



MINISTÉRIO DA SAÚDE

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER

COORDENAÇÃO DE PÓS-GRADUAÇÃO

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER
Pós-Graduação em Oncologia

VIVIANE LAMIM LOVATEL

**ESTUDO DAS ALTERAÇÕES CITOGENÉTICAS E
EPIGENÉTICAS EM SÍNDROME MIELODISPLÁSICA
PEDIÁTRICA**

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Teresa de Souza Fernandez Seixas

Co-orientadora(s): Prof^ª. Dr^ª. Sheila Coelho Soares Lima
Prof^ª. Dr^ª. Eliana Saul Furquim Werneck Abdelhay

RIO DE JANEIRO
2019



MINISTÉRIO DA SAÚDE

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER

COORDENAÇÃO DE PÓS-GRADUAÇÃO

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER
Pós-Graduação em Oncologia

VIVIANE LAMIM LOVATEL

**ESTUDO DAS ALTERAÇÕES CITOGENÉTICAS E
EPIGENÉTICAS EM SÍNDROME MIELODISPLÁSICA
PEDIÁTRICA**

Tese apresentada ao Instituto Nacional de Câncer
como parte dos requisitos para obtenção do título
de Doutor em Oncologia

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Teresa de Souza Fernandez Seixas
Co-orientadora(s): Prof^ª. Dr^ª. Sheila Coelho Soares Lima
Prof^ª. Dr^ª. Eliana Saul Furquim Werneck Abdelhay

RIO DE JANEIRO
2019

L896e Lovatel, Viviane Lamim

Estudo das alterações citogenéticas e epigenéticas em síndrome mielodisplásica pediátrica. / Viviane Lamim Lovatel. – Rio de Janeiro, 2019.
130 f.: il. color.

Tese (Doutorado em Oncologia) – Programa de Pós-Graduação em Oncologia, Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva, 2019.

Orientadora: Dra. Teresa de Souza Fernandez Seixas

Co-orientadora(s): Dra. Sheila Coelho Soares Lima

Dra. Eliana Saul Furquim Werneck Abdelhay

1. Síndromes Mielodisplásica. 2. Citogenética. 3. Epigenética. I. Seixas, Teresa de Souza Fernandez (Orient.). II. Lima, Sheila Coelho Soares (Co-orient.). III. Abdelhay, Eliana Saul Furquim Werneck (Co-orient.). IV. Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. V. Título.

CDD 616.99441

Palavras chave: Síndrome Mielodisplásica pediátrica, citogenética, epigenética.



MINISTÉRIO DA SAÚDE

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER

COORDENAÇÃO DE PÓS-GRADUAÇÃO

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER
Pós-Graduação em Oncologia

AUTORA: VIVIANE LAMIM LOVATEL

**ESTUDO DAS ALTERAÇÕES CITOGENÉTICAS E EPIGENÉTICAS EM
SÍNDROME MIELODISPLÁSICA PEDIÁTRICA**

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Teresa de Souza Fernandez Seixas

Co-orientadora(s): Prof^a. Dr^a. Sheila Coelho Soares Lima

Prof^a. Dr^a. Eliana Saul Furquim Werneck Abdelhay

Aprovada em: 22/02/2019.

EXAMINADORES:

Prof. Dr^a Maria do Socorro Pombo de Oliveira Presidente (INCA)

Prof. Dr^a. Sima Esther Ferman (INCA)

Prof. Dr^a. Marcia Mattos Gonçalves Pimentel (UERJ)

Prof. Dr. André Luis Mencialha (UERJ)

Prof. Dr. Leonardo Karam – Suplente II (INCA)

Prof. Dr^a Tatiana de Almeida Simão- Suplente II (UERJ)

RIO DE JANEIRO
2019

À minha amada família.

AGRADECIMENTOS

À Deus, que ilumina meu caminho e me protege de todo o mal. Sem o qual nada na minha vida teria sentido;

Aos meus pais, Eliane e Vilmar por me ensinar que a única coisa que levamos desta vida e que nos torna melhor é o conhecimento;

À minha irmã Nessa, por estar sempre do meu lado sendo o meu refúgio;

À toda minha família e amigos que dão sentido a minha existência;

Aos meus amigos Elizete, Eliane, Luize, Daiane, Elaiza e Moisés por me receberem de braços abertos com tanto carinho e serem razão de muita alegria na minha vida;

Aos amigos do CEMO, por tonar os dias no laboratório mais leve e animado;

À minha orientadora Dr^a Teresa Fernandez por acreditar, confiar em mim e não medir esforços para que minha formação seja impecável;

