPSS	<i>International Prognostic Scoring System</i>
LLA	leucemia linfocítica aguda

LMA	leucemia mielóide aguda
LMC	leucemia mielóide crônica
LMMJ	leucemia mielomonocítica juvenil
µg	micrograma
µL	microlitro
µM	micromolar
M	molar
mm	milímetro
mM	milimolar
mm³	milímetros cúbicos
MBP	<i>methyl CpG binding protein</i>
MeCP	<i>methyl-core binding protein</i>
MgCl₂	cloreto de Magnésio
MGMT	<i>O-6-methylguanine-DNA methyltransferase</i>
MO	medula óssea
MSP	<i>methylation specific PCR</i>
NaOH	hidróxido de sódio
NF1	<i>neurofibromin 1</i>
NFKB	<i>nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells</i>
ng	nanograma
NQO1	<i>NAD(P)H dehydrogenase, quinone 1</i>
N-ras	<i>neuroblastoma RAS viral (v-ras) oncogene homolog</i>
p14^{ARF}	<i>cyclin-dependent kinase inhibitor 2B, isoform 3</i>
pb	pares de bases
PCR	reação em cadeia da polimerase cuja sigla do inglês é <i>Polimerase Chain Reaction</i>
RA	anemia refratária
RAEB	anemia refratária com excesso de blastos
RAEB-t	anemia refratária com excesso de blastos em transformação
RARβ	<i>retinoic acid receptor (beta)</i>
RARS	anemia refratária com sideroblasto anelado
RC	citopenias refratárias
SMD	síndrome mielodisplásica
SP	sangue periférico
TIMP3	<i>tissue inhibitor of metalloproteinase 3</i>

t-MDS/AML	leucemia mielóide aguda transformada a partir de estado mielodisplásico
TMO	transplante de medula óssea
TP53	<i>tumor protein p53</i>
U	unidades

ÍNDICE

1	INTRODUÇÃO	1
1.1	Hematopoese	1
1.2	Leucemias na Infância	3
1.3	A Síndrome Mielodisplásica	4
1.4	A Síndrome Mielodisplásica na Infância	7
1.5	Aspectos Moleculares	10
1.6	Alterações Citogenéticas e SMD	13
1.7	Metilação e SMD	13
2	OBJETIVOS	20
2.1	Objetivo Geral	20
2.2	Objetivos Específicos	20
3	MATERIAL E MÉTODOS	22
3.1	Casuística	22
3.2	Extração, Quantificação e Avaliação do DNA	23
3.3	Tratamento com Bissulfito de Sódio	24
3.4	Reação de <i>MSP</i> (<i>Methylation Specific</i> PCR)	25
3.5	Variáveis do Estudo	26
3.6	Análise Estatística	27
3.7	Aspectos Éticos	27
4	RESULTADOS	31
4.1	Casuística	31
4.2	Tratamento com Bissulfito de Sódio e <i>MSP</i> de Pequenas Quantidades de DNA	34
4.3	Padronização da Extração de DNA de Esfregaço de Medula Óssea	35
4.4	Extração, Quantificação e Avaliação do DNA Extraído das Amostras de Medula Óssea	37

4.5	Perfil de Metilação para as Amostras de Medula Óssea dos Indivíduos sem SMD e dos Pacientes com SMD	39
4.6	Correlação entre os Dados Demográficos, Clínicos e Laboratoriais e o Padrão de Metilação dos Genes	45
4.6.1	Correlação do Padrão de Metilação dos Genes <i>CALCA</i> , <i>GSTP1</i> e <i>CDKN2B</i>	45
4.6.1.1	Com os parâmetros demográficos e clínicos	45
4.6.1.2	Com os parâmetros laboratoriais (hemograma)	48
4.6.1.3	Com a sobrevida global	51
5	DISCUSSÃO	52
6	CONCLUSÕES	67
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	68

ANEXO

Anexo I Termo de consentimento pós-informado.

Anexo II Apresentação dos dados individuais para cada um dos pacientes incluídos no estudo.

1 INTRODUÇÃO

1.1 HEMATOPOESE

A medula óssea (MO), um dos maiores órgãos do corpo humano, é o sítio de formação das células sanguíneas pós-nascimento. No adulto normal, a MO é responsável pela produção e exportação, para o sangue periférico (SP), de cerca de 2,5 bilhões de hemácias, 2,5 bilhões de plaquetas e 1 bilhão de granulócitos por quilo de massa corpórea por dia. Essa atividade pode ser aumentada em até 10 vezes quando necessário, como em casos de resposta inflamatória (ROTHSTEIN 1993).

A hematopoese começa na vida intra-uterina e apresenta diferentes sítios de acordo com o desenvolvimento. Até os 2 meses de vida intra-uterina os sítios hematopoéticos se concentram no saco vitelínico, entre 2 e 9 meses, principalmente no fígado (e baço, em menor proporção) e a partir do nascimento na MO. A MO origina-se dos corpos vertebrais e os primeiros espaços medulares são supridos por vasos sanguíneos e células reticulares adventícias do tecido conectivo. Estas estruturas irão formar o estroma medular e seu microambiente condicionador que, numa etapa futura, permitirão o assentamento e colonização das células-tronco, bem como a proliferação e maturação das futuras células sanguíneas.

A MO pode ser subdividida em dois grupos distintos, o estroma e o parênquima medular. O estroma medular é formado por uma complexa malha de vasos sanguíneos, organizada em unidades repetidas. Pequenos vasos retornam a cavidade medular combinando-se para formar sinusóides venosos, os quais são

rodeados de tecido hematopoético. A parede desses sinusóides é formada por uma camada unicelular que aparenta ser uma membrana basal. Essa membrana é contínua e as células da MO passam para a corrente sanguínea penetrando entre essas células endoteliais, sendo esse processo mediado por fatores que modulam e possibilitam essa passagem. O estroma é também formado por células reticulares adventícias do tecido conectivo, o qual ancoram o tecido hematopoético ativo na MO. O parênquima medular é formado pelas células hematopoéticas originais derivadas das células-tronco, e que se constituem nas linhagens eritróide, granulocítica (neutro/eosino/basofílica), monocítica e megacariocítica (ROTHSTEIN 1993, ALBERTS et al. 1994).

Sob o ponto de vista funcional, as células hematopoéticas podem ser agrupadas em três classes, que abrangem um espectro de células em diferentes momentos de diferenciação (Figura 1). A classe das células-tronco (CT) apresenta grande capacidade de se auto-renovar, bem como de originar as múltiplas linhagens hematopoéticas. No estágio subsequente de diferenciação, encontra-se a classe das células progenitoras que se originam a partir das células-tronco e são morfológicamente indistinguíveis entre si, sendo que a diferença entre elas só pode ser evidenciada pela sua capacidade de formar linhagens celulares diferentes. A próxima classe é a dos precursores (blastos), na qual as células progenitoras adquirem características antigênicas permitindo sua diferenciação em sub-linhagens, ou seja, perdem características de multilinhagem ganhando especificidade. Estas células são largamente estocadas na MO, o que permite um rápido recrutamento e migração destas para o sangue periférico e tecidos quando necessário (ROTHSTEIN 1993; ALBERTS et al. 1994).

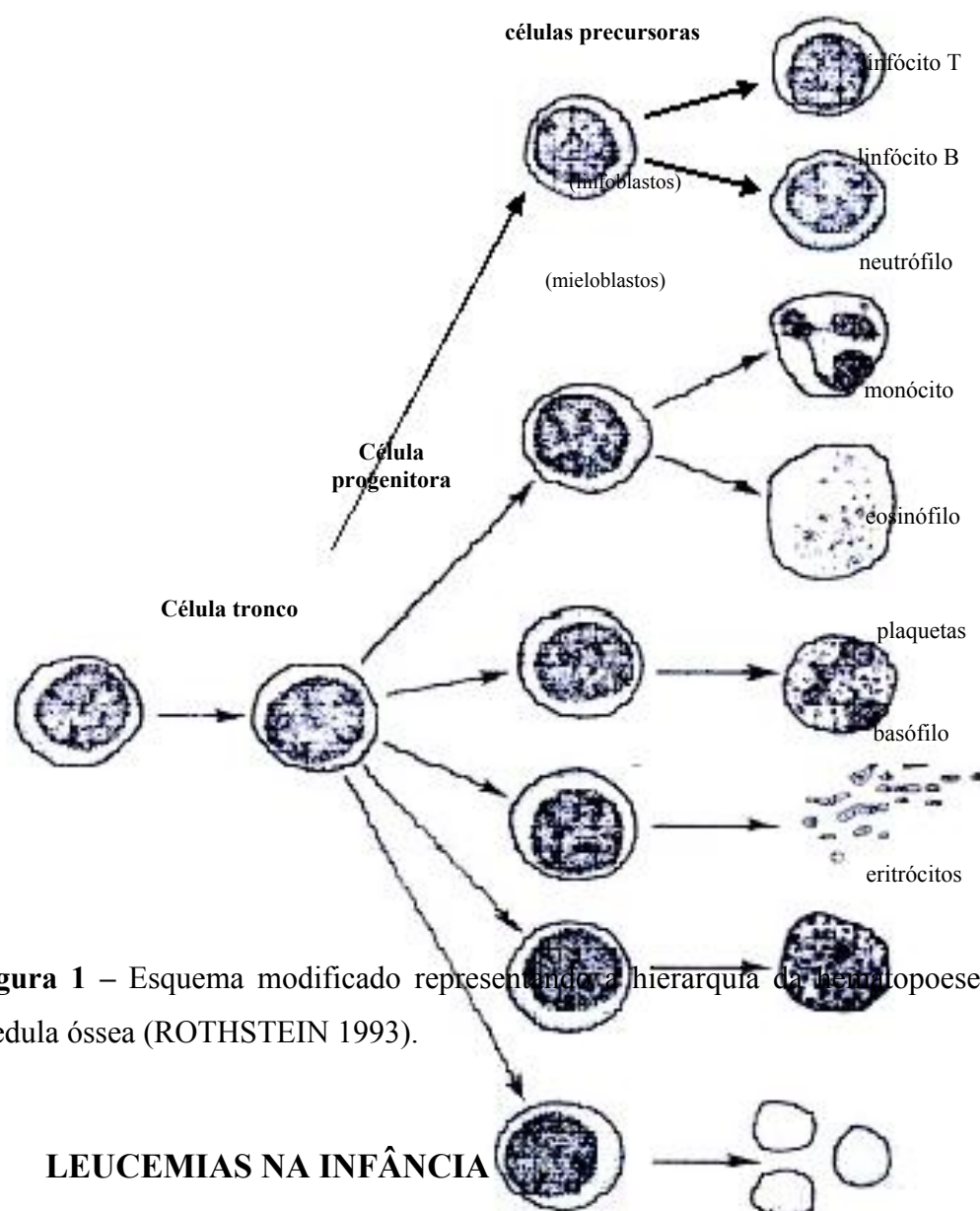


Figura 1 – Esquema modificado representando a hierarquia da hematopoiese na medula óssea (ROTHSTEIN 1993).

1.2 LEUCEMIAS NA INFÂNCIA

Apesar de rara, a leucemia é a doença maligna mais comum na infância correspondendo aproximadamente a 30% dos casos de câncer pediátrico. Oitenta e cinco por cento (85%) das crianças apresentam leucemia linfocítica aguda (LLA), 10% apresentam leucemia mielóide aguda (LMA) e 5% leucemia mielóide crônica (LMC). As leucemias linfocíticas crônicas não se manifestam na infância (GOLUB e ARCECI 2002).

As LLAs têm pico de incidência entre os 2 e 5 anos de idade. Nos Estados Unidos (E.U.A), são diagnosticadas aproximadamente 2.500 a 3.500 crianças com LLA por ano, apresentando uma incidência de 30 ou 40 casos novos por milhão por ano em crianças abaixo dos 14 anos de idade (ROTHSTEIN 1993).

A LMA representa um grupo heterogêneo de desordens hematológicas que se originam dentro da medula óssea nos precursores das linhagens celulares mielóide, monocitóide, eritróide e megacariocítica. Pode ser considerada como evento primário (LMA *de novo*), como evento secundário (LMA pós-quimioterapia) ou como resultado de uma transformação a partir de um prévio estado mielodisplásico (t-MDS/AML) (GOLUB e ARCECI 2002).

1.3 A SÍNDROME MIELODISPLÁSICA

A Síndrome Mielodisplásica (SMD) abrange um grupo heterogêneo de desordens clonais de células hematopoéticas que acomete principalmente indivíduos adultos de meia idade ou idade avançada (50 a 70 anos). A SMD é caracterizada por baixa celularidade (citopenia) do sangue periférico, hiper celularidade da medula óssea, alterações morfológicas em uma ou mais linhagens celulares e pela possibilidade de transformação leucêmica. A SMD portanto já foi chamada de pré-leucemia, uma vez que existe a possibilidade de transformação para LMA em uma proporção significativa de pacientes (HASLE et al. 1999; MIYAZATO et al. 2001; TORRE et al. 2002) podendo também ocorrer mais raramente a transformação para LLA (SATO et al. 2004). Este fenômeno sugere que, de fato, a célula que dá origem a SMD pode originar-se de uma célula progenitora hematopoética multipotente

(segundo estágio de diferenciação), ou até mesmo da célula-tronco onipotente e indiferenciada (primeiro estágio) (STEENSMA e TEFFERI 2003). O tempo necessário para a transformação para LMA (t-MDS/AML) pode variar de uma forma consideravelmente lenta (anos) até aquelas com rápida transformação (2 ou 3 meses). Sendo que, nos adultos essa transformação, quando ocorre, parece ser mais lenta do que nas crianças (LUNA-FINEMAN et al. 1999; LOPES e LORAND-METZE 1999; LOPES et al. 2002; WOODS et al. 2002).

A SMD pode ocorrer como uma desordem hematopoética primária, ou seja SMD *de novo*, ou pode ser um evento secundário, após o tratamento quimioterápico de outros tipos de tumores primários com agentes alquilantes (e.g. ciclofosfamida), agonistas e antagonistas de topoisomerase II (e.g. etoposide) ou ainda após o tratamento com radioterapia, por meio de radiação ionizante. A SMD secundária foi primeiramente descrita em pacientes tratados para a doença de Hodgkin, mielomas múltiplos, câncer de ovário e recentemente após altas doses de quimioradioterapia (HASLE et al. 1999; MIYAZATO et al. 2001; LOPES et al. 2002; WOODS et al. 2002).

Em 1982, o grupo *French-American-British* (FAB) propôs uma classificação baseada na morfologia das células e na porcentagem de blastos encontrados no sangue periférico e na medula óssea. Segundo esta classificação, as SMD podem ser divididas em cinco grupos: a) anemia refratária (RA), caracterizada pela presença de até 1% de blastos no SP e menos de 5% de blastos em MO com hiperplasia eritróide e discreta eritropoese; b) RA com sideroblasto anelado (RARS), que é semelhante a RA, entretanto apresenta dismorfismo na morfologia das células vermelhas no SP e a presença de sideroblastos e mais de 15% de precursores eritróides em MO; c) RA

com excesso de blastos (RAEB), apresentando menos que 5% de blastos e citopenia de 2 ou 3 linhagens hematopoéticas em SP e com 5 a 20% de blastos e 2 ou 3 linhagens apresentando dismorfismo em MO; d) RA com excesso de blastos em transformação (RAEB-t), apresentando 5 a 29% de blastos e bastonetes de Auer no SP e 20 a 30% de blastos e bastonetes de Auer na MO, além das demais alterações descritas para a RAEB; e e) a Leucemia Mielomonocítica Juvenil (LMMJ), caracterizada pela presença de até 5% de blastos, mais de 1×10^9 monócitos/L de SP e a presença de 1 a 20% de blastos com monocitose em MO (BENNETT et al. 1982).

A incidência da SMD, atualmente, é bastante discutida devido a dificuldade de se obter estimativas precisas, uma vez que a classificação desta doença somente foi estabelecida em 1982. Ainda assim, alguns casos de SMD permanecem inclassificáveis, apresentando dificuldade para o diagnóstico. Em meados de 1970, nos E.U.A, a incidência da SMD foi estimada em 1.500 novos casos por ano. Entretanto, estimativas mais recentes sugerem um número no mínimo 10 vezes maior. Se comparado à incidência da SMD em relatos de estudos ingleses, que demonstraram taxas de 9,3 a 12,6 casos por 100.000 habitantes por ano, somente nos E.U.A deveriam ser diagnosticados mais de 30.000 novos casos de SMD anualmente. Dessa forma, acredita-se que se levando em conta apenas as estimativas mais conservadoras (2 a 4 casos por 100.000 habitantes por ano), a ocorrência da SMD de adultos seja pelo menos tão comum como a LMA (STEENSMA e TEFFERI 2003).

A partir do estabelecimento da classificação FAB em 1982, muitos estudos foram propostos com intuito de avaliar uma série de fatores para a criação de um sistema de escore para a predição de prognóstico dos pacientes acometidos por SMD, ou seja, fatores esses significantes para prever a história natural da doença

(progressão para LMA), bem como a sobrevida desses pacientes (STEENSMA e TEFFERI 2003). O estudo mais utilizado atualmente com este intuito é o *International Prognostic Scoring System* (IPSS) desenvolvido por GREENBERG et al. em 1997. Neste trabalho, com a realização de uma análise multivariada de 816 pacientes adultos acometidos por SMD *de novo*, sem prévio tratamento, os autores utilizaram fatores (porcentagem de blastos na MO, cariótipo e citopenias em SP) que permitem agrupar os pacientes em grupos de risco bem definidos (baixo risco, risco intermediário 1, risco intermediário 2 e alto risco) que apresentam média de sobrevida (em anos) de 5,7, 3,5, 1,2, 0,4, respectivamente (GREENBERG et al. 1997).