À minha co-orientadora Dr^a Sheila Coelho por todo carinho e dedicação ao meu trabalho mesmo nos momentos mais difíceis, por ser um exemplo de amor a ciência;

À minha co-orientadora Dr^a Eliana Abdelhay por todos os ensinamentos e apoio para a realização deste trabalho;

A todos os médicos, em especial à Rita de Cássia Tavares que contribuiu na revisão dos dados clínicos dos pacientes para a realização deste estudo;

Aos membros da banca pela participação e toda contribuição para minha formação acadêmica;

Ao Programa de Pós-graduação em Oncologia do INCA, pela oportunidade e toda a estrutura do corpo docente por toda contribuição para minha formação acadêmica;

As agências de fomento Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPQ), Fundação de Amparo à Pesquisa do Rio de Janeiro (FAPERJ) e Ministério da Saúde (INCA);

Aos pacientes e suas famílias sem os quais não seria possível a realização deste estudo.



MINISTÉRIO DA SAÚDE

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER

COORDENAÇÃO DE PÓS-GRADUAÇÃO

**ESTUDO DAS ALTERAÇÕES CITOGENÉTICAS E EPIGENÉTICAS EM
SÍNDROME MIELODISPLÁSICA PEDIÁTRICA**

RESUMO

TESE DE DOUTORADO

Viviane Lamim Lovatel

A síndrome mielodisplásica (SMD) compreende um grupo heterogêneo de neoplasias hematológicas. A etiopatologia da SMD é complexa e ainda não se sabe a causa de seu surgimento, principalmente nos pacientes pediátricos devido a sua raridade. Embora avanços rápidos tenham sido feitos na SMD no adulto, a genética e epigenética da SMD pediátrica ainda são pouco compreendidas. Nesse sentido, o objetivo deste trabalho foi caracterizar as alterações citogenéticas e epigenéticas em pacientes pediátricos com SMD primária para verificar sua associação com o desenvolvimento da SMD e sua evolução para LMA, buscando identificar marcadores de diagnóstico e prognóstico. A análise citogenética foi realizada por bandeamento GTG e FISH. O estudo de expressão dos genes *DNMTs*, *TET2* e *APOBEC3B* foi realizada por PCR quantitativa em tempo real. O perfil de metilação global através de LINE-1 e a metilação do gene *p15^{INK4B}* foram estudados por pirosequenciamento. Nossos resultados mostraram a presença de cariótipos anormais em 55% dos 152 pacientes estudados. As alterações citogenéticas mais observadas foram a -7, del(11)(q23) e cariótipos complexos. Pacientes apresentaram super-expressão das *DNMTs* em relação aos doadores (*DNMT1* (p= 0,01); *DNMT3A* (p = 0,02) e *DNMT3B* (p= 0,01). Esse aumento de expressão esteve associado ao desenvolvimento e evolução da SMD para LMA (*DNMT1* p= 0,03, *DNMT3A* p= 0,02, *DNMT3B* p= 0,004). A expressão de *TET2* e *APOBEC3B* não diferiu estatisticamente entre os doadores. *APOBEC3B* apresentou expressão aumentada em pacientes com cariótipo normal (p= 0,04) e apresentava expressão coordenada com *DNMT3A* e *DNMT3B*. A hipermetilação do gene *p15^{INK4B}* foi observada em 35% (15/43) dos pacientes, estando mais presente em AREB/AREB-t (60%). Cariótipos anormais estiveram associados com a hipermetilação em *p15^{INK4B}* (p<0,006), sendo as principais alterações: -7/del7q (p< 0,003). Pacientes pediátricos apresentam hipometilação global em 97% (69/71) dos casos. A hipometilação global esteve presente desde o estágio inicial (CRI) (p= 0,01) até os estágios mais avançados (AREB/AREB-t) (p= 0,005) em relação aos doadores. Pacientes com cariótipos anormais (p= 0,004) e com evolução da doença (p= 0,002) apresentaram maior porcentagem de hipometilação global em relação aos doadores. Nossos resultados mostraram que durante o desenvolvimento e evolução de SMD para LMA há um desbalanço progressivo na maquinaria de metilação e desmetilação, havendo o aumento de expressão das *DNMTs* e a diminuição de expressão de *TET2* com a evolução da doença. A hipometilação global esteve presente desde a fase inicial sendo mais expressiva nos estágios mais avançados e com a evolução para LMA, enquanto a hipermetilação em *p15^{INK4B}* foi um evento mais tardio associado à progressão da SMD, principalmente nos pacientes que apresentaram -7/del7q. Em conjunto nossos resultados sugerem um modelo de evolução de SMD para LMA.