1.4 A SÍNDROME MIELODISPLÁSICA NA INFÂNCIA

A SMD é relativamente incomum em crianças, representando em torno de 3% a 7% das malignidades hematológicas pediátricas e ao contrário dos adultos, na infância ocorre a predominância dos subtipos morfológicos mais agressivos da doença, no caso RAEB, RAEB-t e LMMJ. O prognóstico para essa doença na infância é desfavorável, sendo que a maioria dos pacientes evolui a óbito, apresentando sobrevida, para aquelas crianças que não disponibilizam de doador de medula óssea compatível para transplante, de apenas 20-25% em 5 anos nos subgrupos RAEB e RAEB-t, de acordo com dados do Grupo Cooperativo Brasileiro de Síndrome Mielodisplásica em Pediatria (GCB-SMD-PED) (LOPES e LATORRE 2003). Esta baixa taxa de sobrevida se deve, principalmente, em decorrência da transformação leucêmica ou por posteriores complicações, como infecções e hemorragias. Em crianças a transformação leucêmica é mais rápida e pode ser vista

em 15 a 70% dos pacientes, dependendo do tipo de SMD e da faixa etária do paciente, sendo que nesta faixa os pacientes também apresentam maior risco de transformação leucêmica (JAKAB et al. 1999; LOPES et al. 2002; WOODS et al. 2002).

Algumas anormalidades congênitas estão associadas ao desenvolvimento da SMD na infância como a síndrome de Down, a anemia de Fanconi (associação com genes de reparo a danos no DNA), a neurofibromatose tipo 1 (associada a fatores de crescimento e apoptose), entre outras (GOLUB e ARCECI 2002).

Apesar de ainda ser usada em crianças, a classificação FAB está gerando amplo debate na comunidade científica, pois teve como base a SMD de adultos tendo-se mostrado inconsistente e imprecisa para abordagem na infância (HASLE e KERNDRUP 2001; MANDEL et al. 2002). Desde 1982, outros autores (BADER-MEUNIER et al. 1996; HARRIS et al. 1999) vêm propondo classificações para a SMD pediátrica, sendo a mais recente a de HASLE et al. (2003) que classifica a SMD na infância em três grupos principais: a) doença mielodisplásica/ mieloproliferativa, a qual inclui LMMJ, b) doença (SMD/LMA) relacionada à Síndrome de Down e c) SMD *de novo*, a qual teve os subgrupos RAEB (2 a 19% de blastos em SP ou 5 a 19% de blastos em MO) e RAEB-t (20 a 29% de blastos em SP ou MO) mantidos, como na classificação FAB. Essa nova classificação enfatiza os subtipos pediátricos de SMD, unindo os subgrupos RA e RARS dentro de uma nova classe denominada citopenias refratárias (RC).

Segundo dados do grupo brasileiro (PAULA 2004), 56,9% dos pacientes diagnosticados com SMD são do subtipo RAEB e quando agrupados, os casos de RAEB-t, esse número sobe para 61,2%, de acordo com a classificação FAB. Em

relação a outros grupos internacionais, a maioria dos casos se concentra nas LMMJ assim como na China com 45,8% dos casos (CHAN 2003), no Canadá com 37,2% (LUNA-FINEMAN et al. 1999) e no Reino Unido com 49,6% (PASSMORE et al. 2003). A LMMJ é apontada como um subtipo de SMD e considerada uma síndrome mieloproliferativa que se comporta diferentemente dos outros subtipos de SMD. No trabalho de WOODS et al. (2002) os autores relatam 2,7% de RA, 44,5% de RAEB e 35,1% de RAEB-t, dados esses semelhantes aos achados do grupo brasileiro.

A carência de dados em relação a SMD pediátrica reflete a falta de conhecimento de algumas formas existentes de SMD (HASLE et al. 1999; MANDEL et al. 2002). Assim, até o presente momento apenas três estudos populacionais enfocando a SMD pediátrica foram realizados. Segundo estes estudos, na Dinamarca, a SMD infantil representa 9% de todas neoplasias hematológicas da infância, tendo uma incidência anual de 1,8 casos/milhão/crianças < 14 anos (HASLE et al. 1995), no Canadá, representa 6% (HASLE et al. 1999) e na Inglaterra, 4,3% com uma incidência anual de 0,8 casos/milhão/crianças < 14 anos (PASSMORE et al. 2003). Os autores procuram abranger todos tipos já conhecidos de SMD na faixa pediátrica, sendo que essa discrepância de resultados pode ser explicada pelo fato de que a incidência possa estar sub ou superestimada devido aos diferentes critérios diagnósticos adotados por cada grupo, como a contagem de blastos, inclusão ou não de síndromes associadas entre outros. Esforços recentes têm sido empregados na tentativa de se chegar a uma estimativa de incidência mais precisa (HASLE et al. 1999; MANDEL et al. 2002).

Atualmente, não há na literatura um sistema de predição de prognóstico desenvolvido a partir de pacientes pediátricos com SMD. Dessa forma, os sistemas de

escore prognóstico embasados em características de pacientes adultos, quando aplicados a infância não atingem resultados satisfatórios. Estudos desenvolvidos pelo Grupo de Trabalho Europeu em SMD da Infância (EWOG-MDS) (HASLE et al. 2000), no Japão (SASAKI et al. 2001) e na Inglaterra (PASSMORE et al. 2003) avaliaram o uso do IPSS em SMD pediátrica e todos chegaram a conclusão que o sistema é limitado para o emprego em pediatria. Na infância, o único fator que parece ser relevante para o prognóstico dos pacientes é a anormalidade citogenética, especialmente a monossomia do cromossomo 7 (PASSMORE et al. 2003).

A imprecisão no diagnóstico e na classificação da SMD pediátrica parece influenciar nas estratégias de tratamento. Muitos casos não apresentam progressão apesar de não receber qualquer forma de tratamento, enquanto que, outros mostram curso severo da doença embora seja empregada uma quimioterapia intensiva. Dessa forma, ainda hoje, não existe um consenso a respeito de alguma terapia efetiva para esses pacientes. No momento, apenas o transplante de medula óssea (TMO) alogênico oferece a cura potencial para a doença. (JAKAB et al. 1999).

1.5 ASPECTOS MOLECULARES

A progressão histopatológica do tecido normal para o câncer é um processo de múltiplos passos, no qual várias lesões genéticas críticas se acumulam culminando na transformação cancerígena. O desenvolvimento e progressão da SMD a partir de estágios precoces até estágios mais avançados da doença e sua eventual transformação para leucemia parecem estar de acordo com este conceito (STEENSMA e TEFFERI 2003). Por isso, a SMD representa um excelente modelo de

desenvolvimento leucêmico com aumento progressivo de blastos envolvendo a medula óssea. Embora, anormalidades cromossômicas possam ser demonstradas em 50-60% dos casos *de novo*, alterações moleculares responsáveis pelo início e evolução dessa desordem ainda são desconhecidas (QUESNEL et al. 1998; TIEN et al. 2001).

Alterações que ocorrem exclusivamente ou mais comumente em células cancerígenas podem ser usadas para identificar estas células, sendo importantes na detecção do câncer em estágios mais precoces (antes da manifestação clínica), na determinação de prognóstico, no monitoramento da progressão da doença e na determinação da resposta a terapia (SIDRANSKY 2002).

A identificação dessas alterações no seguimento de doenças hematopoéticas pode ser importante para a avaliação da evolução dos pacientes (LEITH e WILLMAN 1996), como mutações nos genes associados à perda do controle de crescimento celular nas LLA que conferem pior prognóstico a esses pacientes. Estudos utilizando tais alterações no monitoramento da resposta a terapia estão resultando em importantes achados sobre a biologia das leucemias (APPELBAUM 1999), como em relação à sensibilidade ou resistência das células leucêmicas a determinadas classes de drogas.

Mutações que ocorrem no gene supressor de tumor, *TP53* e em oncogenes da família *RAS* também têm sido descritas nas SMD, entretanto suas incidências ainda permanecem incertas. Mutações no gene *TP53* estão associadas em 5 a 10% dos casos em adultos, principalmente nos que apresentam doença mais avançada e cariótipo complexo (HIRAI 2003). Alterações no *TP53* cooperam com a ativação de oncogenes como o *RAS*, contribuindo para tumorigênese. A família gênica *RAS* é composta por

uma série de elementos regulatórios críticos na transdução de sinal, proliferação celular e manutenção do fenótipo maligno. Sabe-se que os genes dessa família são ativados por mutações pontuais e dentre elas as mutações no *N-ras* são as mais freqüentes, estando presentes em 10 a 15% dos casos de SMD de adultos, sendo associadas a uma menor sobrevida e a maior probabilidade de transformação leucêmica (HIRAI 2003; MUFTI et al. 2003). A associação de mutações responsáveis pela ativação de oncogenes da família *RAS* ou inativação do *NFI* coexistindo com alterações do cromossomo 7 é observada em muitas crianças com SMD sugerindo que essas alterações podem cooperar para o processo de leucemogênese (LUNA-FINEMAN et al. 1999).

Polimorfismos em certos genes também estão associados com o aumento da suscetibilidade ao câncer. O benzeno, um potente agressor da medula óssea, é parcialmente inativado pela enzima quinona redutase codificada pelo gene *NQO1*. A substituição de um aminoácido em determinada seqüência desse gene gera uma mutação “missense” que em homozigose inativa completamente a ação enzimática da quinona redutase, tornando o paciente mais suscetível a desenvolver a SMD (NAOE et al. 2000). Alterações nos genes *GSTT1* e *GSTM1*, detoxificadores de carcinógenos como os agentes alquilantes, também são encontradas em pacientes com SMD e LMA, entretanto parecem ser eventos independentes na evolução da doença, não sendo relacionados a alterações cromossômicas ou a mutações em genes como o *TP53* e *RAS*. Esses fatos também sugerem a relação entre o polimorfismo de alguns genes e o aumento da suscetibilidade a SMD (SASAI et al. 1999).

1.6 ALTERAÇÕES CITOGENÉTICAS E SMD

Muitas alterações citogenéticas já foram descritas para SMD e entre as mais comuns estão as deleções totais ou parciais dos cromossomos 5, 7, 11, 12, 20 e a trissomia do cromossomo 8 (HOFMANN et al. 2004), sendo que algumas dessas também estão presentes na t-MDS/AML (AKTAS et al. 2000; GOLUB e ARCECI 2002; TORRE et al. 2002; WOODS et al. 2002).

Na criança, as alterações cromossômicas mais frequentes envolvem o cromossomo 7, tais como monossomia 7 (-7) ou deleção 7q (-7q) que estão presentes em 55 a 70% dos casos, seguida por trissomia do cromossomo 8. A monossomia 7 está associada a um pior prognóstico da doença nessas crianças, pois se acredita que nessa região estejam localizados um ou mais genes supressores de tumor ou ainda genes envolvidos no controle da hematopoese (HASLE et al. 1999; PASSMORE et al. 2003). A trissomia 8 em crianças está presente em torno de 5% dos casos, sendo a segunda alteração cromossômica mais encontrada (PASSMORE et al. 2003).

A deleção 5q, também conhecida como a síndrome 5q-, é a alteração cromossômica mais comum na SMD de adultos e está presente em aproximadamente 20% dos pacientes acometidos por esta doença sendo associada a um bom prognóstico (HOFMAN et al. 2004).

1.7 METILAÇÃO E SMD

A pesquisa nos últimos 10 anos indica que alterações epigenéticas desempenham um papel importante no processo de tumorigênese (MOMPARLER

2003). Fatores epigenéticos são aqueles que alteram o fenótipo sem alterar o genótipo, ou seja, não causam alterações na sequência de DNA (FEINBERG 2001).

A metilação, principal processo epigenético envolvido na regulação da expressão gênica, é um processo biológico que consiste na adição de um radical metil (CH_3) nas bases nitrogenadas citosinas (C) que estão localizadas na posição 5' de guaninas (G). Este fenômeno pode ser frequentemente observado nas ilhas de CpG, que são sequências de DNA que apresentam uma alta concentração do dinucleotídeo CG e estão presentes, principalmente, nas regiões promotoras dos genes (MOMPARLER 2003). A presença destes radicais metil na região promotora dos genes está associada a supressão da expressão gênica. (MOMPARLER 2003; LAIR 2003).

As DNA metiltransferases (DNMT) são um grupo de enzimas (DNMT1, DNMT1b, DNMT1o, DNMT1p, DNMT2, DNMT3a, DNMT3L e DNMT3b com suas isoformas) responsáveis por transferir o radical metil para a citosina (DAS e SINGAL 2004). O primeiro gene de DNMT identificado em organismos eucariotos foi clonado em camundongos há quase uma década, o *Dnmt1*. Este gene é conservado entre os organismos eucariotos e ortólogos deste gene foram identificados em várias espécies, incluindo a humana (*DNMT1*). A DNMT1 é responsável pela manutenção dos padrões de metilação e apresenta uma alta afinidade com substratos hemimetilados. Essa enzima também é capaz de promover a metilação *de novo* em células adultas e esse mecanismo pode ser estimulado por estruturas de DNA aberrante e resíduo de citosinas metiladas em simples ou dupla fita de DNA. As DNMT3a e DNMT3b também são responsáveis por estabelecer os padrões de

metilação *de novo*, que então serão mantidos pela DNMT1 (SINGAL e GINDER 1999; JONES e BAYLIN 2002; DAS e SINGAL 2004).

Um dos mecanismos utilizados pelas células humanas normais para regular a expressão de determinados genes é a metilação, sendo que o padrão de metilação do DNA é conservado após a duplicação e divisão celular pela atividade da DNMT1. Nessas células a metilação também está envolvida em processos como a inativação do cromossomo X na mulher e no *imprinting* genômico (JONES e LAIRD 1999; MOMPARLER 2003).

Apesar do conhecimento de que a metilação do DNA pode atuar com um regulador negativo da transcrição gênica, os mecanismos envolvidos nesta regulação ainda não estão completamente definidos. Três possíveis mecanismos podem explicar a repressão transcricional devido a metilação do DNA. O primeiro refere-se a interferência direta dos grupos metil que impedem a ligação de fatores de transcrição ao DNA. Alguns fatores de transcrição, como E2F e NF- κ B, reconhecem seqüências contendo dinucleotídeos CpG, entretanto essa ligação é impedida quando esses resíduos apresentam-se metilados (JONES e LAIRD 1999). O segundo seria a ligação de repressores transcricionais específicos, conhecidos como as proteínas ligantes da citosina metilada, as quais reconhecem e se ligam a seqüências de DNA metilado por meio de domínios de ligação ao CpG metilado, o que por sua vez também impediria a ligação de fatores de transcrição ao DNA. A MeCP1 e MeCP2 foram as primeiras proteínas descritas que fazem parte desta classe de repressores e também já foram descritas como envolvidas no mecanismo de repressão transcricional de *Neurospora*. Atualmente, outras proteínas foram descritas, incluindo a MBD1, MBD2, MBD3, MBD4 e Kaiso (DAS e SINGAL 2004). O terceiro mecanismo pelo qual a metilação

pode mediar a repressão transcricional é pela alteração da estrutura da cromatina. As proteínas MeCP2, MBD2 e MBD3 formam complexos que contém deacetilases de histonas (HDAC), enzimas que removem o grupo acetil das histonas permitindo assim, uma compactação da cromatina, o que dificulta ainda mais a ligação dos fatores de transcrição ao DNA (SINGAL e GINDER 1999; DAS e SINGAL 2004). Acredita-se que os três mecanismos atuem em sinergismo.

A hipótese postulada por Knudson de que seria necessário a ocorrência de dois eventos para a completa inativação de genes supressores de tumor é crucial para o entendimento do processo de tumorigênese. Acreditava-se que esses eventos só poderiam ocorrer como consequências de danos ao genoma, os quais são descritos como perdas do material cromossômico ou mutações da informação genética, o que provoca grandes perdas na atividade gênica e, portanto predispõe ao desenvolvimento do câncer. Atualmente, o fato da metilação de promotores gênicos estar associada ao silenciamento da transcrição e a observação desta alteração em células tumorais, pode sugerir que esta seria uma via em potencial a ser acrescentada na teoria de Knudson para inativação de genes supressores de tumores (DAS e SINGAL 2004).

Recentemente, tem sido observado com frequência a ocorrência de metilação exacerbada (hipermetilação) nas regiões promotoras de genes normamente não metilados, nas células normais, em um grande número de tumores. Estes genes estão, geralmente, envolvidos no controle do ciclo e morte celular, como *CDKN2B*, *CDKN2A*, *p14^{ARF}*, *p73* e *DAPK* (ESTELLER et al. 1999), com o sistema de reparo de DNA, como *MGMT*, na supressão do processo de metástase, como *TIMP-3* (ZÖCHBAUER-MÜLLER et al. 2001), com a supressão tumoral, como *APC* e *HIC1*, e genes envolvidos em adesão celular, como *CDH1* e *CDH13* (MARUYAMA et al.

2001). A hipermetilação parece ocorrer em estágios precoces do desenvolvimento tumoral e aumenta, progressivamente, com o desenvolvimento do fenótipo maligno. A detecção de metilação anormal ou hipermetilação tem sido utilizada como um marcador em potencial para o câncer (HERMAN et al. 1998; ESTELLER et al. 1999; JONES e LAIRD 1999; SANCHEZ-CESPEDES et al. 2000; MOMPARTLER 2003). Alterações epigenéticas, como a metilação, são freqüentemente encontradas em pacientes adultos com LMA e LLA, e também já foram relatadas na SMD (PREISLER et al. 2001; CHEN e WU 2002).

Alguns grupos já avaliaram a freqüência e a importância da hipermetilação da região promotora de alguns genes em pacientes com SMD. Todos estes estudos enfocaram a SMD em idade adulta e concentraram seus esforços em dois genes inibidores de ciclinas dependentes de quinases (CDKI), *CDKN2B* e *CDKN2A*, que estão envolvidos no controle do ciclo celular, e no gene *CALCA* (calcitonina) que está envolvido com a regulação dos níveis de cálcio no sangue. UCHIDA et al. (1997) demonstraram a hipermetilação de *CDKN2B* em 78% dos pacientes adultos que apresentavam RAEB e RAEB-t, e também em pacientes que evoluíram para LMA. QUESNEL et al. (1998) observaram a hipermetilação desse gene em 73% dos pacientes adultos de alto risco, segundo o *IPSS*, e em 100% dos pacientes com transformação leucêmica. TIEN et al. (2001) também obtiveram resultados semelhantes e ainda associaram o aumento na freqüência de hipermetilação desse gene de acordo com a progressão da doença quando realizado o acompanhamento e monitoramento da mesma. Todos esses trabalhos associaram a hipermetilação de *CDKN2B* com maior risco de progressão para LMA e também com um pior prognóstico para os pacientes adultos. Ao contrário de *CDKN2B*, o gene *CDKN2A* foi

demonstrado como não metilado (0%) em pacientes adultos com SMD (UCHIDA et al. 1997).

IHALAINEN et al. (1993) encontraram hipermetilação de *CALCA* em 92 % dos pacientes adultos estudados. Dos pacientes que se apresentavam metilados para este gene faziam parte todos os pacientes de baixo risco, segundo o *IPSS*, que tinham RA, sugerindo o envolvimento precoce da hipermetilação desse gene na cascata de desenvolvimento da SMD até t-MDS/AML. DHODAPKAR et al. (1995) mostraram a hipermetilação do gene *CALCA* em 65% de pacientes adultos com SMD, não relacionando com os subtipos da doença, entretanto demonstrando pior prognóstico para esses pacientes por predizer uma possível transformação leucêmica.

Outros genes têm sido avaliados quanto ao seu padrão de metilação em desordens hematopoéticas, principalmente nas leucemias agudas. O gene *CDHI*, envolvido na adesão celular, foi descrito como hipermetilado em 32 a 78% de pacientes com LMA e em 53% de pacientes com LLA. O gene *HIC1*, candidato a gene supressor tumoral, está hipermetilado em 10% dos pacientes com LMA e em 50 a 100% para LLA (LEONE et al. 2002). O gene *GSTP1* não apresenta alta frequência de hipermetilação na LMA (MELKI et al. 1999) e o gene *p73* também demonstrou baixa frequência de metilação (18%) em LLA (GARCIA-MANERO et al. 2003).

Além desses, os perfis de metilação de outros genes como o *p14^{ARF}*, *MGMT*, *APC*, *RARβ*, *CDHI3*, *DAPK* e o *TIMP-3* têm sido investigados em uma série de outros tipos de tumores, em adultos, como os de cavidade oral, pulmão, mama, cólon, próstata e bexiga (TSUCHIYA et al. 2000; MARUYAMA et al. 2001; ZÖCHBAUER-MÜLLER et al. 2001).

Devido à carência de dados em estudos moleculares que abordam a SMD na infância, aos recentes estudos que descrevem a ocorrência de metilação em alguns genes nas leucemias agudas da infância e na SMD de adultos e aos achados em relação ao tratamento de pacientes adultos com SMD utilizando-se drogas desmetilantes, o presente estudo buscou avaliar a frequência de metilação de 14 genes nas SMD da infância e verificar seu impacto na evolução dos pacientes acometidos por esta desordem hematopoética.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

O presente trabalho visa estabelecer a frequência de metilação da região promotora de genes alvos nas síndromes mielodisplásicas da infância, dos subtipos RAEB e RAEB-t.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Determinar a frequência de metilação da região promotora dos genes *CDKN2B*, *CDKN2A*, *CALCA*, *CDH1*, *HIC1*, *GSTP1*, *p73*, *p14^{ARF}*, *MGMT*, *APC*, *RAR β* , *CDH13*, *DAPK* e *TIMP-3* em amostras de medula óssea de pacientes em idade pediátrica com SMD e em amostras de medula óssea sem neoplasia.
2. Determinar a frequência de metilação da região promotora dos genes mais frequentemente metilados, definidos na etapa anterior, em amostras de lâminas de esfregaço de medula óssea de pacientes em idade pediátrica com SMD.

3. Correlacionar os dados clínico-laboratoriais dos pacientes acometidos pela SMD pediátrica com a frequência de metilação das regiões promotoras dos genes estudados.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 CASUÍSTICA

Foram incluídas neste estudo 30 amostras de medula óssea total de pacientes com idade pediátrica (0 a 16 anos) acometidos por Síndrome Mielodisplásica, subgrupos RAEB ou RAEB-t, diagnosticados no período de agosto de 1989 a outubro de 2003, sendo 12 amostras de MO total a fresco e 18 amostras de esfregaço de MO. Todas as amostras foram provenientes do Grupo Cooperativo Brasileiro em Síndrome Mielodisplásica Pediátrica (GCB-SMD-PED), incluindo os casos do Departamento de Pediatria – Hospital A.C. Camargo – S.P.

Como controle de MO sem neoplasia foram utilizadas 2 amostras de medula óssea total a fresco colhidas de pacientes pediátricos cardiopatas encaminhados para cirurgia cardíaca no Instituto Dante Pazzanese de Cardiologia (IDPC/SP). Também foram incluídas 10 amostras de esfregaço de MO, colhidas pelo Departamento de Pediatria – Hospital A.C. Camargo – S.P, no momento do estadiamento, de pacientes pediátricos acometidos por retinoblastoma intraocular sem infiltração da MO (essas MO foram consideradas sem neoplasia), no período de dezembro de 2001 a janeiro de 2004.

As amostras de MO total a fresco foram coletadas em EDTA, separadas em alíquotas de 600µl e estocadas a -70°C.

As amostras foram colhidas e utilizadas após assinatura do termo de consentimento pós-informado pelos pais ou responsáveis pelos pacientes (anexo I).

3.2 EXTRAÇÃO, QUANTIFICAÇÃO E AVALIAÇÃO DO DNA

Para a extração do DNA das amostras de medula óssea total foi utilizado o kit *Perfect gDNA Blood Mini (Eppendorf)*, conforme protocolo fornecido pelo fabricante. Essa extração consistiu na digestão do tecido com a enzima Proteinase K, seguido da ligação e lavagem do DNA em uma coluna de filtração e sua posterior eluição.

Para extração do DNA das amostras de esfregaço de MO foi utilizado o kit *Nucleon HT for Hard Tissue (Amersham)*. O tecido foi previamente retirado de uma lâmina de esfregaço (raspado) com auxílio de lâmina de bisturi e posteriormente submetido a extração de DNA, conforme protocolo fornecido pelo fabricante. Resumidamente, essa extração consistiu na digestão do tecido com Proteinase K, desproteinização com uma solução de perclorato de sódio, extração do DNA com clorofórmio, seguida de precipitação do DNA com etanol absoluto e subsequente lavagem com etanol a 70%.

Os DNAs extraídos a partir de MO total a fresco foram quantificados por espectrofotômetro (*GENEQUANT pro - Amersham*) e diluídos para obter-se uma concentração final de 50ng/μl. Para se avaliar a qualidade do DNA foi realizada uma reação de PCR utilizando iniciadores desenhados nos íntrons 12 e 13 do gene *hMLH1* (*human mult-L homologue 1* – NM_000249) (*Direto* - 5' TTG TGT CTC TAG TTC TGG 3' e *Reverso* - 5' CAT TGT TGT AGT AGC TCT GC 3'). Com o uso desses iniciadores intrônicos, a amplificação de um fragmento de 252 pares de base indica a presença do DNA genômico na amostra. Essa reação foi realizada sob as seguintes condições: 1,5 mM de MgCl₂, 0,2mM de dNTPs, 0,3μM de cada iniciador, 1X

Tampão de PCR, 1,5U de *Taq DNA Polymerase* (Invitrogen) e 2µl de DNA (50ng/µl) em um volume final de reação de 25µl. O programa de PCR utilizado foi: 94°C por 5 minutos; 35 ciclos de 94°C por 30 segundos, 60°C por 45 segundos e 72°C por 45 segundos; 72°C por 7 minutos. Para a visualização dos produtos amplificados as amostras foram aplicadas em gel de poliacrilamida a 8% e coradas com nitrato de prata (SANGUINETTI et al. 1994).

Devido à pequena quantidade do material proveniente de esfregaço de lâmina de MO, a reação de PCR para confirmação da presença de DNA foi realizada conforme descrito acima, entretanto, em cada reação foram adicionados 2µl de DNA sem qualquer tipo de quantificação prévia.

3.3 TRATAMENTO COM BISSULFITO DE SÓDIO

Os DNAs das amostras foram submetidos ao tratamento de bissulfito de sódio conforme descrito por GOLDENBERG et al. (2004), com algumas adaptações. Este tratamento converte as citosinas não-metiladas em uracilas, enquanto as citosinas metiladas permanecem inalteradas.

Resumidamente, a 500ng do DNA genômico foi adicionado água para um volume final de 17µl. A esse DNA foram adicionados 3µl de uma solução contendo 3M de Hidróxido de Sódio (NaOH) e esta mistura foi mantida por 20 minutos a 50°C. Em seguida adicionou-se 500µl da solução de Bissulfito de Sódio (2,5M de Bissulfito de Sódio, 125mM de Hidroquinona e 350mM de NaOH) e incubou-se por 3 horas a 70°C. O DNA tratado foi purificado com o kit *Wizard DNA Clean-up System* (Promega), conforme protocolo fornecido pelo fabricante, eluído em 45µl de água e dessulfonado com 5µl de uma solução contendo 3M de NaOH por 10 minutos a

temperatura ambiente. O DNA foi então precipitado pela adição de 45µl de 7,5M de Acetato de Amônio, 350µl de etanol absoluto e 1µl de glicogênio (20mg/ml) e incubado a -20°C por 16 horas. Após 15 minutos de centrifugação a 13.000 rpm a 4°C, o DNA foi lavado com 500 µl de etanol 70%, solubilizado em 50µl de água e estocado a -70°C até o uso.

3.4 REAÇÃO DE *MSP* (*METHYLATION SPECIFIC PCR*)

Foram realizadas reações de PCR específicas para detecção de metilação (*MSP* - *methylation specific PCR*) conforme descrito por HERMAN et al. (1996), para cada um dos 14 genes incluídos nesta análise.

Nestes experimentos, na amplificação por PCR utilizam-se dois pares de iniciadores, um dos pares reconhece especificamente as seqüências com as citosinas mantidas em suas posições originais (metiladas), enquanto o outro é específico para as timinas nos lugares das citosinas (seqüências não-metiladas).

Para as reações de *MSP* foram utilizados iniciadores complementares a região promotora dos genes *CDKN2A*, *TIMP-3*, *MGMT*, *DAPK*, *CDH1*, *p14^{ARF}* e *GSTP1*, conforme descrito por ZÖCHBAUER-MÜLLER et al. (2001), para o gene *RARβ*, conforme descrito por UEKI et al. (2000), para o gene *APC*, conforme descrito por ESTELLER et al. (2000), para o gene *CDH13*, conforme descrito por TOYOOKA et al. (2002), para o gene *CDKN2B*, conforme descrito por CHAN et al. (2002), para o gene *p73*, conforme descrito por SIU et al. (2002) e para o gene *HIC1* conforme descrito por DONG et al. (2001). Os iniciadores para o gene *CALCA* foram desenhados utilizando o programa *MethPrimer* (Tabela 1) (LI e DAHIYA 2002).

As reações de PCR foram realizadas utilizando-se o kit *Platinum Taq DNA Polymerase* (Invitrogen). As condições de reação utilizadas foram: 0,2mM de dNTPs; 0,5μM de cada iniciador; 0,5U de *Platinum Taq DNA Polymerase*; 1,5mM MgCl₂ e 1X Tampão de Reação, em um volume final de 25μl. O programa de PCR utilizado foi: desnaturação inicial de 95°C por 2 minutos, seguido por 10 ciclos de 95°C por 30 segundos, a primeira temperatura de *annealing* por 1 minuto e 72°C por 1 minuto, depois, mais 10 ciclos de 95°C por 30 segundos, a segunda temperatura de *annealing* por 1 minuto e 72°C por 1 minuto, por último, foram mais 15 ciclos de 95°C por 30 segundos, a terceira temperatura de *annealing* por 1 minuto e 72°C por 1 minuto. Para finalizar, incubou-se a 72°C por 7 minutos. Em cada reação foram adicionados 2μl do DNA proveniente das MO a fresco tratado com bissulfito de sódio (conforme descrito acima), diluído cinco vezes em água. Para as amostras de esfregaço de MO foram adicionadas 2μl de DNA sem diluição prévia.

As temperaturas de *annealing* e o tamanho esperado dos fragmentos amplificados com cada par de iniciadores estão descritos na Tabela 2.

Para a visualização dos fragmentos amplificados, os produtos de PCR foram separados por eletroforese em gel de poliacrilamida 8% e corados com nitrato de prata.

3.5 VARIÁVEIS DO ESTUDO

As variáveis demográficas incluídas neste estudo foram sexo, idade, raça e antecedentes de SMD na família. As variáveis clínicas-laboratoriais foram palidez, hepatomegalia, esplenomegalia, adenomegalia, classificação da doença, transformação leucêmica, óbito, seguimento do paciente, contagem de glóbulos

vermelhos, contagem de glóbulos brancos, taxa de hemoglobina, taxa de hematócrito, contagem de plaquetas, de bastonetes, de células segmentadas, de monócitos e porcentagem de blastos na MO. Os valores para cada variável foram obtidos a partir dos exames referentes ao momento do diagnóstico, assim como as amostras, e estão dispostos no Anexo II.

3.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Primeiramente, as variáveis foram analisadas descritivamente por meio de proporções ou da média e desvio padrão a depender de serem do tipo qualitativa ou quantitativa, respectivamente. A seguir, para as associações entre as variáveis qualitativas demográficas e clínicas e a frequência de metilação dos genes foi utilizado o teste de Fisher. Para as variáveis quantitativas, a comparação entre o padrão de metilação foi avaliada através do teste não-paramétrico de Mann-Whitney. Também foram estimadas as curvas de possibilidade de sobrevida acumulada utilizando o estimador produto-limite de Kaplan-Meier sendo a comparação das mesmas feita pelo teste log-rank.

As diferenças foram consideradas significativas quando o p foi menor que 0,05 e todas as análises foram feitas utilizando o programa *SPSS* versão 10.0.

3.7 ASPECTOS ÉTICOS

O presente projeto foi aprovado pela Comissão de Ética em Pesquisa do Hospital do Câncer A.C. Camargo - Fundação Antônio Prudente (FAP) – S.P. em adendo do dia 30/09/2003, protocolo número 503/03, e pelo Comitê de Ética em

Pesquisa do Instituto Dante Pazzanese de Cardiologia (IDPC/SP), em reunião do dia 06/05/2003, protocolo número 3166/2003.

Tabela 1 - Sequência dos iniciadores utilizados na *MSP*.

Gene	Sequências dos iniciadores para a situação metilada (5' - 3')	Sequências dos iniciadores para a situação não-metilada (5' - 3')	Referências
<i>CDKN2A</i>	D - TTATTAGAGGGTGGGGCGGATCGC R - GACCCCGAACCGCGACCGCGACCGTAA	D - TTATTAGAGGGTGGGGTGGATTGT R - CAACCCCAAACCACAACCATAA	Zöchbauer-Müller et al. (2001)
<i>TIMP-3</i>	D - CGTTTCGTTATTTTTGTTTTCGGTTTC R - CCGAAAACCCCGCCTCG	D - TTTTGTITTTGTTATTTTTGTTTTGGTTTT R - CCCCCAAAAACCCACCTCA	Zöchbauer-Müller et al. (2001)
<i>MGMT</i>	D - TTTCGACGTTCTAGGTTTTTCGC R - GCACTCTTCCGAAAACGAAACG	D - TTTGTGTTTTGATGTTTGTAGGTTTTTGT R - AACTCCACACTCTTCCAAAAACAAAACA	Zöchbauer-Müller et al. (2001)
<i>DAPK</i>	D - GGATAGTCGGATCGAGTTAACGTC R - CCCTCCCAAACGCGA	D - GGAGGATAGTTGGATTGAGTTAATGTT R - CAAATCCCTCCCAAACACCAA	Zöchbauer-Müller et al. (2001)
<i>CDH1</i>	D - TTAGGTTAGAGGGTTATCGCGT R - TAACTAAAAATTACCTACCGAC	D - TAATTTTAGGTTAGAGGGTTATTGT R - CACAACCAATCAACAACACA	Zöchbauer-Müller et al. (2001)
<i>P14^{ARF}</i>	D - GTGTAAAGGGCGGCGTAGC R - AAAACCCTCACTCGCGACGA	D - TTTTGGTGTAAAGGGTGGTGTAGT R - CACAAAAACCCTCACTCACAACAA	Zöchbauer-Müller et al. (2001)
<i>GSTP1</i>	D - TTCGGGGTGTAGCGGTCGTC R - GCCCAATACTAAATCACGACG	D - GATGTTTGGGGTGTAGTGGTTGTT R - CCACCCAATACTAAATCACAACA	Zöchbauer-Müller et al. (2001)
<i>RARβ</i>	D - GGATTGGGATGTCGAGAAC R - TACAAAAAACCTTCCGAATACG	D - AGGATTGGGATGTTGAGAATG R - TTACAAAAAACCTTCCAAATACA	Ueki et. al. (2000)
<i>APC</i>	D - TATTGTGGAGTGGGGGTC R - TGCACGAACTCCCGACGA	D - GTGTTTTATTGTGGAGTGTGGGTT R - CCAATCAACAACTCCCAACAA	Esteller et al. (2000)
<i>CDH13</i>	D - TCGCGGGGTTTCGTTTTTCGC R - GATGTTTTTCATTCATACACGCG	D - TTGTGGGGTTGTTTTTTGT R - AACTTTTCATTCATACACACA	Toyooka et. al. (2002)
<i>CDKN2B</i>	D - GCGTTCGTATTTTGCGGTT R - CGTACAATAACCGAACGACCGA	D - TGTGATGTGTTTGTATTTTGTGGTT R - CCATACATAACCAAACAACCAA	Chan et. al. (2002)
<i>P73</i>	D - GGACGTAGCGAAATCGGGGTTT R - ACCCCGAACATCGACGTCCG	D - AGGGGATGTAGTGAAATTGGGGTTT R - ATCACAACCCCAAACATCAACATCCA	Siu et. al. (2002)
<i>HIC</i>	D - TCGGTTTTTCGCGTTTTGTTTCGT R - AACCGAAAACATCAACCCTCG	D - TTGGGTTTGGTTTTTGTGTTTTG R - CACCCTAACACCACCCTAAC	Dong et. al. (2001)
<i>CALCA</i>	D - GTTTTGGAAGTATGAGGGTGACG R - TTCCCGCCGCTATAAATCG	D - TTTTAGGTTTTGGAAGTATGAGGGTGATG R - TTCCCACTACTATAAATCA	*

D: Iniciador direto; **R:** Iniciador reverso.* Os iniciadores para *CALCA* foram construídos utilizando-se o programa *MethPrimer*

Tabela 2 - Temperaturas utilizadas nas reações de *MSP*.