MINISTÉRIO DA SAÚDE
INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER
COORDENAÇÃO DE PÓS-GRADUAÇÃO

**STUDY OF CYTOGENETIC AND EPIGENETIC ALTERATIONS IN
PEDIATRIC MYELODYSPLASTIC SYNDROME**

ABSTRACT

DOCTORAL THESIS

Viviane Lamim Lovatel

Myelodysplastic syndrome (MDS) comprises a heterogeneous group of hematological malignancies. The etiopathology of MDS is complex and it is not yet known the cause of its onset, especially in pediatric patients due to its rarity. Although rapid advances have been made in MDS in adults, the genetics and epigenetics of pediatric MDS are still poorly understood. In this sense, the objective of this study was to characterize the cytogenetic and epigenetic alterations in pediatric patients with primary MDS to verify their association with the development of MDS and its evolution to AML, in order to identify diagnostic and prognostic markers. The cytogenetic analysis was performed by GTG banding and FISH. The expression study of *DNMTs*, *TET2* and *APOBEC3B* genes was performed by quantitative real-time PCR. The global methylation profile through LINE-1 and the methylation of the *p15INK4B* gene were studied by pyosequencing. Our results showed the presence of abnormal karyotypes in 55% of the 152 patients studied. The most observed cytogenetic alterations were -7, del (11)(q23) and complex karyotypes. Patients presented over-expression of *DNMT* in relation to donors (*DNMT1* (p = 0.01), *DNMT3A* (p = 0.02) and *DNMT3B* (p = 0.01).) This increase in expression was associated with the development and evolution of MDS for AML (*DNMT1* p = 0.03, *DNMT3A* p = 0.02, *DNMT3B* p = 0.004). The expression of *TET2* and *APOBEC3B* did not differ statistically among the donors, whereas *APOBEC3B* showed increased expression in patients with normal karyotype (p = 0.04). Hypermethylation of the *p15INK4B* gene was observed in 35% (15/43) of the patients, being more present in AREB / AREB-t (60%). Abnormal karyotypes were associated with hypermethylation in *p15INK4B* (p <0.006), with the main changes being: -7 / del7q (p <0.003). Pediatric patients present global hypomethylation in 97% (69/71) of the cases. Global hypomethylation was present from the initial stage (CRI) (p = 0.01), until the most advanced stages (AREB / AREB-t) (p = 0.005) in relation to the donors. Patients with abnormal karyotypes (p = 0.004) and disease progression (p = 0.002) had a higher percentage of global hypomethylation than donors. Our results showed that during the development and evolution of MDS for AML there is a progressive imbalance in the machinery of methylation and demethylation. There is increased expression of *DNMTs* and decreased *TET2* expression with the evolution of the disease. Overall hypomethylation was present from the initial phase, being more expressive in the more advanced stages and with the evolution to AML. While hypermethylation in *p15INK4B* was, a later event associated with the progression of MDS, especially in patients presenting -7 / del7q. Together our results suggest an evolution model of SMD for AML.

ÍNDICE

1. INTRODUÇÃO	1
1.1 Síndrome Mielodisplásica Pediátrica.....	1
1.2 Tratamento em SMD pediátrica.....	5
1.3 Classificação e Escalas Prognósticas em SMD	6
1.3.1 Desenvolvimento da Classificação da SMD Pediátrica.....	6
1.3.2 Escala de Prognóstico em SMD.....	11
1.4 Alterações Citogenéticas em SMD Primária Pediátrica	13
1.5 Alterações Genéticas e Epigenéticas em SMD.....	17
1.5.1 Maquinaria Epigenética na SMD.....	21
1.5.2 Maquinaria de Metilação e Desmetilação do DNA	23
1.5.3 Alterações no Padrão de Metilação em SMD	29
2. OBJETIVO PRINCIPAL.....	33
2.1 Objetivos secundários	33
3. MATERIAIS E MÉTODOS	34
3.1 Pacientes	34
3.2 Análise Citogenética	35
3.2.1. Cultura de Células de Medula Óssea	35
3.2.2 Análise Citogenética Clássica: Bandeamento GTG	35
3.2.3 Análise através da Citogenética Molecular: Hibridização “in situ” por Fluorescência (FISH).....	36
3.3 Análise Molecular	37
3.3.1 Extração de DNA.....	37
3.3.2 Extração de RNA e Obtenção de cDNA.....	37
3.3.3 Análise do Padrão de Expressão dos Genes <i>DNMTs</i> , <i>TET2</i> e <i>APOBEC3B</i>	38