Gene	Temperaturas da PCR (°C)*	Tamanho esperado dos fragmentos (pb)
<i>CDKN2A</i>	66 – 64 – 62	U – 151 M – 150
<i>TIMP-3</i>	62 – 60 – 58	U – 122 M – 116
<i>MGMT</i>	64 – 62 – 60	U – 93 M – 81
<i>DAPK</i>	62 – 60 – 58	U – 106 M – 98
<i>CDH1</i>	58 – 56 – 54	U – 97 M – 115
<i>P14</i>	64 – 62 – 60	U – 132 M – 122
<i>GSTP1</i>	62 – 58 – 56	U – 97 M – 91
<i>RARβ</i>	58 – 56 – 54	U – 100 M – 100
<i>APC</i>	62 – 60 – 58	U – 108 M – 98
<i>CDH13</i>	62 – 60 – 58	U – 243 M – 243
<i>CDKN2B</i>	64 – 62 – 60	U – 154 M – 148
<i>P73</i>	68 – 66 – 64	U – 69 M – 60
<i>HIC1</i>	60 – 58 – 56	U – 118 M – 95
<i>CALCA</i>	56 (U)** 68 (M)**	U – 105 M – 100

U = produto obtido da amplificação com os iniciadores desenhados para as seqüências não-metidadas.

M = produto obtido da amplificação com os iniciadores desenhados para as seqüências metidadas.

* Temperaturas de *annealing* usadas nas reações de PCR.

** Para *CALCA* as reacões foram feitas utilizando temperaturas únicas e diferentes para o *annealing* dos iniciadores.

4 RESULTADOS

4.1 CASUÍSTICA

As características demográficas, clínicas e laboratoriais dos pacientes pediátricos acometidos pela SMD, subtipo RAEB ou RAEB-t, foram obtidas a partir de um levantamento feito no arquivo de documentos (ficha clínica, exames) do GCB-SMD-PED e todos valores obtidos referem-se ao momento do diagnóstico, assim como as amostras.

A idade dos pacientes variou de 8 meses a 15 anos de idade (média= 5,4 anos). Em nossa casuística há o predomínio da raça branca (62,5%). Os achados mais freqüentes ao exame físico nos pacientes deste estudo foram palidez (65,2%) e hepatomegalia (54,2%). Em nossa população não foi possível observar diferença entre a proporção de pacientes do sexo masculino e feminino (razão 0,92:1). Em relação à evolução dos pacientes de nosso estudo podemos observar que 54,2% foram a óbito e 33,3% apresentaram transformação para leucemia. Ainda, em nossa população, há o predomínio (88%) dos pacientes classificados com SMD subtipo RAEB, segundo a classificação FAB(Tabela 3). O tempo de sobrevida dos pacientes foi em média de 19 meses (desvio padrão= 15,8 meses) A caracterização da população segundo as características clínica-laboratoriais está descrita na Tabela 4.

Tabela 3 - Número e porcentagem de pacientes acometidos por SMD segundo características demográficas e clínicas.

Variável	categoria	Nº*	%**
Sexo	Masculino	12	48
	Feminino	13	52
Raça	branco	15	65,2
	pardo/mulato	3	13
	ignorado	5	21,8
Palidez	ausente	8	34,8
	presente	15	65,2
Hepatomegalia^a	ausente	11	45,8
	presente	13	54,2
Esplenomegalia^a	ausente	16	66,7
	presente	8	33,3
Adenomegalia^b	ausente	17	73,9
	presente	6	26,1
Classificação FAB	RAEB	22	88
	RAEB-t	3	12
Transformação leucêmica	não	12	66,7
	sim	6	33,3
Óbito	não	11	45,8
	sim	13	54,2

^a O fígado e baço foram considerados aumentados quando se apresentaram > 2cm do rebordo costal ao exame físico

^b gânglios palpáveis e aumentados

* Quando os dados não foram obtidos os pacientes não foram considerados na análise

** porcentagem em relação aos pacientes que apresentavam os dados para a variável.

Tabela 4. Descrição da média e desvio padrão das características clínico-laboratoriais dos pacientes acometidos por SMD.

Características Laboratoriais*	N*	Média	desvio padrão
Glóbulos vermelhos (/mm ³)	14	3063571,0	1210617,18
Hemoglobina (g/dl)	20	7,97	2,98
Hematócrito (%)	18	24,48	11,19
Plaquetas (/mm ³)	19	95789,47	66824,46
Glóbulos brancos (/mm ³)	19	10915,79	20119,59
Bastonetes (%)	19	2,55	3,38
Segmentados (%)	20	29,15	17,93
Monócitos (%)	20	8,61	8,11
Blastos (%)	24	11,06	6,18
idade (anos)	23	5,2	4,46

* Quando os dados não foram obtidos os pacientes não foram considerados na análise.

4.2 TRATAMENTO COM BISSULFITO DE SÓDIO E *MSP* DE PEQUENAS QUANTIDADES DE DNA

Devido a pequena quantidade de DNA obtido a partir da extração dos esfregaços de MO foi necessário otimizar a reação de *MSP* a partir de pequenas quantidades de DNA tratado com bissulfito de sódio. Sendo assim, 100 a 400ng de DNA de sangue periférico e de linhagem celular de leucemia promielocítica aguda (HL60) foram tratados com bissulfito de sódio e ressuspensos em 50µl de água. Um microlitro de cada DNA tratado foi submetido a reação de *MSP* para o gene *CDKN2A*. A linhagem celular HL60 foi utilizada porque outros autores já haviam demonstrado que o gene *CDKN2A* se encontrava metilado nesta linhagem. Como pode ser observado na Figura 2, até mesmo com a utilização de 100ng de DNA tratado foi possível detectar o produto na reação de *MSP* e que a quantidade de DNA tratado não influencia no resultado da *MSP*.

Este fato nos permitiu acreditar que seria possível a utilização de DNA extraído a partir de lâminas de esfregaço de medula óssea total. Desta forma, pudemos incluir no nosso estudo mais 18 casos de SMD, aumentando o número de amostras analisadas.

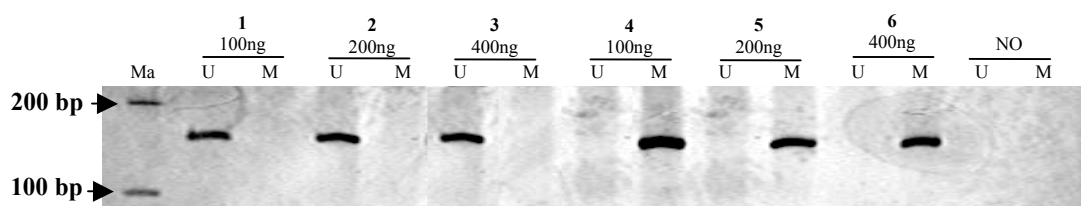


Figura 2 - MSP do gene *CDKN2A*. As reações foram realizadas com diferentes quantidades de DNA tratado com bissulfito de sódio (100, 200 e 400ng). **Ma:** marcador de peso molecular (Laedder 100bp - *Invitrogen*); **U:** situação não-metilada; **M:** situação metilada. **1, 2 e 3:** diferentes quantidades de DNA de sangue periférico tratadas com bissulfito de sódio. **4, 5 e 6:** diferentes quantidades de DNA de HL60 tratadas com bissulfito de sódio. **NO:** controle negativo da reação de MSP (ausência de DNA). Gel de poliacrilamida 8% corado com prata.

4.3 PADRONIZAÇÃO DA EXTRAÇÃO DE DNA DE ESFREGAÇO DE MEDULA ÓSSEA

Para verificar a viabilidade da obtenção de DNA a partir de amostras de esfregaço de MO foram realizados experimentos utilizando-se algumas lâminas de esfregaço de MO, provenientes do laboratório clínico, obtidas de pacientes sem SMD no momento de coleta para estadiamento.

O material destas lâminas foi raspado com auxílio de bisturi e foi submetido a extração de DNA com o kit *Nucleon HT for Hard Tissue (Amersham)*, de acordo com o protocolo do fabricante. Após ressuspensão, em 20µl de água, esse DNA foi quantificado gerando resultados que variavam entre quantidades de 300 a 500ng de DNA, confirmando a expectativa de se obter pouco DNA a partir deste material. A presença de DNA foi verificada através da amplificação de um fragmento de 252 pb do gene *hMLH1*. Assim, 100ng de DNA de cada amostra foram submetidos à reação de PCR com iniciadores localizados nos introns 12 e 13 do gene *hMLH1* (Figura 3).

Foram utilizados esfregaços de MO sem coloração e esfregaços de MO corados com corante Giemsa para estudos de citologia. Estes experimentos demonstraram que seria possível extrair das lâminas de esfregaços de MO quantidades de DNA suficientes para desenvolver as análises de metilação e que o fato das lâminas estarem coradas não interfere no processo de extração do DNA.

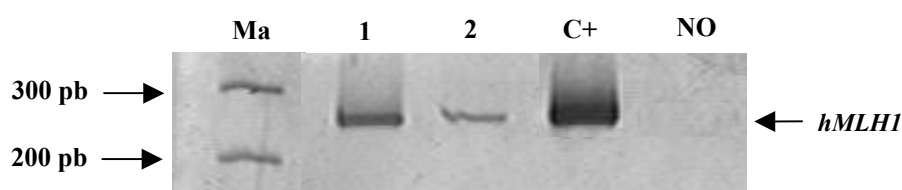


Figura 3. Amplificação de um fragmento de 252 pb do gene *hMLH1* a partir de amostras de DNA obtidas de esfregaços de MO corados e não-corados. **Ma:** marcador de peso molecular (Laedder 100bp - *Invitrogen*); **1:** esfregaço de MO sem coloração. **2:** esfregaço de MO corado. **C+:** controle positivo da reação de PCR (DNA genômico). **NO:** controle negativo da reação de PCR (ausência de DNA). Gel de poliacrilamida 8% corado com prata.

O próximo passo foi avaliar se o tempo de estocagem desses esfregaços de MO influenciaria na qualidade do DNA. Para isto foi extraído o DNA de esfregaços de MO feitos nos anos de 1980 e de 2003. Assim, após quantificação 100ng de DNA de cada amostra foi submetido à reação de PCR para a amplificação do fragmento do gene *hMLH1* (Figura 4). A partir deste experimento observou-se que o tempo de estocagem parece não interferir na qualidade do DNA obtido. Assim, pudemos concluir que seria possível extrair DNA de lâminas de esfregaço de MO que estivessem estocadas há muito tempo.

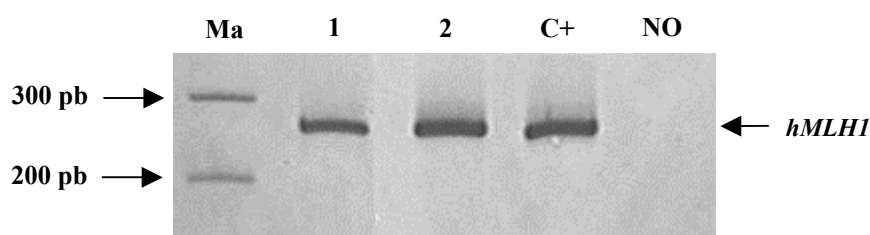


Figura 4 - Amplificação de um fragmento de 252 pb do gene *hMLH1* a partir de amostras de DNA obtidas de esfregaços de MO de diferentes períodos de estocagem. Ma: marcador de peso molecular (Laedder 100bp - *Invitrogen*); **1:** esfregaço de MO feito no ano de 1980. **2:** esfregaço de MO feito no ano de 2003. **C+:** controle positivo da reação de PCR (DNA genômico). **NO:** controle negativo da reação de PCR (ausência de DNA). Gel de poliacrilamida 8% corado com prata.

4.4 EXTRAÇÃO, QUANTIFICAÇÃO E AVALIAÇÃO DO DNA EXTRAÍDO DAS AMOSTRAS DE MEDULA ÓSSEA

O DNA foi extraído a partir de 200µl de cada uma das 12 amostras de MO a fresco de 12 pacientes com SMD e de 18 amostras de esfregaço de MO de pacientes com SMD (cada amostra era proveniente de duas lâminas de esfregaço de MO de cada um dos 18 pacientes com SMD).

As amostras de MO a fresco foram quantificadas e resultaram em quantidades de DNA que variaram entre 3µg a 28µg. Como era esperado um baixo rendimento na extração de DNA das amostras de esfregaço de MO, esses não foram quantificados a fim de evitar a perda de DNA. A presença de DNA foi verificada para as 12 amostras de MO a fresco, através da amplificação do fragmento do gene *hMLH1* a partir de 100ng de DNA de cada amostra. A Figura 5 exemplifica o resultado da reação de PCR obtido com o DNA proveniente de 3 das 12 amostras de MO a fresco (SMD 19, 21 e 23).

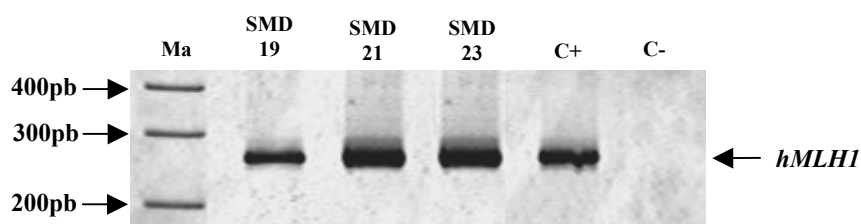


Figura 5. Amplificação de um fragmento de 252 pb do gene *hMLH1* a partir de amostras de DNA obtidas de medula óssea total de 3 pacientes com SMD. Ma: marcador de peso molecular (Laedder 100bp - *Invitrogen*); **C+:** controle positivo (DNA genômico), **C-:** controle negativo (ausência de DNA). Gel de poliacrilamida 8% corado com prata.

O mesmo experimento foi realizado utilizando-se 2µl do DNA (sem prévia quantificação) das 18 amostras de DNA provenientes dos esfregaços de MO. Embora, em nenhuma destas amostras tenha sido possível a visualização do fragmento de 252pb do gene *hMLH1* que evidenciaria o êxito da extração de DNA todas as amostras foram submetidas ao tratamento com Bissulfito de Sódio e posterior reação de *MSP*. Foram extraídos também os DNAs de 10 amostras de esfregaços de MO de pacientes com retinoblastoma intraocular sem invasão de células tumorais na MO (controle sem neoplasia) e de 2 amostras de MO a fresco colhidas do esterno de crianças submetidas à cirurgia cardíaca (controle sem neoplasia). Sem prévia quantificação, 2µl de cada DNA extraído destas amostras-controle de MO foram submetidos a amplificação do fragmento de 252pb do gene *hMLH1* e em todas foi possível a visualização do fragmento esperado. A partir deste resultado essas amostras foram quantificadas e 1µg de DNA de cada amostra foi submetido ao tratamento com Bissulfito de Sódio e realização das reações de *MSP*.

4.5 PERFIL DE METILAÇÃO PARA AS AMOSTRAS DE MEDULA ÓSSEA DOS INDIVÍDUOS SEM SMD E DOS PACIENTES COM SMD

A fim de confirmar se o padrão de metilação encontrado nas amostras de esfregaço de MO não sofre alterações devido ao processo de fixação e estocagem do material, os DNAs de uma amostra de MO a fresco e de uma amostra de esfregaço de MO (corado) obtidos do mesmo paciente tiveram seu padrão de metilação avaliado para os genes *CALCA* e *GSTP1*. Como pode ser observado na figura 6, o padrão de metilação para os 2 genes avaliados é idêntico em ambas as amostras. Ou seja, o processo de preparação, estocagem e coloração por que passam as amostras de esfregaço de MO parece não introduzir alterações no padrão de metilação.

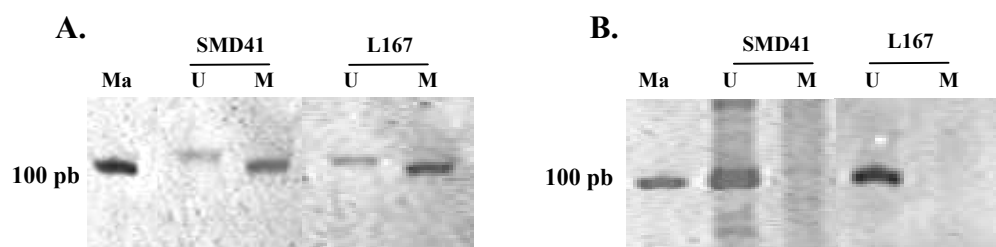


Figura 6. Perfil de metilação em uma amostra de MO a fresco (SMD41) e uma amostra de esfregaço de MO (L167) obtidas do mesmo paciente. **A.** gene *CALCA* **B.** gene *GSTP1* **Ma:** marcador de peso molecular (Laedder 100bp - *Invitrogen*); **U:** situação não-metilada; **M:** situação metilada. Gel de poliacrilamida 8% corado com prata.