3.3.4 Análise Quantitativa de Metilação de LINE-1 e da Região Promotora do Gene <i>p15^{INK4B}</i> em Pacientes Pediátricos com SMD	39
3.3.5 Análise Estatística.....	41
3.4 Desenho de Estudo.....	42
4. RESULTADOS	42
4.1 Análise Citogenética	43
4.2 Citogenética Molecular: Análise através da Hidridização <i>in situ</i> por Fluorescência (FISH).....	49
4.3 Distribuição das Alterações Cromossômicas nos Subtipos de SMD Pediátrica..	52
4.4 Associação entre a Citogenética e a Evolução da SMD Pediátrica Primária	54
4.5 Distribuição dos Pacientes Pediátricos com SMD nos Subgrupos de Risco Citogenéticos de acordo com IPSS e IPSS-R	57
4.6 Análise da expressão gênica de <i>DNMTs</i> , <i>TET2</i> e <i>APOBEC3B</i> em pacientes pediátricos com SMD	58
4.7 Expressão de <i>DNMTs</i> , <i>TET2</i> e <i>APOBEC3B</i> de acordo com os subtipos de SMD pediátrica, citogenética e evolução da doença	62
4.8 Análise do Perfil de Metilação na Região Promotora do Gene <i>p15^{INK4B}</i>	68
4.9 Análise da Associação entre o Perfil de Metilação da região promotora de <i>p15^{INK4B}</i> com o Padrão Cariotípico e com a Evolução de SMD →LMA	70
4. 10. Análise de Metilação Global em SMD Pediátrica	75
4.11 Análise de Comparação entre o Nível de Metilação Global com o Subtipo, o Cariótipo e à Evolução da doença.....	78
4.12 Análise da Metilação Global versus Prognóstico Citogenético segundo IPSS e o IPSS-R	81
5. DISCUSSÃO	83
6. CONCLUSÃO	99
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	100
ANEXO I.....	117

ANEXO II.....	121
ANEXO III	122
ANEXO IV	129
ANEXO V.....	130

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.1: Principais doenças associadas ao desenvolvimento de SMD/LMA	4
Tabela 1.2: Critérios para classificação da SMD propostos pelo grupo FAB	7
Tabela 1.3: Principais diferenças observadas entre os pacientes pediátricos e adultos com SMD primária	9
Tabela 1.4: Sistema Internacional de Escala Prognóstica para a SMD (IPSS, 1997)	11
Tabela 1.5: Classificação citogenética de grupos de risco para SMD segundo o IPSS-R	13
Tabela 3.1: Oligonucleotídeos utilizados para a análise de expressão das <i>DNMTs</i> , <i>TET2</i> e <i>APOBEC3B</i>	39
Tabela 3.2: Oligonucleotídeos referentes à Line-1 e a região gene <i>p15^{INK4B}</i> utilizados para análise da PCR	40
Tabela 4.1: Classificação dos pacientes e a distribuição de cariótipos anormais	52
Tabela 4.2: Alterações citogenéticas associadas com a evolução de SMD para LMA	55
Tabela 4.3: Distribuição dos pacientes de acordo com grupo de risco citogenético segundo o IPSS e sua associação com a evolução da doença	57
Tabela 4.4: Distribuição dos pacientes segundo o risco citogenético do IPSS-R e sua associação com a evolução da doença	58
Tabela 4.5: Características clínicas e citogenéticas dos pacientes pediátricos com SMD	59

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1: Classificação da SMD proposta pela OMS em 2001	8
Figura 1.2: Classificação da SMD pediátrica proposta em 2003	10
Figura 1.3: Classificação sugerida pela OMS em 2008 para os pacientes com SMD	10
Figura 1.4: Genes localizados no cromossomo 7 associados à predisposição de neoplasias	15
Figura 1.5: Múltiplas etapas do desenvolvimento da SMD	18
Figura 1.6: Distribuição das classes gênicas com mutação em SMD	20
Figura 1.7: Mutações somáticas frequentes na SMD pediátrica	21
Figura 1.8: Enzimas envolvidas na modulação do epigenoma	23
Figura 1.9: Metilação do DNA	24
Figura 1.10: Processo de metilação e desmetilação do DNA	27
Figura 1.11: Biologia do elemento repetitivo LINE-1	30
Figura 1.12: Papel do gene <i>p15^{INK4b}</i> no ciclo celular	31
Figura 4.1: Distribuição da frequência de cariótipos normais e anormais em pacientes pediátricos com SMD	43
Figura 4.2: Distribuição do padrão cariотípico entre os pacientes da infância e os adolescentes	44
Figura 4.3: Frequência das alterações cromossômicas em SMD pediátrica	44
Figura 4.4: Análise citogenética em células de medula óssea de um paciente pediátrico com SMD mostrando a alteração envolvendo o cromossomo 7 em dois subclones	46
Figura 4.5: Análise citogenética em células de medula óssea de um paciente pediátrico com SMD apresentando deleção do braço longo do cromossomo 11	47
Figura 4.6: Análise citogenética em células de medula óssea de um paciente pediátrico com SMD apresentando cariótipo complexo	47
Figura 4.7: Análise de hidridização <i>in situ</i> por fluorescência (FISH)	49
Figura 4.8: Análise através da hidridização <i>in situ</i> por fluorescência da trissomia do cromossomo 8	50
Figura 4.9: Análise através da hidridização <i>in situ</i> por fluorescência das alterações envolvendo o cromossomo 7	51
Figura 4.10: Distribuição do padrão cariotípico por subtipo da SMD pediátrica	53
Figura 4.11: Análise por bandeamento GTG e FISH	56
Figura 4.12. Perfil de expressão de <i>DNMTs</i> , <i>TET2</i> e <i>APOBEC3B</i> em pacientes	60