O próximo passo do estudo foi avaliar o perfil de metilação dos genes selecionados nas 12 amostras de MO a fresco de pacientes acometidos pela SMD. Para 6 dos 14 genes analisados (*CDKN2A*, *HIC1*, *p73*, *DAPK*, *APC* e *TIMP-3*) não foi possível detectar a presença de metilação na região promotora. Os quatro genes que

apresentaram a sua região promotora mais freqüentemente metilada nestas amostras foram: *CALCA* (83,3%), *CDHI* (75%), *GSTP1* (58,3%) e *CDKN2B* (50%). Nos outros quatro genes restantes (*p14^{ARF}*, *RAR β* , *MGMT* e *CDH13*), as freqüências de metilação encontradas foram menores que 30% (Tabela 4).

Em seguida, foi avaliado o padrão de metilação da região promotora dos 14 genes selecionados nas 12 amostras de MO sem neoplasia (controle). Para 9 genes (*HIC1*, *p14^{ARF}*, *p73*, *DAPK*, *APC*, *TIMP-3*, *MGMT*, *CDH13* e *CDKN2B*) não foi detectada a presença de metilação da região promotora. Para o gene *RAR β* foi possível detectar a metilação da região promotora em 25% das amostras, enquanto que, o gene *CALCA* apresentou-se metilado em 16,6% das amostras e os genes *CDKN2A* e *GSTP1* estavam metilados em 8,3% das amostras. O gene *CDHI* demonstrou ser freqüentemente metilado (66,6%) nessas amostras (Tabela 4).

Embora o gene *CDHI* tenha apresentado uma alta freqüência de metilação nas amostras de MO (75%), este gene também se apresentou bastante metilado nas amostras de controle sem neoplasia (66%) e por isso esse gene foi excluído das demais análises.

A próxima etapa da análise foi a avaliação da freqüência de metilação dos três genes que apresentaram maior freqüência de metilação (*CALCA*, *GSTP1* e *CDKN2B*) nas 18 amostras de esfregaço de MO. Em 5 destas amostras não foi possível observar a amplificação de nenhum fragmento na reação de *MSP*, seja o fragmento representando a situação não-metilada, seja o fragmento da situação metilada. Isto pode ter ocorrido devido a ausência de DNA destas amostras. Portanto, o estudo prosseguiu com 13 amostras de esfregaço de MO. Os genes *CALCA* e *GSTP1* apresentaram uma freqüência de metilação na sua região promotora de 69,2% e

46,2%, respectivamente (Tabela 4). Mesmo após exaustivas tentativas, o gene *CDKN2B* não pode ter a frequência de metilação de sua região promotora determinada nestas 13 amostras de esfregaço de MO, pois a reação de *MSP* para este gene nessas amostras apresentou sempre uma grande inespecificidade, dificultando assim a sua análise.

Quando a análise da frequência de metilação dos genes *CALCA* e *GSTPI* foi realizada combinando-se os resultados obtidos com as 25 amostras de MO (a fresco e lâminas) de pacientes acometidos pela SMD as frequências de metilação observadas foram de 76% e 52%, respectivamente (Tabela 4).

Considerando os 25 casos estudados, podemos observar o perfil de metilação dos três genes mais frequentemente metilados, individualmente, na figura 7. Se analisarmos apenas os genes *CALCA* e *GSTPI* podemos observar que 88% dos pacientes apresentam metilação para pelo menos um dos genes e ainda que 40% apresentam metilação para ambos. Para ilustrar os resultados, a figura 8 mostra o padrão de metilação detectado nas regiões promotoras dos genes *CALCA*, *GSTPI* e *DAPK* em amostras de MO.

Tabela 5. Frequência de metilação na região promotora dos 14 genes estudados nas amostras de MO de pacientes acometidos pela SMD e nas amostras de MO sem neoplasia.

Frequência de Metilação % (n)				
Gene	MO a fresco (12)	Esfregaço de MO (13)	MO a fresco + Esfregaço de MO (25)	MO s/neoplasia (12)
<i>CALCA</i>	83,3 (10)	69,2 (9)	76 (19)	16,6 (2)
<i>CDH1</i>	75 (9)	-	-	66,6 (8)
<i>GSTP1</i>	58,3 (7)	46,2 (6)	52 (13)	8,3 (1)
<i>CDKN2B</i>	50 (6)	-	-	0
<i>CDH13</i>	25 (3)	-	-	0
<i>MGMT</i>	16,6 (2)	-	-	0
<i>p14ARF</i>	16,6 (2)	-	-	0
<i>RARβ</i>	8,3 (1)	-	-	25 (3)
<i>CDKN2A</i>	0	-	-	8,3 (1)
<i>HIC1</i>	0	-	-	0
<i>p73</i>	0	-	-	0
<i>DAPK</i>	0	-	-	0
<i>APC</i>	0	-	-	0
<i>TIMP-3</i>	0	-	-	0

No. Caso	Amostras*	CALCA	GSTP	P15
38	SMD 4			
43	SMD 36			
41	SMD 234			
112	SMD 7			
115	SMD 10			
132	SMD 14			
142	SMD 16			
135	SMD 17			
185	SMD 19			
195	SMD 21			
166	SMD 23			
139	SMD 1271			
9	L31			-
12	L35			-
16	L39			-
18	L54			-
48	L175			-
52	L196			-
145	L746			-
169	L771			-
170	L833			-
172	L854			-
181	L931			-
193	L1023			-
198	L1041			-

Figura 7 - Perfil de metilação da região promotora dos genes *CALCA*, *GSTP1* e *CDKN2B* nas 25 amostras de MO incluídas neste estudo. Caixas pretas, amostras que são metiladas. Caixas brancas, amostras que são não-metiladas. *SMD – amostras de MO a fresco. L – amostras de esfregaço de MO.

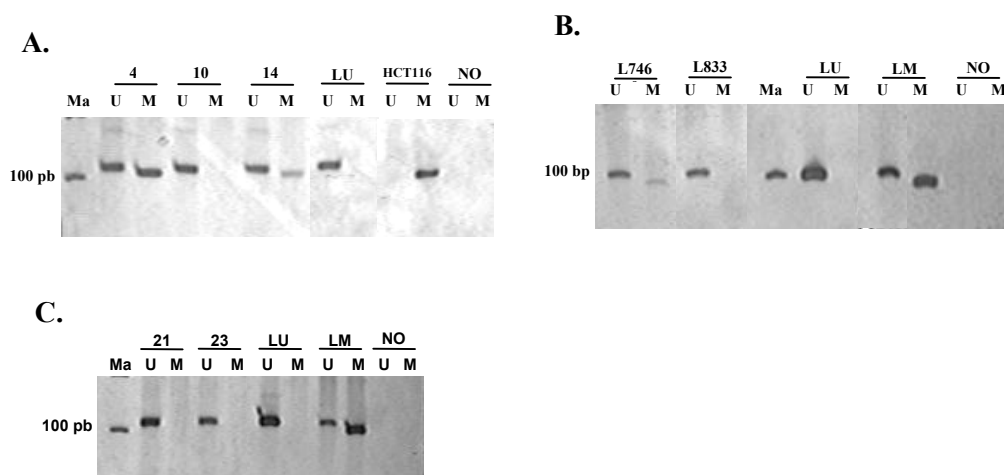


Figura 8. Perfil de metilação na região promotora dos genes *CALCA*, *GSTP1* e *DAPK*. Após a reação de MSP, os produtos obtidos foram separados por eletroforese em gel de poliacrilamida 8% e visualizados através da coloração com prata. **A.** Status de metilação para o gene *CALCA* nas amostras 4, 10 e 14. **B.** Status de metilação para o gene *GSTP1* nas amostras L746 e L833. **C.** Status de metilação para o gene *DAPK* nas amostras 21 e 23. **Ma:** marcador de peso molecular (Laedder 100bp - *Invitrogen*); **U:** situação não-metilada; **M:** situação metilada; **LU:** DNA de linfócitos normais utilizado como controle para a situação não-metilada; **LM:** DNA de linfócito metilado *in vitro* utilizado como controle da situação metilada; **HCT116:** linhagem celular de adenocarcinoma coloretal (controle da situação metilada para *CALCA*); **NO:** controle negativo da reação de MSP (ausência de DNA).

4.6 CORRELAÇÃO ENTRE OS DADOS DEMOGRÁFICOS, CLÍNICOS E LABORATORIAIS E O PADRÃO DE METILAÇÃO DOS GENES

Após a verificação de que apenas 3 dos 14 genes (*CALCA*, *GSTP1* e *CDKN2B*) apresentavam uma elevada frequência de metilação em suas regiões promotoras, nas amostras de MO dos pacientes com SMD e baixa frequência de metilação nos controles de MO sem neoplasia, partimos para verificar se existia alguma correlação entre presença da metilação da região promotora destes três genes e características demográficas e clínicas destes pacientes. Também foi observado perfil de metilação desses pacientes segundo suas características laboratoriais (hemograma).

4.6.1 CORRELAÇÃO DO PADRÃO DE METILAÇÃO DOS GENES *CALCA*, *GSTP1* e *CDKN2B*

4.6.1.1 Com os Parâmetros Demográficos e Clínicos

Em uma primeira análise foi feita a associação entre o padrão de metilação dos genes *CALCA*, *GSTP1* e *CDKN2B*, separadamente, em relação as características demográficas e clínicas, não demonstrando correlações estatisticamente significativas para as variáveis estudadas (Tabela 6).

Na análise da associação entre o padrão de metilação dos genes *CALCA* e *GSTP1* combinados, e as características demográficas e clínicas também não foi possível observar correlações estatisticamente significativas (Tabela 7).

Tabela 6 - Correlação do padrão de metilação dos genes *CALCA*, *GSTP1* e *CDKN2B* com as características demográficas e clínicas dos pacientes acometidos pela SMD.

Variável	categoria	CALCA			GSTP1			CDKN2B		
		U	M	P*	U	M	P	U	M	P
		nº (%) **	nº (%)		nº (%)	nº (%)		nº (%)	nº (%)	
Sexo										
	Masculino	1 (16,7)	11 (57,9)	0,160	5 (41,7)	7 (53,8)	0,695	3 (50)	3 (50)	1,000
	Feminino	5 (83,7)	8 (42,1)		7 (58,3)	6 (46,2)		3 (50)	3 (50)	
	Total	6 (100)	19 (100)		12 (100)	13 (100)		6 (100)	6 (100)	
Raça										
	branco	3 (100)	12 (80)	1,000	8 (88,9)	7 (77,8)	1,000	5 (100)	3 (75)	0,444
	pardo/mulato	-	3 (20)		1 (11,1)	2 (22,2)		-	1 (25)	
	Total	3 (100)	15 (100)		9 (100)	9 (100)		5 (100)	4 (100)	
Palidez										
	ausente	1 (20)	7 (38,9)	0,621	5 (41,7)	3 (27,3)	0,667	1 (20)	2 (33,3)	0,545
	presente	4 (80)	11 (61,1)		7 (58,3)	8 (72,7)		5 (80)	4 (66,7)	
	Total	5 (100)	18 (100)		12 (100)			6 (100)	6 (100)	
Antecedente de SMD ^a										
	não	2 (100)	14 (87,5)	1,000	10 (100)	6 (75)	0,183	1 (16,7)	3 (50)	1,000
	sim	-	2 (12,5)		-	2 (25)		5 (83,3)	3 (50)	
	Total	2 (100)	16 (100)		10 (100)	8 (100)		6 (100)	6 (100)	
Hepatomegalia ^b										
	ausente	2 (40)	9 (47,4)	1,000	5 (41,7)	6 (50)	1,000	5 (100)	4 (80)	1,000
	presente	3 (60)	10 (52,6)		7 (58,3)	6 (50)		-	1 (20)	
	Total	5 (100)	19 (100)		12 (100)	12 (100)		5 (100)	5 (100)	
Esplenomegalia ^b										
	ausente	3 (60)	13 (68,4)	1,000	8 (66,7)	8 (66,7)	1,000	2 (33,3)	3 (50)	1,000
	presente	2 (40)	6 (31,6)		4 (33,3)	4 (33,3)		4 (66,7)	3 (50)	
	Total	5 (100)	19 (100)		12 (100)	12 (100)		6 (100)	6 (100)	
Adenomegalia ^c										
	ausente	3 (60)	14 (77,8)	0,576	8 (66,7)	9 (81,8)	0,640	4 (66,7)	4 (66,7)	0,545
	presente	2 (40)	4 (22,2)		4 (33,3)	2 (18,2)		2 (33,3)	2 (33,3)	
	Total	5 (100)	18 (100)		12 (100)	11 (100)		6 (100)	6 (100)	
Transformação leucêmica										
	não	1 (50)	11 (73,3)	0,515	5 (55,6)	7 (87,5)	0,294	3 (50)	5 (83,3)	1,000
	sim	1 (50)	4 (26,7)		4 (44,4)	1 (12,5)		3 (50)	1 (16,7)	
	Total	2 (100)	15 (100)		11 (100)	8 (100)		6 (100)	6 (100)	

U: não metilado; M: metilado

^a História familiar de SMD

^b O fígado e baço foram considerados aumentados quando se apresentaram > 2cm do rebordo costal ao exame físico

^c gânglios palpáveis e aumentados

* P: teste de Fisher

** número e porcentagem de pacientes estudados para cada variável.

Tabela 7 - Correlação do padrão de metilação dos genes *CALCA* e *GSTP1* combinados, com as características demográficas e clínicas dos pacientes acometidos pela SMD.

Variável	categoria	metilação de <i>CALCA</i> e <i>GSTP1</i>			P*
		nenhum nº (%)**	pelo menos 1 nº (%)	ambos nº (%)	
Sexo					
	Masculino	-	6 (50)	6 (50)	0,186
	Feminino	3 (100)	6 (50)	4 (40)	
	Total	3 (100)	12 (100)	10 (100)	
Raça					
	branco	2 (100)	7 (87,5)	6 (75)	0,638
	pardo/mulato	-	1 (12,5)	2 (25)	
	Total	2 (100)	8 (100)	8 (100)	
Palidez					
	ausente	1 (33,3)	4 (36,4)	3 (33,3)	0,988
	presente	2 (66,7)	7 (63,6)	6 (66,7)	
	Total	3 (100)	11 (100)	9 (100)	
Antecedente de SMD^a					
	não	2 (100)	8 (100)	6 (75)	0,245
	sim	-	-	2 (25)	
	Total	2 (100)	8 (100)	8 (100)	
Hepatomegalia^b					
	ausente	1 (33,3)	5 (45,5)	5 (50)	0,878
	presente	2 (66,7)	6 (54,5)	5 (50)	
	Total	3 (100)	11 (100)	10 (100)	
Esplenomegalia^b					
	ausente	2 (66,7)	7 (63,6)	7 (70)	0,953
	presente	1 (33,3)	4 (36,4)	3 (30)	
	Total	3 (100)	11 (100)	10 (100)	
Adenomegalia^c					
	ausente	1 (33,3)	9 (81,8)	7 (77,8)	0,244
	presente	2 (66,7)	2 (18,2)	2 (22,2)	
	Total	3 (100)	11 (100)	9 (100)	
Transformação leucêmica					
	não	1 (50)	4 (57,1)	7 (87,5)	0,346
	sim	1 (50)	3 (42,9)	1 (12,5)	
	Total	2 (100)	7 (100)	8 (100)	

^a História familiar de SMD

^b O fígado e baço foram considerados aumentados quando se apresentaram > 2cm do rebordo costal ao exame físico

^c gânglios palpáveis e aumentados

* P: teste do Qui-quadrado

** número e porcentagem de pacientes estudados para cada variável

4.6.1.2 Com os Parâmetros Laboratoriais (Hemograma)

Em um segundo momento foi feita à análise entre o padrão de metilação dos genes *CALCA*, *GSTP1* e *CDKN2B*, separadamente, segundo as características laboratoriais dos pacientes. Em relação ao padrão de metilação do gene *CALCA* não foi possível observar correlações estatisticamente significativas para as variáveis estudadas. O mesmo foi observado para o gene *CDKN2B* (Tabela 8). Entretanto, quando avaliamos as características laboratoriais em relação ao padrão de metilação do gene *GSTP1* foi possível observar que este apresentou correlação estatisticamente significativa com as taxas de hemoglobina e de hematócrito ($p=0,044$ e $p=0,029$, respectivamente). Também foi possível observar que a metilação deste gene apresentou uma tendência a se correlacionar com a taxa de glóbulos vermelhos ($p=0,054$) e contagem de glóbulos brancos ($p=0,088$) (Tabela 8).

A associação do padrão de metilação dos genes *CALCA* e *GSTP1*, combinados, demonstrou que em relação as características laboratoriais dos pacientes, a correlação com as taxas de hemoglobina e hematócrito se mantêm estatisticamente significativas ($p=0,012$ e $p=0,005$, respectivamente). Nesta análise também foi possível observar que a correlação com a taxa de glóbulos vermelhos torna-se estatisticamente significativa ($p=0,016$), entretanto para os pacientes que apresentam um ou ambos genes metilados em relação aos que não possuem nenhum dos genes metilados foi mantida a tendência de correlação com a contagem de glóbulos brancos ($p=0,083$) (Tabela 9). Para as variáveis restantes não foi possível observar correlações estatisticamente significativas.

Tabela 8 - Descrição da idade e das características laboratoriais segundo o padrão de metilação dos genes *CALCA*, *GSTP1* e *CDKN2B*.