pediátricos com SMD e doadores pediátricos saudáveis	
Figura 4.13: Análises de correlação entre a expressão de <i>DNMTs</i> , <i>TET2</i> e <i>APOBEC3B</i>	61
Figura 4.14: Perfil de expressão dos <i>DNMTs</i> , <i>TET2</i> e <i>APOBEC3B</i> de acordo com os subtipos de SMD pediátrica e doadores pediátricos saudáveis	63
Figura 4.15: Perfil de expressão dos <i>DNMTs</i> , <i>TET2</i> e <i>APOBEC3B</i> de acordo com cariótipo de SMD pediátrica e doadores saudáveis	65
Figura 4.16: Perfil de expressão das <i>DNMTs</i> , <i>TET2</i> e <i>APOBEC3B</i> de acordo com a evolução da SMD	67
Figura 4.17: Comparação do perfil de metilação dos 11 sítios analisados na região promotora do gene <i>p15^{INK4b}</i> nos pacientes pediátricos com SMD e nos doadores pediátricos	69
Figura 4.18: Comparação do nível de metilação entre pacientes pediátricos com SMD e doadores pediátricos	69
Figura 4.19: Relação entre os perfis de metilação observados nos pacientes pediátricos com SMD	70
Figura 4.20: Comparação do perfil de metilação na região promotora do gene <i>p15^{INK4B}</i> entre os pacientes com cariótipo normal e anormal	71
Figura 4.21: Correlação entre o perfil de metilação na região promotora do gene <i>p15^{INK4B}</i> e o subtipo da SMD pediátrica	72
Figura 4.22: Associação entre a evolução da SMD e o ganho de metilação anormal na região promotora do gene <i>p15^{INK4B}</i>	72
Figura 4.23: Pirosequenciamento da região promotora do gene <i>p15^{INK4B}</i> de um paciente ao diagnóstico e após evolução	74
Figura 4.24: Sítios CpGs analisados em LINE-1 por pirosequenciamento	76
Figura 4.25: Comparação do nível de metilação global entre pacientes pediátricos com SMD primária e doadores saudáveis	77
Figura 4.26: Comparação do nível de metilação global entre a faixa etária da infância e os adolescentes	77
Figura 4.27: Comparação do nível de metilação global entre os subtipos da SMD pediátrica	78
Figura 4.28: Análise comparativa do nível de metilação em LINE-1 segundo o cariótipo dos pacientes pediátricos com SMD	79
Figura 4.29: Distribuição do nível de metilação global segundo alterações	80

cromossômicas específicas

Figura 4.30: A hipometilação em LINE-1 e a evolução da SMD	81
Figura 4.31: Metilação Global segundo o risco citogenético pelo IPSS	82
Figura 4.32: Metilação Global segundo o risco citogenético pelo IPSS-R	82
Figura 5.1: Modelo de desenvolvimento de SMD pediátrica e sua evolução para LMA	97