Características Laboratoriais*	CALCA	Nº	Média (dp**)	P***	GSTP1	Nº	Média (dp)	P	CDKN2B	Nº	Média (dp)	P
Glóbulos vermelhos												
(/mm³)	U	3	3653333,00 (544105,88)	0,233	U	7	2424285,71 (1122970,12)	0,054	U	4	2935000,00 (1643664,60)	0,730
	M	12	2934167,00 (1251947,27)		M	8	3650000,00 (919720,45)		M	5	3290000,00 (1408918,02)	
	total	15			total	15			total	9		
Hemoglobina												
(g/dl)	U	5	8,64 (2,06)	0,446	U	11	6,69 (2,67)	0,044	U	6	8,78 (3,86)	0,937
	M	18	7,73 (3,03)		M	12	9,06 (2,58)		M	6	7,96 (3,33)	
	total	23			total	23			total	12		
Hematócrito												
(%)	U	5	26,80 (5,66)	0,445	U	10	18,70 (9,40)	0,029	U	6	25,16 (13,98)	0,937
	M	16	23,63 (11,59)		M	11	29,56 (8,76)		M	6	25,55 (12,98)	
	total	21			total	21			total	12		
Plaquetas												
(/mm³)	U	3	88333,33 (53910,42)	1,000	U	10	87500,00 (73251,85)	0,512	U	5	96000,00 (61688,73)	0,841
	M	18	95777,78 (68761,78)		M	11	101272,73 (60867,22)		M	5	99600,00 (71814,34)	
	total	21			total	21			total	10		
Glóbulos brancos												
(/mm³)	U	5	22600,00 (37821,89)	0,401	U	11	15872,73 (25716,34)	0,088	U	6	4533,33 (2491,32)	0,931
	M	17	6288,24 (6460,64)		M	11	4118,18 (2111,79)		M	5	4840,00 (3296,66)	
	total	22			total	22			total	11		
Bastonetes (%)												
	U	4	5,50 (9,11)	1,000	U	10	3,50 (4,47)	0,346	U	6	2,00 (2,28)	0,931
	M	18	2,53 (3,48)		M	12	2,71 (5,22)		M	5	1,72 (1,22)	
	total	22			total	22			total	11		
Segmentados (%)												
	U	5	29,00 (13,71)	0,857	U	11	32,54 (20,34)	0,347	U	6	33,50 (20,91)	0,394
	M	18	29,72 (18,66)		M	12	26,83 (14,62)		M	6	21,66 (12,27)	
	total	23			total	23			total	12		
Monócitos (%)												
	U	5	5,00 (3,80)	0,446	U	11	8,09 (9,74)	0,695	U	6	12,66 (13,51)	0,937
	M	18	8,62 (8,56)		M	12	7,60 (6,07)		M	6	8,88 (4,11)	
	total	23			total	23			total	20		
Blastos (%)												
	U	5	10,30 (8,91)	0,265	U	12	11,70 (6,60)	0,551	U	6	9,88 (3,21)	0,132
	M	19	11,26 (5,57)		M	12	10,41 (5,96)		M	6	6,95 (3,12)	
	total	24			total	24			total	12		
idade (anos)												
	U	4	2,77 (2,63)	0,324	U	11	4,77 (4,08)	0,880	U	6	4,50 (2,57)	0,699
	M	19	5,70 (4,65)		M	12	5,58 (4,94)		M	6	5,68 (6,57)	
	total	23			total	23			total	12		

U: não-metilado; M: metilado

* Parâmetros retirados do exame de hemograma

* dp – desvio padrão

** P: teste de Mann-Whitney

Tabela 9 - Descrição das características laboratoriais segundo o padrão de metilação combinado dos genes *CALCA* e *GSTP1*.

Características Laboratoriais*	padrão de metilação de <i>CALCA/GSTP1</i>	Nº	Média (dp ^{**})	P ^{***}
Glóbulos vermelhos				
(/mm ³)	nenhum	2	3840000,00 (636396,10)	0,016
	pelo menos 1	6	2095000,00 (804307,15)	
	ambos	7	3702857,14 (980199,20)	
	total	15		
Hemoglobina				
(g/dl)	nenhum	2	10,10 (1,55)	0,012
	pelo menos 1	12	6,36 (2,23)	
	ambos	9	9,50 (2,69)	
	total	23		
Hematócrito				
(%)	nenhum	2	31,30 (3,25)	0,005
	pelo menos 1	11	17,80 (7,66)	
	ambos	8	31,72 (9,11)	
	total	21		
Glóbulos Brancos				
(/mm ³)	nenhum	2	50250,00 (56214,99)	0,083
	pelo menos 1	12	7216,67 (7477,22)	
	ambos	8	4100,00 (2109,16)	
	total	22		

* Parâmetros retirados do exame de hemograma

** dp – desvio padrão

*** P: teste de Kruskal-Wallis

4.6.1.3 Com a Sobrevida Global

Em uma terceira análise foi aplicado o método de Kaplan-Meier relacionando o perfil de metilação da região promotora de cada um dos três genes em relação à sobrevida global, entretanto não foi possível determinar uma correlação estatisticamente significativa (Figura 9).

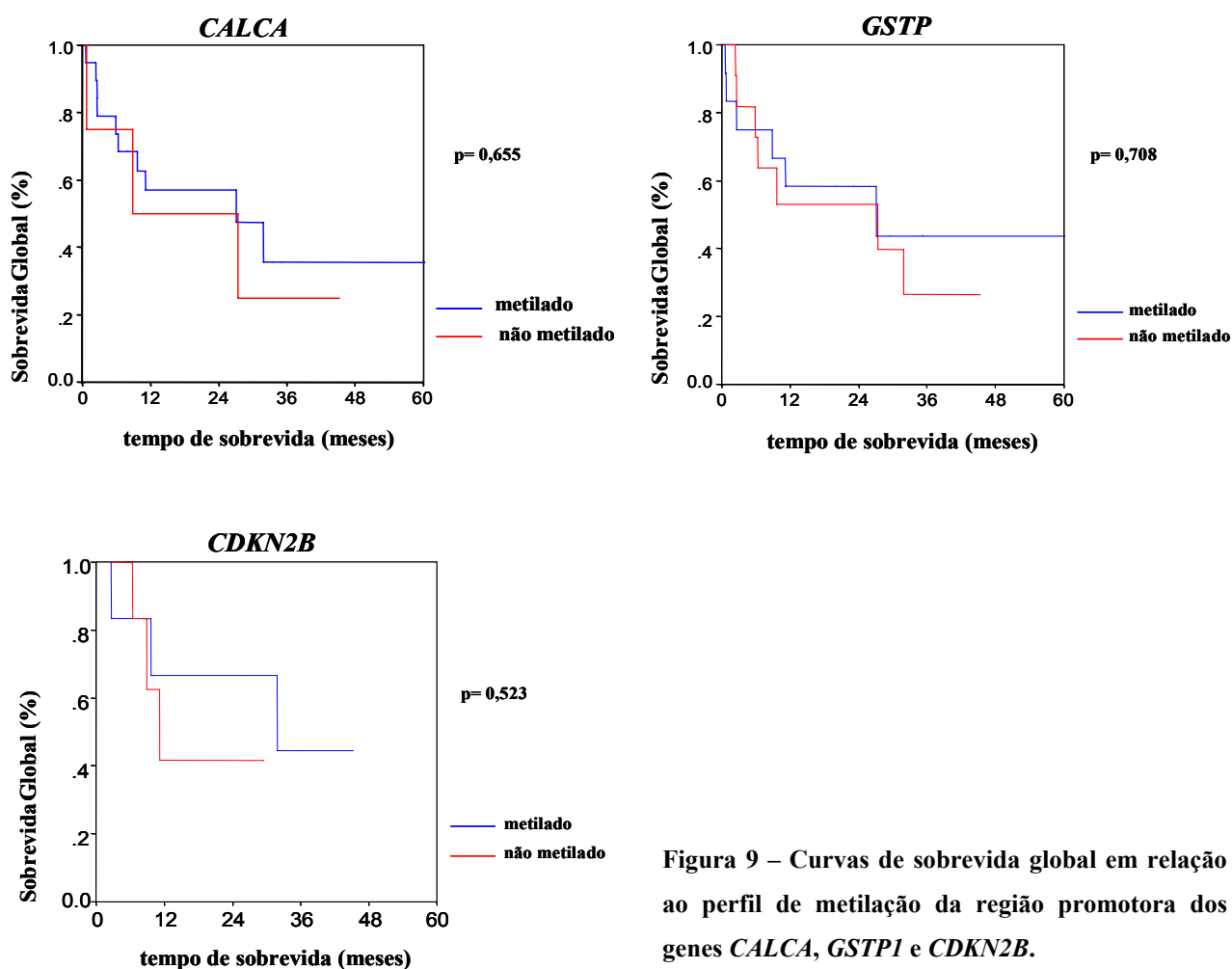


Figura 9 – Curvas de sobrevida global em relação ao perfil de metilação da região promotora dos genes *CALCA*, *GSTP1* e *CDKN2B*.

5 DISCUSSÃO

Neste estudo foi analisado o padrão de metilação da região promotora de 14 genes (*CDKN2B*, *CDKN2A*, *CALCA*, *CDH1*, *HIC1*, *GSTP1*, *p73*, *p14^{ARF}*, *MGMT*, *APC*, *RAR β* , *CDH13*, *DAPK* e *TIMP-3*) em 12 amostras de MO a fresco de pacientes acometidos por SMD, subtipos RAEB e RAEB-t, cadastrados no arquivo do GCB-SMD-PED. Os genes mais freqüentemente metilados nestas amostras (*CALCA*, *GSTP1* e *CDKN2B*) tiveram seu padrão de metilação também avaliado em um outro grupo de 13 amostras de esfregaço de MO de pacientes acometidos pela SMD. A partir dos resultados tentamos correlacionar o padrão de metilação dos genes mais freqüentemente metilados com as características demográficas, clínicas e laboratoriais desses pacientes.

Após uma busca por informações na literatura, ao que parece, nosso estudo foi o primeiro a avaliar o padrão de metilação da região promotora de um grupo de genes em amostras de MO de pacientes pediátricos acometidos pela SMD. Três dos genes incluídos em nossa análise (*CALCA*, *CDKN2A* e *CDKN2B*), também já haviam sido estudados, por outros grupos, em amostras de MO de pacientes acometidos pela SMD, entretanto, estes grupos avaliaram as freqüências de metilação da região promotora destes genes em amostras de pacientes adultos. Para os outros 11 genes não encontramos relatos na literatura de estudos que avaliam os perfis de metilação de suas regiões promotoras em amostras de MO de pacientes acometidos pela SMD, independente da faixa etária.

A SMD em crianças é uma doença rara e apresenta baixa incidência que varia de 0,8 a 1,8 casos/milhão/crianças < 14 anos, segundo os estudos populacionais desenvolvidos até o momento (HASLE et al. 1995; PASSMORE et al. 2003). Devido à raridade da SMD em crianças, é importante ressaltar que a casuística de nosso estudo (25 amostras de SMD, subtipo RAEB ou RAEB-t) é bastante razoável quando comparada à casuística de trabalhos descritos na literatura para os estudos que envolvem metilação em SMD de adultos, os quais variam de 15 a 50 pacientes distribuídos entre todos subtipos da SMD (IHALAINEN et al. 1993; DHODAPKAR et al. 1995; UCHIDA et al. 1997; QUESNEL et al. 1998, VOSO et al. 2004).

Inicialmente, para a realização de nosso estudo, foram obtidas 12 amostras de DNA de MO a fresco de pacientes pediátricos com SMD colhidas no período de fevereiro de 2000 a outubro de 2003. Devido à raridade da SMD na infância e com intuito de aumentar a nossa casuística, optamos por incluir em nosso estudo 13 amostras de esfregaço de MO, provenientes do arquivo de lâminas do GCB-SMD-PED colhidas no período de agosto de 1989 a abril 2003.

A decisão de utilizar amostras de esfregaço de MO neste estudo assumiu o pressuposto de que seria possível a utilização de pequenas quantidades de DNA para o tratamento de Bissulfito de Sódio e subsequente reação de *MSP*. Os primeiros autores que descreveram essa técnica recomendaram a utilização de pelo menos 1µg de DNA para o tratamento com Bissulfito de Sódio (HERMAN et al. 1996). Nós realizamos experimentos preliminares que demonstraram que seria possível obter resultados satisfatórios com pequenas quantidades de DNA (100ng) e que a concentração de DNA utilizada no tratamento com Bissulfito de Sódio e posterior

reação de *MSP* não interfere nos resultados observados. Desta forma, pudemos utilizar amostras de esfregaço de MO, aumentando o número de amostras analisadas.

Outro ponto importante avaliado foi confirmar se o padrão de metilação das amostras de esfregaço de MO poderia ser comparado ao das amostras de MO a fresco, ou seja, se o fato desse material ter sido manipulado para a fixação em uma lâmina e em alguns casos corado, não resultaria em alterações no seu padrão de metilação. Para esclarecer este fato o padrão de metilação da região promotora dos genes *CALCA* e *GSTP1* foi analisado em uma amostra de MO a fresco e em uma amostra de esfregaço de MO do mesmo paciente. O padrão de metilação observado foi idêntico em ambos os genes, indicando que a manipulação da MO durante o processo de esfregaço parece não interferir no padrão de metilação do DNA. Esses resultados também permitiram a utilização de amostras de esfregaço de MO de crianças acometidas por retinoblastoma intraocular, sem invasão de células tumorais na MO, ou seja, MO considerada sem neoplasia como grupo controle de nosso experimento. Também foram utilizadas como controle sem neoplasia, amostras de MO colhidas do externo de crianças submetidas a cirurgia cardíaca no Instituto Dante Pazzanese de Cardiologia (IDPC/SP). Entretanto, esta abordagem logo se mostrou pouco viável, pois, as crianças cardiopatas, geralmente, são submetidas a este tipo de cirurgia antes do primeiro ano de vida e, o fato destas crianças serem muito pequenas, impedia que quantidades suficientes de MO fossem obtidas.

Neste estudo, optamos por utilizar as amostras de pacientes classificados nos subtipos RAEB e RAEB-t da SMD, de acordo com a classificação FAB. Não foram incluídas as amostras de LMMJ, pois, apesar de ser considerado um subtipo de SMD, trata-se de uma doença mieloproliferativa. As amostras de RA não foram incluídas,

pois, no momento da estruturação deste estudo, apenas 3 amostras deste subtipo provenientes de esfregaço de MO estavam disponíveis.

Em relação à população do nosso estudo podemos observar que a amostra estudada tem características semelhantes a do grupo brasileiro, em que predominam os subtipos RAEB e RAEB-t. A média de idade (5,4 anos) dos pacientes do nosso estudo apresentou-se semelhante a média de idade (5,2 anos) encontrada para os pacientes com SMD (93 casos) cadastrados no grupo brasileiro (PAULA 2004), enquanto que para outros estudos essa média de idade variou entre 3,1 anos (Reino Unido, PASSMORE et al. 2003) e 6,9 anos (Polônia, WÖJCILK e USSOWICZ 2003). Os achados mais freqüentes ao exame físico nos pacientes deste estudo foram palidez (65,2%) e hepatomegalia (54,2%), sendo semelhante aos dados encontrados pelo grupo brasileiro, com 61,3% e 54,8%, respectivamente. Não houve em nossa população uma diferença entre a proporção de pacientes do sexo masculino e feminino (0,92:1), enquanto que os dados do grupo brasileiro revelam uma ligeira predominância do sexo masculino (razão 2,4:1). Nos estudos de outros grupos internacionais também ocorre uma pequena predominância do sexo masculino sendo a maior razão de 4:1 na Grécia (POLYCHRONOPOULOU 2003) e a menor de 1,3:1 no Reino Unido (PASSMORE et al. 2003). Dos pacientes estudados, 54,2% foram a óbito e 33,3% apresentaram transformação para leucemia, o que também é visto para os pacientes do grupo brasileiro com 54,8% e 36,5%, respectivamente. Nos estudos desenvolvidos pelos grupos internacionais a freqüência de transformação leucêmica se apresenta bastante variável, sendo o grupo grego o qual apresentou maior porcentagem de transformação com 51% dos pacientes e o grupo turco (The Turkish

National Pediatric MDS Study Group 2003) o que apresentou menor porcentagem com 25% dos pacientes.

Os genes que apresentaram sua região promotora mais frequentemente metilada nas 12 amostras de MO a fresco foram: *CALCA* (83,3%), *CDHI* (75%), *GSTP1* (58,3%) e *CDKN2B* (50%). Em um segundo momento do estudo foram iniciadas as análises para as amostra de MO sem neoplasia, quando então foi possível observar que o gene *CDHI* apresentava-se frequentemente (66,6%) metilado nestas amostras. Esta porcentagem elevada nas amostras de MO sem neoplasia nos levou a buscar informações na literatura. GUTIERREZ et al. (2003) avaliaram a frequência de metilação dos genes *CDHI*, *DAPK*, *MGMT*, *p73*, *CDKN2A*, *CDKN2B* e *p14^{ARF}* em 129 amostras (MO ou SP) de pacientes pediátricos acometidos por LLA. Com o intuito de analisar se haveria alguma interferência da metilação de algum gene em linfócitos normais, os autores também verificaram o padrão de metilação desses genes em 17 amostras normais de sangue (12 adultos e 5 crianças). Após a reação de *MSP* apenas para o gene *CDHI* foi possível observar a presença do fragmento metilado em algumas dessas amostras normais. Recentemente, LOMBAERTS et al. (2004) relataram a presença de metilação no gene *CDHI* em amostras de tumores de mama que expressavam a proteína e-caderina. Os autores observaram que para esses casos o tecido tumoral apresentava um infiltrado leucocitário. A análise da metilação do promotor do gene *CDHI*, através de *MSP*, em leucócitos normais purificados, revelou a presença de metilação na região promotora deste gene nestas células. Podemos observar em nossos dados uma alta frequência de metilação do gene *CDHI* tanto nas amostras de SMD (71,4%,) quanto nas MO sem neoplasia (controle) (66,6%), entretanto esse achado pode ser devido à presença desses leucócitos na MO e não das

células displásicas e/ou blásticas. Por isso decidimos não avaliar o perfil de metilação do gene *CDHI* em nossas amostras de MO total.

Assim, prosseguimos com a análise nas 13 amostras de esfregaço de MO dos três genes mais frequentemente metilados (*CALCA*, *GSTP1* e *CDKN2B*) nas 12 amostras de MO a fresco. A frequência de metilação para a região promotora do gene *CALCA* foi de 69,2% e para *GSTP1* de 46,2%. Não foi possível avaliar a frequência de metilação para o gene *CDKN2B* nessas amostras, pois, mesmo depois de várias alterações efetuadas nas condições da reação, vários fragmentos inespecíficos eram sempre formados durante a *MSP*, o que impossibilitou a análise deste gene.