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

A	adenina
-	perda cromossômica
+	ganho cromossômico
5caC	5-carboxilcitosina
5fC	5- formilcitosina
5hmC	5-hidroxilmetil citosina
aD	autossômica dominante
AID	<i>activation induced cytidine deaminase</i>
ALIP	localização anormal de precursores imaturos
ANKRD26	<i>ankyrin repeat domain 26</i>
APOBECs	Apolipoproteínas B
AR	anemia refratária
aR	autossômica recessiva
AREB	anemia refratária com excesso de blastos
AREB-t	anemia refratária com excesso de blastos em transformação
ARSA	anemia refratária com sideroblastos em anel
ASXL1	<i>ASXL transcriptional regulator 1</i>
AZA	azacitidina
BER	excisão de base mediada
C	citosina
CDK	quinase dependente de ciclina
CDKI	inibidor de quinase dependente de ciclina
CEBPA	fator transcricional (<i>CCAAT enhancer binding protein alpha</i>)
CEMO	Centro de Transplante de Medula Óssea
Chtb	quebras cromatídicas
MYC	fator transcricional (<i>MYC proto-oncogene, bHLH transcription factor</i>)
CpG	região de alta densidade de dinucleotídeos citosina-guanina
CR	citopenia refratária
CRDM	citopenia refratária com displasia em múltiplas linhagens
CRDM-AS	citopenia refratária com displasia em múltiplas linhagens com sideroblastos em anel
CRDU	Citopenia refratária com displasia de uni-linhagem
CRI	citopenia refratária da infância
DAPI	4,6-diamidino-2-fenilindol
dATP	2' desoxiadenosina 5' trifosfato
dCTP	2' desoxicidina 5' trifosfato
DDX41	helicase de RNA (<i>DEAD-box helicase 41</i>)
del	deleção
dGTP	2' desoxiguanosina 5' trifosfato
DNA	ácido desoxirribonucleico
DNMT	DNA metiltransferase
dNTPs	desoxirribonucleotídeos trifosfatos
dTTP	2' desoxitimidina 5' trifosfato

E2F	fator transcricional (<i>E2F transcription factor 1</i>)
EDTA	ácido etilenodiaminotetracético
ETV6	fator transcricional (<i>translocation-Ets-leukemia virus</i>)
EZH2	metilação de histona (<i>enhancer of zeste homolog 2</i>)
FAB	Grupo Franco-Americano-Britânico
FISH	hibridização in situ por fluorescência
FITC	isotiocianato de fluoresceína
FLT3	receptor de citocina (<i>fms like tyrosine kinase 3</i>)
G	guanina
GATA2	fator transcricional (<i>GATA-binding factor 2</i>)
GTG	Giensa-Tripsina-Giensa
GTPase	guanosina trifosfatase
HAT	histona acetiltransferase
HDAC	histona desacetilase
HDACs	histonas desacetilases
HEMORIO	Instituto Estadual de Hematologia Arthur de Siqueira Cavalcanti
HFL	Hospital Federal da Lagoa
HMT	histona metiltransferase
i	Isocromossomo
INCA	Instituto Nacional do Câncer
inv	inversão cromossômica
IPSS	Sistema Internacional de Escala Prognóstica
IPSS-R	Sistema Internacional de Escala Prognóstica- Revisado
ISCN	Sistema Internacional de Nomenclatura de Citogenética Humana
JAK2	receptor de tirosina quinase (<i>Janus kinase 2</i>)
Kb	quilobases
KDM	histona desmetilase específica de lisina
KDMs	lisina demetilase
K-Ras	proto-oncogene da família Ras (<i>Kirsten RA Sarcoma virus</i>)
LINE-1	elemento nuclear intercalado longo 1
LLA	leucemia linfoblástica aguda
LMA	leucemia mieloide aguda
LMC	leucemia mieloide crônica
LMMC	leucemia mielomonocítica crônica
LMMJ	leucemia mielomonocítica juvenil
lncRNAs	RNA longos não codificantes (<i>Long non-coding RNAs</i>)
MLL/KMT2A	lisina metiltransferase 2A (<i>Histone-lysine N-methyltransferase 2A</i>)
MO	medula óssea
MPBs	proteínas ligadoras de CpGs metilados
MSP	reação em cadeia da polimerase específica para a metilação (methylation specific-PCR)
MtL	nível de metilação
NR	neutropenia refratária
NRAS	proto-oncogene, GTPase (<i>Neuroblastoma RAS viral oncogene homolog</i>)