Nosso estudo parece ser o primeiro a avaliar a frequência de metilação da região promotora do gene *CALCA* em crianças acometidas por SMD. Nossos dados demonstraram que foi possível detectar a presença de metilação do gene *CALCA* em 76% das amostras, resultados semelhantes aos descritos na literatura para SMD de adultos.

Aparentemente, até o momento, apenas dois grupos avaliaram o padrão de metilação da região promotora do gene *CALCA* em amostras de MO e SP de pacientes acometidos pela SMD. IHALAINEN et al. (1993) avaliaram a frequência de metilação do gene *CALCA* em 26 amostras de pacientes adultos acometidos pela SMD (3 RA, 4 RARS, 15 RAEB, 3 RAEB-t e 1 t-MDS/AML). Os autores observaram a metilação do gene *CALCA* em 92% das amostras, ou seja, este gene estava metilado na maioria das amostras, independente do subtipo da doença. Os autores observaram também que a metilação deste gene não está relacionada a porcentagem de blastos encontrados na MO e ainda que os dois pacientes que apresentaram um padrão normal de metilação para este gene tiveram doença estável

durante 3 e 6 anos. A partir deste estudo não foi possível estabelecer o papel da metilação do gene *CALCA* no processo da SMD, entretanto como este gene foi encontrado metilado em amostras de MO de pacientes com RA, os autores sugerem que esta alteração deva ocorrer em um estágio relativamente precoce da doença não estando envolvida com o processo de transformação leucêmica.

Um segundo grupo avaliou o padrão de metilação do gene da *CALCA* em 19 amostras de MO de pacientes adultos acometidos pela SMD (8 RA, 2 RARS, 8 RAEB, 1 RAEB-t) (DHODAPKAR et al. 1995). Os autores observaram a metilação deste gene em 68% das amostras. Esses autores, também não encontraram uma correlação entre a metilação do gene e os subtipos da doença, bem como com a porcentagem de blastos das amostras de MO. Entretanto, das 8 amostras de RA, 6 apresentaram metilação do gene *CALCA*. A partir destes dados estes autores também sugerem que a metilação do gene *CALCA* deva estar envolvida com estágios mais precoces da doença. Neste trabalho, os autores demonstram uma diferença estatisticamente significativa em relação à sobrevida global e a metilação do gene *CALCA*, sendo que os pacientes que apresentaram a metilação para este gene tem sobrevida de 30% aos 17 meses (log rank $p=0,04$), enquanto que dos não-metilados todos os pacientes estavam vivos neste período.

Em nosso trabalho foi possível avaliar a frequência de metilação do gene *CDKN2B* nas 12 amostras de MO a fresco. Nossos dados são semelhantes aos achados da literatura para a SMD de adultos, sendo que foi possível observar a presença de metilação em 50% das amostras de MO para SMD pediátrica.

UCHIDA et al. (1997) avaliaram a frequência de metilação do gene *CDKN2B* em 30 pacientes adultos com SMD. Desses, 12 apresentavam RA ou RARS, 18

RAEB ou RAEB-t, sendo que 10 tinham t-MDS/AML. Esse gene demonstrou uma frequência de metilação de 50% nas amostras de SMD de adultos. Uma análise mais detalhada revelou que apenas 8% dos pacientes com RA ou RARS apresentavam a metilação deste gene, enquanto que, este gene estava metilado em 78% dos pacientes com RAEB ou RAEB-t. Os autores analisaram ainda o padrão de metilação de 4 pacientes em dois momentos, ao diagnóstico e na transformação leucêmica. E puderam observar que no momento da transformação leucêmica havia um aumento na frequência de metilação deste gene, associando assim a metilação do gene *CDKN2B* ao processo de transformação leucêmica. Os autores também avaliaram a frequência de metilação do gene *CDKN2A* e observaram que nenhuma das amostras apresentava metilação para esse gene. Nossos resultados também demonstram que não foi possível observar a metilação deste gene nas amostras estudadas, ou seja, aparentemente, o gene *CDKN2A* encontra-se não-metilado tanto nos casos de SMD de adultos como nas SMDs da infância.

QUESNEL et al. (1998), por meio da técnica de *MSP*, também avaliaram a frequência de metilação do gene *CDKN2B* em 44 pacientes adultos com SMD (10 RA, 2 RARS, 18 RAEB, 5 RAEB-t e 9 t-MDS/AML) e observaram uma frequência de metilação de 38% nas amostras. Esses autores relataram que só foi possível detectar a metilação nas amostras que apresentavam uma porcentagem de blastos acima dos 10% e sugeriram que esta alteração parece estar envolvida com estágios mais avançados da doença. Os autores também avaliaram a frequência de metilação de amostras sequenciais de DNA de 4 pacientes a partir do diagnóstico até a transformação leucêmica e observaram que a metilação do gene *CDKN2B* foi adquirida de acordo com a evolução da doença. Segundo os autores, a metilação do

gene *CDKN2B* está correlacionada com uma menor taxa de sobrevida global ($p=0,049$).

Não está bem estabelecido na literatura que a SMD se inicia na fase de RA e com um aumento progressivo de blastos evolua para os estágios de RAEB e RAEB-t. Desta maneira, acreditamos que, mesmo encontrando a metilação do gene *CALCA* em amostras de RA não é possível correlacionar este achado ao início do desenvolvimento da SMD como fizeram os grupos que avaliaram a metilação deste gene em pacientes adultos. Em nosso estudo não foi possível avaliar o papel da metilação dos genes *CALCA* e *CDKN2B* na transformação leucêmica, pois não dispúnhamos de amostras de casos de t-MDS/AML.

A glutathione S-transferase (GST) é uma importante família de enzimas envolvida no metabolismo de inúmeros agentes químicos tóxicos, como os organofosfatados, os agentes alquilantes e os hidrocarbonetos aromáticos policíclicos. A baixa atividade desta enzima pode predispor alguns indivíduos a falência da medula óssea, resultando em um provável aumento da suscetibilidade a toxinas endógenas ou provenientes do meio externo (SUTTON et al. 2004). Também se acredita que essas enzimas tenham um papel importante na proteção do DNA contra danos oxidativos (JERÓNIMO et al. 2002).

O gene *GSTP1* codifica uma das enzimas que faz parte da família GST e ao que parece, até o momento, nenhum trabalho na literatura pesquisada avaliou o perfil de metilação deste gene em amostras de MO de pacientes acometidos pela SMD, seja em adultos ou em crianças. O nosso estudo demonstrou a presença de metilação na região promotora do gene *GSTP1* em 52% das 25 amostras de MO de crianças com SMD. O padrão de metilação deste gene tem sido muito estudado em outras

neoplasias, como na LMA, tanto de adultos como de crianças. Os trabalhos que avaliam a metilação deste gene, em LMA, demonstraram que o *GSTP1* não apresenta alta frequência de metilação (MELKI et al. 1999; ESTELLER et al. 2001; HARADA et al. 2002). Os estudos de ESTELLER et al. (1998) demonstraram que a metilação deste gene pode ser observada em tumores de mama, fígado e próstata. Recentemente, SUTTON et al. (2004) desenvolveram um estudo com a finalidade de determinar a frequência de deleções homozigotas dos genes *GSTT1* e *GSTM1* que codificam enzimas da família GST em amostras de MO de pacientes acometidos por anemia aplástica (AA) ou SMD. Os autores relataram que o genótipo nulo para ambos genes era significativamente mais encontrado nos pacientes caucasianos acometidos pela SMD. A partir destes resultados eles concluíram que o genótipo nulo para *GSTT1* e/ou *GSTM1* estava associado a um maior risco de desenvolver SMD. Estudos anteriores que avaliaram a frequência do genótipo nulo para os genes *GSTT1* ou *GSTM1* também associaram estas alterações a pacientes que apresentavam desordens na MO, como o aumento da frequência do genótipo nulo do gene *GSTT1* em pacientes brancos norte-americanos e japoneses acometidos pela SMD (CHEN et al. 1996; SASAI et al. 1999). O aumento da frequência do genótipo nulo do gene *GSTM1* também foi descrito em pacientes gregos acometidos pela SMD (TSABOURI et al. 2000). Como a metilação da região promotora dos genes está associada ao silenciamento gênico na maioria das vezes, a metilação do gene *GSTP1* pode resultar em uma diminuição na expressão deste gene. Sendo assim, os nossos resultados parecem sugerir que o mecanismo de metilação também deve estar associado à inativação do gene *GSTP1* contribuindo para o aparecimento do genótipo nulo e, conseqüentemente, predispor o indivíduo ao desenvolvimento da SMD.

Ainda, em relação a esses três genes encontrados como mais frequentemente metilados (*CALCA*, *CDKN2B* e *GSTP1*) em nosso trabalho, devemos considerar as diferentes abordagens metodológicas empregadas para a análise de metilação. IHALAINEN et al. (1993) e DHODAPKAR et al. (1995) utilizaram uma técnica baseada na digestão com enzimas de restrição e posterior hibridização com uma sonda (*Southern blot*) para a observação dos fragmentos metilados ou não metilados. Dessa maneira dependendo da sonda a ser utilizada a região genômica analisada do gene da *CALCA* pode ser diferente, o que pode ter levado ao achado de frequências de metilação diferente para este gene nestes dois trabalhos. A comparação com os resultados do nosso trabalho deve ser feita com cuidado, uma vez que utilizamos a técnica de *MSP* e a região genômica analisada também pode ter sido diferente das descritas por esses autores. UCHIDA et al. (1997) avaliaram a frequência de metilação do gene *CDKN2B*, encontrando uma frequência de metilação de 50%, entretanto os autores utilizaram a técnica de digestão com enzimas de restrição seguida por *Southern blot*. QUESNEL et al. (1998), por meio da técnica de *MSP*, analisaram a metilação do gene *CDKN2B* em SMD de adultos e utilizando os mesmos iniciadores do nosso estudo encontraram uma frequência de metilação de 38%, resultado que se aproxima do nosso (50%). Neste caso devemos considerar que os autores não estratificaram os subgrupos da doença em suas análises o que pode ter levado a uma frequência de metilação menor, uma vez que a metilação do gene *CDKN2B* parece estar ligada a estágios mais tardios da SMD. Recentemente, HASEGAWA et al. (2005) analisaram a frequência de metilação dos genes *CDKN2A* e *CDKN2B* em SMD da infância, por meio de *MSP* e utilizando os mesmos iniciadores do nosso estudo. Os autores descreveram o gene *CDKN2A* como não

metilado em suas amostras e o gene *CDKN2B* apresentando-se metilado em 78% de suas amostras, resultados semelhante aos nossos com 0% e 50%, respectivamente. Dessa forma, devido as diferentes metodologias utilizadas para a análise de metilação os resultados devem ser observados com atenção, ainda mais se comparados ao de outros trabalhos descritos na literatura. Entretanto nossos resultados também demonstram-se semelhantes a outros que utilizaram a técnica de *MSP* para a análise de metilação, tanto em crianças como em adultos, sugerindo desta forma que o padrão de metilação na SMD da infância parece ser semelhante ao padrão de metilação da SMD de adultos e ainda que o gene *GSTP1* parece ser metilado na SMD de adultos.

Embora a nossa casuística apresente um numero satisfatório de pacientes para uma doença rara, ao que parece ela ainda não é grande o suficiente para nos permitir conclusões. Neste estudo, três genes (*CALCA*, *GSTP1* e *CDKN2B*) demonstraram-se mais freqüentemente metilados nas amostras de MO dos nossos pacientes. O padrão de metilação desses genes foi correlacionado com as características demográficas, clínicas e laboratoriais (hemograma) dos pacientes e alguns resultados sugerem tendências para algumas variáveis estudadas.

Poucos escores para avaliação de prognóstico são descritos na literatura para as SMDs. O primeiro deles descrito em 1988 por WORSLEY et al. (*Bournemouth*) utilizou parâmetros como a taxa de hemoglobina, número de neutrófilos, número de plaquetas e porcentagem de blastos para estratificar os pacientes em grupos de risco. A medida que outros trabalhos com essa mesma finalidade foram sendo desenvolvidos houve a inclusão ou exclusão de alguns desses parâmetros para essa estratificação. AUL et al. (1992) utilizaram a porcentagem de blastos, número de plaquetas, taxas de hemoglobina (limite de corte - 9 g/dl) e nível de DHL

(desidrogenase láctica) em seu escore. Com o passar dos anos e o conhecimento das alterações citogenéticas presentes nas SMD, o cariótipo passou a ser incluído em estudos de escore de prognóstico, mostrando ser importante tanto para predizer a evolução da doença como a sobrevida global dos pacientes (MOREL et al. 1993; GREENBERG et al. 1997). Nossos dados demonstraram que a metilação do gene *GSTP1* estava relacionado com maiores taxas das variáveis estudadas na série vermelha do sangue periférico. Dados do GCB-SMD-PED (PAULA 2004) mostraram que é característica dos pacientes acometidos pela SMD apresentar baixas taxas de hemoglobina e de hematócrito. Outros grupos internacionais também demonstram essas baixas taxas de hemoglobina e hematócrito em suas populações (LUNA-FINEMAN et al. 1999; KARDOS et al. 2003; POLYCHRONOPOULOU 2003). A metilação do gene *GSTP1* individualmente ou associada a metilação do gene da *CALCA*, mesmo considerando essas baixas taxas de hemoglobina e hematócrito, demonstra que ainda assim foi possível estratificar os pacientes nestes grupos.

Neste momento do estudo é difícil avaliar o impacto da metilação destes genes em relação às correlações observadas. Entretanto, com o aumento da casuística ou mesmo com os avanços no conhecimento da biologia das SMD, alterações como a metilação poderão vir a ser utilizadas em escores prognósticos ou até mesmo permitir que se estabeleçam fatores prognósticos independentes.

Nossos resultados demonstraram que levando em conta os genes *CALCA* e *GSTP1* nas 25 amostras de MO analisadas, foi possível observar que pelo menos um desses genes estava metilado em 88% das amostras e que ambos estavam metilados em 40% das amostras. Apenas 12% das amostras não apresentaram metilação para nenhum desses genes. Nas amostras de MO sem neoplasia podemos observar que em

apenas 16,6% das amostras pelo menos um desses genes estava metilado e que ambos estavam metilados em apenas 8,3%, enquanto que a metilação não foi detectada para nenhum dos genes em 83,3% dessas amostras. Isso sugere que a análise do padrão de metilação desses genes possa vir a ser utilizada como uma ferramenta de rotina para complementar o diagnóstico da SMD, além da citologia, histologia e citogenética.

Atualmente, não existe um tratamento padrão para a SMD da infância e apenas o transplante de medula óssea (TMO) alogênico pode oferecer a cura potencial para a doença (JAKAB et al. 1999). Estudos preliminares têm avaliado a utilização de drogas que provocam a desmetilação do DNA, como a azacitidina (5-azacytidina) e a decitabina (5-Aza-2'-deoxicitidina), no tratamento da SMD de adultos. Em um estudo envolvendo 29 pacientes adultos com SMD (RAEB e RAEB-t), a administração de decitabina promoveu a remissão completa em 29% dos pacientes e parcial em 18%, com média de duração da resposta de 8 meses (SILVERMAN 2001). Em outro estudo, fase I/II, 43 pacientes adultos receberam infusões contínuas de azacitidina durante 7 dias, sendo que 49% responderam ao tratamento, dentre os quais 37% com resposta das três linhagens hematopoiéticas, tanto completa como parcial e com duração da resposta em média de 15 meses (LEONE et al. 2002). DASKALAKIS et al. (2002) demonstraram, em 23 pacientes adultos com SMD, uma frequência de hipermetilação de 65% para o gene *CDKN2B*, dos quais 12 foram submetidos a tratamento com decitabina, sendo que 9 apresentaram resposta hematológica ao tratamento e ainda 3 desses entraram em remissão completa. Nossos resultados demonstraram que o padrão de metilação encontrado nos pacientes com SMD pediátrica parece ser semelhante ao padrão de metilação dos pacientes adultos com SMD, apesar dos poucos trabalhos encontrados na literatura que avaliaram o padrão

de metilação de genes na SMD. Isto sugere que talvez a utilização de drogas que provocam a desmetilação do DNA possa vir a auxiliar no tratamento das SMD da infância, após a confirmação de seus benefícios no tratamento da SMD em adultos. A utilização de drogas desmetilantes aplicadas em estudos de fase III para a SMD de adultos já está em prática em diversos protocolos investigacionais.

Embora os resultados obtidos neste estudo indiquem a correlação entre a metilação da região promotora de genes com parâmetros laboratoriais dos pacientes, um estudo mais amplo, com um número maior de amostra e com a inclusão de amostras de outros subtipos de SMD (RA e LMMJ) é necessário para demonstrar, de forma irrefutável, esses achados. Isso também seria importante para o entendimento do real papel da metilação de alguns genes na evolução da SMD.

6 CONCLUSÕES

- Foi possível utilizar pequenas quantidades de DNA (100 a 400ng) para fazer o tratamento de Bissulfito de Sódio e reação de *MSP*.
- Foi possível extrair quantidades suficientes de DNA a partir de lâminas de esfregaço de MO, tratá-los com Bissulfito de Sódio e realizar as reações de *MSP*.
- Os resultados obtidos com as amostras de esfregaço de MO são semelhantes aos obtidos com as amostras de MO a fresco, sugerindo que o padrão de metilação seja mantido independentemente do manejo da amostra para a confecção de esfregaço em lâmina.
- Os resultados sugerem que o padrão de metilação na SMD da infância parece ser semelhante a SMD de adultos, com maior frequência de metilação dos genes *CALCA* (76%), o *GSTP1* (52%) e o *CDKN2B* (50%). Nos outros onze genes estudados, as frequências de metilação foram menores que 25%.
- A metilação da região promotora do gene *GSTP1* se correlacionou, com significância estatística, com o aumento nas taxas de parâmetros da série vermelha do sangue periférico nos pacientes acometidos por SMD.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Aktas D, Koc A, Boduroglu K, Hicsonmez G, Tuncbilek E. Myelodysplastic syndrome associated with monosomy 7 in a child with Bloom syndrome. **Cancer Genet Cytogenet** 2000; 116:44-6.

Alberts B, Bray D, Lewis J, Raff M, Roberts K, Watson JD. **Molecular biology of the cell**. 3^a ed. New York: Garland; 1994. Differentiated cells and maintenance of tissues; p.1139-93.

Appelbaum FR. Molecular diagnosis and clinical decisions in adult acute leukemia. **Semin Hematol** 1999; 36:401-10.

Aul C, Gattermann N, Heyll A, Germing U, Derigs G, Schneider W. Primary myelodysplastic syndromes: analysis of prognostic factors in 235 patients and proposals for an improved scoring system. **Leukemia** 1992; 6:52-9.

Bader-Meunier B, Miélot F, Tchernia G, et al. Myelodysplastic syndromes in childhood: report of 49 patients from a French multicentre study. French Society of Paediatric Haematology and Immunology. **Br J Haematol** 1996; 92:344-50.

Bennet JM, Catovsky D, Daniel MT, et al. The French-American-British (FAB) Cooperative Group proposals for the classification of the myelodysplastic syndromes. **Br J Haematol** 1982; 51:189-99.

Chan MW, Chan LW, Tang NL, et al. Hypermethylation of multiple genes in tumor tissues and voided urine in urinary bladder cancer patients. **Clin Cancer Res** 2002; 8:464-70.

Chan GCF. Experiences on MDS and JMML from China/Hong Hong. In: Lopes LF, Hasle H, editors. **Myelodysplastic and myeloproliferative disorders in children**. São Paulo: Lemar and Tecmedd; 2003. p.271-6.

Chen CL, Liu Q, Relling MV. Simultaneous characterization of glutathione S-transferase M1 and T1 polymorphisms by polymerase chain reaction in American whites and blacks. **Pharmacogenetics** 1996; 6:187-91.

Chen H, Wu S. Hypermethylation of the p15 (INK4B) gene in acute leukemia and myelodysplastic syndromes. **Clin Med J** 2002; 115:987-90.

Das PM, Singal R. DNA methylation and cancer. **J Clin Oncol** 2004; 22:4632-42.

Daskalakis M, Nguyen TT, Nguyen C, et al. Demethylation of a hypermethylated P15/INK4B gene in patients with myelodysplastic syndrome by 5-Aza-2'-deoxycytidine (decitabine) treatment. **Blood** 2002; 100:2957-64.

Dhodapkar M, Grill J, Lust JA. Abnormal regional hypermethylation of the calcitonin gene in myelodysplastic syndromes. **Leuk Res** 1995; 19:719-26.

Dong SM, Kim HS, Rha SH, Sidransky D. Promoter hypermethylation of multiple genes in carcinoma of the uterine cervix. **Clin Cancer Res** 2001; 7:1982-6.

Esteller M, Corn PG, Urena JM, et al. Inactivation of glutathione S-transferase P1 gene by promoter hypermethylation in human neoplasia. **Cancer Res** 1998; 58:4515-8.

Esteller M, Sanchez-Cespedes M, Rosell R, Sidransky D, Baylin SB, Herman JG. Detection of aberrant promoter hypermethylation of tumor suppressor genes in serum DNA from non-small cell lung cancer patients. **Cancer Res** 1999; 59:67-70.

Esteller M, Sparks A, Toyota M, et al. Analysis of adenomatous polyposis coli promoter hypermethylation in human cancer. **Cancer Res** 2000; 60:4366-71.

Esteller M, Corn PG, Baylin SB, Herman JG. A gene hypermethylation profile of human cancer. **Cancer Res** 2001; 61:3225-9.

Feinberg AP. Cancer epigenetics takes center stage. **Proc Natl Acad Sci U S A** 2001; 98:392-4.

Garcia-Manero G, Jeha S, Daniel J, et al. Aberrant DNA methylation in pediatric patients with acute lymphocytic leukemia. **Cancer** 2003; 97:695-702.

Goldenberg D, Harden S, Masayesva BG, et al. Intraoperative molecular margin analysis in head and neck cancer. **Arch Otolaryngol Head Neck Surg** 2004; 130:39-44.

Golub TR, Arceci RJ. Acute myelogenous leukemia. In: Pizzo AP, Poplack DG, editors. **Principles and practice of pediatric oncology**. 4th ed. Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins; 2002. p.545-89.

Greenberg P, Cox C, LeBeau MM, et al. International scoring system for evaluating prognosis in Myelodysplastic syndromes. **Blood** 1997; 89:2079-88.

Gutierrez MI, Siraj AK, Bhargava M, et al. Concurrent methylation of multiple genes in childhood ALL: Correlation with phenotype and molecular subgroup. **Leukemia** 2003; 17:1845-50.

Harada K, Toyooka S, Maitra A, et al. Aberrant promoter methylation and silencing of the RASSF1A gene in pediatric tumors and cell lines. **Oncogene** 2002; 21:4345-9.

Harris NL, Jaffe ES, Diebold J, et al. The World Health Organization classification of neoplastic diseases of the hematopoietic and lymphoid tissues: report of the Clinical

Advisory Committee meeting, Airlie House, Virginia, November, 1997. **Ann Oncol** 1999; 10:1419-32.

Hasegawa D, Manabe A, Kubota T, et al. Methylation status of the *p15* and *p16* genes in paediatric myelodysplastic syndrome and juvenile myelomonocytic leukaemia. **British Journal of Haematology** 2005; 128:805-812.

Hasle H, Kernudrup G, Jacobsen BB. Childhood myelodysplastic syndrome in Denmark: incidence and predisposing conditions. **Leukemia** 1995; 9:1569-72.

Hasle H, Wadsworth LD, Massing BG, McBride M, Schultz KR. A population-based study of childhood myelodysplastic syndrome in British Columbia, Canada. **Br J Haematol** 1999; 106:1027-32.

Hasle H, Baumann I, Bergstrasser E, et al. International prognostic scoring system (IPSS) for childhood myelodysplastic syndrome (MDS) and juvenile myelomonocytic leukemia (JMML). [Abstract] **Blood** 2000; 624a.

Hasle H, Kernudrup G. Second International Symposium on myelodysplastic syndrome in childhood, Hidsøgløse castle, Fyn, Denmark, May 11-14, 2000. **Leuk Res** 2001; 25:1013-7.

Hasle H, Niemeyer CM, Chessells JM, et al. A pediatric approach to the WHO classification of myelodysplastic and myeloproliferative diseases. **Leukemia** 2003; 17:277-82.

Herman JG, Graff JR, Myohanen S, Nelkin BD, Baylin SB. Methylation-specific PCR: a novel PCR assay for methylation status of CpG islands. **Proc Natl Acad Sci U S A** 1996; 93:9821-6.

Herman JG, Umar A, Polyak K, et al. Incidence and functional consequences of *hMLH1* promoter hypermethylation in colorectal carcinoma. **Proc Natl Acad Sci U S A** 1998; 95:6870-5.

Hirai H. Molecular mechanisms of myelodysplastic syndrome. **Jpn J Clin Oncol** 2003; 33:153-60.

Hofmann WK, Lubbert M, Hoelzer D, Koefler HP. Myelodysplastic syndromes. **Hematol J** 2004; 5:1-8.

Ihalainen J, Pakkala S, Savolainen ER, Jansson SE, Palotie A. Hypermethylation of the calcitonin gene in the myelodysplastic syndromes. **Leukemia** 1993; 7:263-7.

Jakab Z, Balogh E, Kiss C, Pajor L, Olah E. Biclinal chromosomal aberrations in a child with myelodysplastic syndrome. **Cancer Genet Cytogenet** 1999; 108:113-8.

Jerónimo C, Varzim G, Henrique R, et al. I105V polymorphism and promoter methylation of the GSTP1 gene in prostate adenocarcinoma. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev** 2002; 11:445-50.

Jones PA, Laird P. Cancer epigenetics comes of age. **Nature Genet** 1999; 21:163-7.

Jones PA, Baylin SB. The fundamental role of epigenetic events in cancer. **Nat Rev Genet** 2002; 3:415-28.

Kardos G, Baumann I, Passmore SJ, et al. Refractory anemia in childhood: a retrospective analysis of 67 patients with particular reference to monosomy 7. **Blood**. 2003; 102:1997-2003.

Lair PW. The power and the promise of DNA methylation markers. **Nat Rev Cancer** 2003; 3:253-66.

Leith CP, Willman CL. Prognostic markers in acute leukemia. **Curr Opin Hematol** 1996; 3:329-34.

Leone G, Teofili L, Voso MT, Lubbert M. DNA methylation and demethylating drugs in myelodysplastic syndromes and secondary leukemias. **Haematologica** 2002; 87:1324-41.

Li LC, Dahiya R. MethPrimer: designing primers for methylation PCRs. **Bioinformatics** 2002; 18:1427-31.

Lombaerts M, Middeldorp JW, van der Weide E, et al. Infiltrating leukocytes confound the detection of E-cadherin promoter methylation in tumors. **Biochem Biophys Res Commun** 2004; 319:697-704.

Lopes LF, Lorand-Metze I. Childhood myelodysplastic syndromes in a Brazilian population. **Pediatr Hematol Oncol** 1999; 16:347-53.

Lopes LF, Lorand-Metze I, Niero-Melo L, et al. The Brazilian Pediatric Myelodysplastic Cooperative Group strategies: are they relevant to improve educational approach and correct diagnosis? **Leuk Res** 2002; 26:637-42.

Lopes LF, Latorre MR. Experiences on MDS and JMML from Brazil. In: Lopes LF, Hasle H, editors. **Myelodysplastic and myeloproliferative disorders in children**. São Paulo: Lemar and Tecmedd; 2003. p.259-70.

Luna-Fineman S, Shannon KM, Atwater SK, et al. Myelodysplastic and myeloproliferative disorders of childhood: a study of 167 patients. **Blood** 1999; 93:459-66.

Mandel K, Dror Y, Poon A, Freedman MH. A practical, comprehensive classification for pediatric myelodysplastic syndromes: the CCC system. **J Pediatr Hematol Oncol** 2002; 24:596-605.

Maruyama R, Toyooka S, Toyooka KO, et al. Aberrant promoter methylation profile of bladder cancer and its relationship to clinicopathological features. **Cancer Res** 2001; 61:8659-63.

Melki JR, Vincent PC, Clark SJ. Concurrent DNA hypermethylation of multiple genes in acute myeloid leukemia. **Cancer Res** 1999; 59:3730-40.

Miyazato A, Ueno S, Ohmine K, et al. Identification of myelodysplastic syndrome-specific genes by DNA microarray analysis with purified hematopoietic stem cell fraction. **Blood** 2001; 98:422-7.

Momparler RL. Cancer epigenetics. **Oncogene** 2003; 22:6479-83.

Morel P, Hebbard M, Lai JL, et al. Cytogenetic analysis has strong independent prognostic value in de novo myelodysplastic syndromes and can be incorporated in a new scoring system: a report on 408 cases. **Leukemia** 1993; 7:1315-23.

Mufti G, List AF, Gore SD, Ho AY. Myelodysplastic syndrome. **Hematology (Am Soc Hematol Educ Program)** 2003; 176-99.

Naoe T, Takeyama K, Yokozawa T, et al. Analysis of genetic polymorphism in NQO1, GST-M1, GST-T1, and CYP3A4 in 469 Japanese patients with therapy-related leukemia/ myelodysplastic syndrome and de novo acute myeloid leukemia. **Clin Cancer Res** 2000; 6:4091-5.

Passmore SJ, Chessells JM, Kempski HM, et al. Paediatric myelodysplastic syndromes and juvenile myelomonocytic leukaemia in the UK: a population-based study of incidence and survival. **Br J Haematol** 2003; 121:758-67.

Paula MJA. **Caracterização clínica e laboratorial das pacientes pediátricas com síndromes mielodisplásicas e o estudo das diferentes classificações propostas na literatura**. São Paulo; 2004. [Tese de Mestrado-Fundação Antônio Prudente].

Preisler HD, Li B, Chen H, et al. P15INK4B gene methylation and expression in normal, myelodysplastic and acute myelogenous leukemia cells and in the marrow cells of cured lymphoma patients. **Leukemia** 2001; 15:1589-95.

Polychronopoulou S. Experiences on MDS and JMML from Greece. In: Lopes LF, Hasle H, editors. **Myelodysplastic and myeloproliferative disorders in children**. São Paulo: Lemar and Tecmedd; 2003. p.297-316.

Quesnel B, Guillerme G, Verecque R, et al. Methylation of the p15(INK4b) gene in myelodysplastic syndromes is frequent and acquired during disease progression. **Blood** 1998; 91:2985-90.

Rothstein G. Origin and development of the blood and blood forming tissues. In: Lee GR, Bithell TC, Foerster J, Athens JW, Lukens JN, editors. **Wintrobe's clinical hematology**. 9th ed. Philadelphia: Lea & Febiger; 1993. p.41-78.

Sanchez-Cespedes M, Esteller M, Wu L, et al. Gene promoter hypermethylation in tumors and serum of head and neck cancer patients. **Cancer Res** 2000; 60:892-5.

Sanguinetti CJ, Dias NE, Simpson AJ. Rapid silver staining and recovery of PCR products separated on polyacrylamide gels. **Biotechniques** 1994; 17:914-21.

Sato N, Nakazato T, Kizaki M, Ikeda Y, Okamoto S. Transformation of myelodysplastic syndrome to acute lymphoblastic leukemia: a case report and review of the literature. **Int J Hematol** 2004; 79:147-51.

Sasai Y, Horiike S, Misawa S, et al. Genotype of glutathione S-transferase and other genetic configurations in myelodysplasia. **Leuk Res** 1999; 23:975-81.

Sasaki H, Manabe A, Kojima S, et al. Myelodysplastic syndrome in childhood: a retrospective study of 189 patients in Japan. **Leukemia** 2001; 15:1713-20.

Sidransky D. Emerging molecular markers of cancer. **Nature** 2002; 2:210-8.

Silverman LR. Targeting hypomethylation of DNA to achieve cellular differentiation in myelodysplastic syndromes (MDS). **Oncologist** 2001; 6 Suppl 5:8-14.

Singal R, Ginder GD. DNA methylation. **Blood** 1999; 93:4059-70.

Siu LL, Chan JK, Wong KF, Kwong YL. Specific patterns of gene methylation in natural killer cell lymphomas: p73 is consistently involved. **Am J Pathol** 2002; 160:59-66.

Steensma DP, Tefferi A. The myelodysplastic syndrome(s): a perspective and review highlighting current controversies. **Leuk Res** 2003; 27:95-120.

Sutton JF, Stacey M, Kearns WG, Rieg TS, Young NS, Liu JM. Increased risk for aplastic anemia and myelodysplastic syndrome in individuals lacking glutathione S-transferase genes. **Pediatr Blood Cancer** 2004; 42:122-6.

The Turkish National Pediatric MDS Study Group. Experiences on MDS and JMML from Turkey. In: Lopes LF, Hasle H, editors. **Myelodysplastic and myeloproliferative disorders in children**. São Paulo: Lemar and Tecmedd; 2003. p.331-8.

Tien HF, Tang JH, Tsay W, et al. Methylation of the p15(INK4B) gene in myelodysplastic syndrome: it can be detected early at diagnosis or during disease progression and is highly associated with leukaemic transformation. **Br J Haematol** 2001; 112:148-54.

Torre CAD, Lee MLM, Yoshimoto M, Lopes LF, Niero-Melo L, Toledo SRC. Myelodysplastic syndrome in childhood: report of two cases with deletion of chromosome 4 and the Philadelphia chromosome. **Leuk Res** 2002; 26:533–8.

Toyooka S, Toyooka KO, Harada K, et al. Aberrant methylation of the CDH13 (H-cadherin) promoter region in colorectal cancers and adenomas. **Cancer Res** 2002; 62:3382-6.

Tsabouri SE, Georgiou L, Alamanos I, Bourantas KL. Increased prevalence of GSTM(1) null genotype in patients with myelodysplastic syndrome: a case-control study. **Acta Haematol** 2000; 104:169-73.

Tsuchiya T, Tamura G, Sato K, et al. Distinct methylation patterns of two APC gene promoters in normal and cancerous gastric epithelia. **Oncogene** 2000; 19:3642-6.

Uchida T, Kinoshita T, Nagai H, et al. Hypermethylation of the p15INK4B gene in myelodysplastic syndromes. **Blood** 1997; 90:1403-9.

Ueki T, Toyota M, Sohn T, et al. Hypermethylation of multiple genes in pancreatic adenocarcinoma. **Cancer Res** 2000; 60:1835-9.

Voso MT, Scardocci A, Guidi F, et al. Aberrant methylation of DAP-kinase in therapy-related acute myeloid leukemia and myelodysplastic syndromes. **Blood** 2004; 103: 698-700.

Wójcik D, Ussowicz M. Experiences on MDS and JMML from Poland. In: Lopes LF, Hasle H, editors. **Myelodysplastic and myeloproliferative disorders in children**. São Paulo: Lemar and Tecmedd; 2003. p.325-30.

Woods WG, Barnard DR, Alonzo TA, et al. Prospective study of 90 children requiring treatment for juvenile myelomonocytic leukemia or myelodysplastic

syndrome: a report from the Children's Cancer Group. **J Clin Oncol** 2002; 20: 434-40.

Worsley A, Oscier DG, Stevens J, et al. Prognostic features of chronic myelomonocytic leukaemia: a modified Bournemouth score gives the best prediction of survival. **Br J Haematol** 1988; 68:17-21.

Zöchbauer-Müller S, Fong KM, Virmani AK, Geradts J, Gazdar AF, Minna JD. Aberrant promoter methylation of multiple genes in non-small cell lung cancers. **Cancer Res** 2001; 61:249-55.