OMS	Organização Mundial de Saúde
p	braço curto do cromossomo
p15INK4B/CDKN2B	inibidor de quinase dependente de ciclina 2B
PcG	grupo de proteínas Polycomb
PCR	reação em cadeia da polimerase
PHF6	<i>plant homeodomain (PHD)-like finger 6</i>
pRB	proteína de retinoblastoma
PRC1/2	complexo de proteínas repressivas (<i>Polycomb Repressive Complex 1/2</i>)
q	braço longo do cromossomo
RAD21	Proteína de reparo de fita dupla (<i>Double-strand-break repair protein rad21 homolog</i>)
RNA	ácido ribonucleico
rpm	rotações por minuto
RPMI	Roswell Park Memorial Institute - meio de cultivo de células
RT-qPCR	reação em cadeia da polimerase da transcrição reversa em tempo real
RUNX1	fator de transcrição (Runt-related transcription factor 1)
SAM	S-adenosil-metionina
SAMD9	domínio de motivo alfa estéril contendo 9
SAMD9L	domínio de tipo motivo alfa estéril contendo 9
SD	Síndrome de Down
SETBP1	Proteína de ligação SET 1 (<i>SET binding protein 1</i>)
SF3B1	Fator de splicing (<i>Splicing factor 3B subunit 1</i>)
SMD	Síndrome Mielodisplásica
SMP	Síndrome Mieloproliferativa
SP	sangue periférico
T	timina
t	translocação
TAF3	Fator 3 associado a proteína de ligação a TATA-box (<i>Transcription initiation factor TFIID subunit 3</i>)
TCTH	transplante de células-tronco hematopoéticas
TDG	glicosilase de timina do DNA
TERC	componente de RNA da telomerase
TERT	transcriptase reversa da telomerase
TET	dioxigenase de metilcítidina (Ten-eleven translocation)
TFIID	<i>transcription factor II D</i>
TP53	gene supressor de tumor p53
TR	trombocipenia refratária
U	não metilado
U2AF1	fator de <i>splicing</i> (<i>U2 small nuclear RNA auxiliary factor 1</i>)
ZRSR2	fator de <i>splicing</i> (<i>U2 small nuclear ribonucleoprotein auxiliary factor 35 kDa subunit-related protein 2</i>)

1. INTRODUÇÃO

1.1 Síndrome Mielodisplásica Pediátrica

A síndrome mielodisplásica (SMD) compreende um grupo heterogêneo de neoplasias clonais de célula tronco hematopoética. É caracterizada por uma hematopoese ineficiente, defeitos de diferenciação levando às displasias e conseqüentemente uma disfunção celular. A SMD apresenta citopenias no sangue periférico como a anemia, neutropenia e trombocitopenia (BENNETT *et al.*, 1982; ARBER *et al.* 2016).

A história natural da SMD é altamente variável, podendo apresentar formas brandas, com alta taxa de sobrevivência, ou formas mais agressivas, que podem apresentar uma rápida transformação leucêmica. Cerca de 10-40% dos casos evoluem para leucemia mieloide aguda (LMA). Em raras ocasiões, pode ocorrer evolução para leucemia linfoblástica aguda (LLA) ou leucemia bifenotípica (DELFORGE *et al.*, 2003; NISHINO & CHANG, 2005; GARCIA-MANERO, 2012; ARBER *et al.*, 2016).

A SMD é uma das neoplasias hematológicas mais frequente em pacientes idosos, com média de idade de 70 anos ao diagnóstico e prevalência do sexo masculino (GARCIA-MANERO, 2015). A incidência da SMD vem aumentando com o passar dos anos devido ao envelhecimento natural da população. Menos de 10% dos pacientes apresentam idade inferior a 50 anos (CHANG *et al.* 2002; COGLE, 2015).

A síndrome mielodisplásica nos pacientes pediátricos é rara, apesar de um número crescente de casos, sua verdadeira incidência é desconhecida. Estima-se que represente, aproximadamente, 2-7% das neoplasias hematológicas na faixa pediátrica (NIMER 2008; JAMAL 2012; GLAUBACH *et al.*, 2014).

A incidência anual é de aproximadamente 0,5-5 casos para cada 1 milhão de crianças, enquanto a idade média ao diagnóstico é de 6 anos e a distribuição entre os sexos parece ser a mesma (HASLE *et al.*, 1999; SWERDLOW *et al.*, 2008; CHATTERJEE & CHOUDHRY 2013; GLAUBACH *et al.*, 2014; HOFMANN, 2015). Entretanto, dados sobre a incidência da SMD pediátrica podem estar subestimados devido às dificuldades do diagnóstico (NIEMEYER & KRATZ, 2008; GLAUBACH *et al.*, 2014; HOFMANN, 2015).

A SMD pediátrica pode apresentar um quadro histopatológico e clínico semelhante a várias outras manifestações clínicas não hematológicas, como por exemplo: deficiências nutricionais (vitamina B12, folato, vitamina E), infecções virais (Epstein-Barr, citomegalovírus, Parvovírus, Herpes-vírus, HIV), medicamentos, doenças mitocondriais (Síndrome de Pearson) e doenças reumatóides (GLAUBACH *et al.* 2014).

Para o diagnóstico da SMD é necessário a realização de um aspirado e biópsia de medula óssea, onde é analisada a morfologia das células, a porcentagem de blastos, a celularidade e a arquitetura da medula óssea; sendo que em alguns casos é observado o ALIP (localização anormal de precursores imaturos). Uma série de testes adicionais é necessária para completar a avaliação laboratorial de um paciente com SMD, como a imunofenotipagem e a análise da citogenética da medula óssea (GARCIA- MANERO, 2015). Esses testes adicionais são necessários para a exclusão da anemia aplástica, doenças mieloproliferativas, leucemia mielomonocítica juvenil (LMMJ) e LMA (STEENSMA, 2012; BEJAR, 2015).

A SMD pode ser classificada como primária ou secundária. A SMD primária também, chamada *de novo*, não possui uma causa conhecida. A SMD secundária, por sua vez, possui uma causa conhecida. Na maioria dos casos, é relacionada a uma exposição prévia a agentes tóxicos como quimioterapia, radiação ionizante, exposição a longo prazo ao benzeno e seus derivados (NIMER, 2008; ADÉS *et al.*, 2014).

A SMD secundária possui um pior prognóstico quando comparada com a SMD primária. Pacientes com SMD secundária normalmente apresentam o subtipo mais avançado da SMD (AREB/AREB-t). Por outro lado, a SMD primária o subtipo mais frequente é o inicial, a citopenia refratária da infância (CRI) (GLAUBACH *et al.*, 2014).

A SMD secundária na faixa etária pediátrica também pode estar associada com a evolução de outras doenças como a Síndrome de Shwachman-Diamond, a anemia de Diamond-Blackfan, disqueratose congênita, a anemia de Fanconi, a neutropenia congênita severa, trombocitopenia megacariocítica congênita, síndrome de Kostmann e síndrome de MonoMAC (Tabela 1.1) (LASKY & SAKAMOTO, 2005; BANNON & DINARDO, 2016; BABUSHOK *et al.*, 2016). Outras doenças genéticas associadas à SMD incluem hemoglobinúria paroxística noturna, anemia aplástica, síndrome de Down, neurofibromatose, síndrome de Bloom e síndrome de Li-Fraumeni (BABUSHOK *et al.*, 2016; BANNON & DINARDO, 2016).

Além dessas síndromes, a ocorrência de SMD pode estar associada a uma predisposição genética, embora esses casos sejam raros, mutações gênicas têm sido apontadas como responsáveis pelo desenvolvimento da SMD familiar (Tabela 1.1) (OWEN *et al.*, 2008; BABUSHOK *et al.*, 2016; NIEMEYER & MECUCCI, 2017). Dentre os genes já descritos na SMD familiar podemos destacar *ANKRD26* (*Ankyrin Repeat Domain 26*, relacionada à trombocitopenia), este gene codifica uma proteína quinase de sinalização e possui cerca de 8% de risco de desenvolvimento de SMD/LMA; e os genes *CEBPA* e *RUNX1* que atuam como reguladores transcricionais durante a hematopoese e quando mutados levam à SMD/LMA em 100% e 20-60% dos casos, respectivamente (BABUSHOK *et al.*, 2016).

Deficiência no gene *GATA2* tem sido descrita como a causa mais comum associada com predisposição genética na SMD pediátrica, principalmente em adolescentes com os subtipos mais avançados da SMD (WLODARSKI *et al.*, 2016). O gene *GATA2* pertence à família de fatores de transcrição de reconhecimento ao DNA através do domínio dedo zinco, é essencial no desenvolvimento hematopoético por controlar a transição do endotélio hemogênico às células-tronco hematopoética, e é também crucial para a sobrevivência e auto renovação das células-tronco hematopoiéticas (WLODARSKI *et al.*, 2018). Pacientes pediátricos com síndrome de Down que desenvolvem SMD/LMA ou doença mieloproliferativa transitória apresentam mutação em *GATA2* (OWEN *et al.*, 2008). Mutações no gene *GATA2* também foram associadas com pacientes pediátricos com SMD e alterações cromossômicas que envolvem principalmente o cromossomo 7 (WLODARSKI *et al.*, 2016).

Recentemente, foi descrito que deficiência em *SAMD9 / SAMD9L* leva a uma predisposição ao desenvolvimento de SMD, principalmente em pacientes pediátricos (WLODARSKI *et al.*, 2018; SCHWARTZ *et al.*, 2017). *SAMD9 / SAMD9L* atuam regulando a proliferação celular e mutações nesses genes levam a um efeito antiproliferativo, além disso tem sido mostrado seu papel como supressor tumoral em alguns tipos de câncer (DAVIDSSON *et al.*, 2018).

Outros genes que atuam na montagem ribossômica e tradução (*DDX41*), regulação da telomerase (*TERC/ TERT*), como fator de transcrição de genes associados a plaquetas (*ETV6*) e no reconhecimento de sinalização (*SPRP72*) também são associados ao desenvolvimento da SMD familiar (BABUSHOK, *et al.*, 2016; KIRÁLY *et al.*, 2017). No entanto, as frequências dessas mutações associadas ao desenvolvimento de SMD/LMA em

pacientes pediátricos ainda são desconhecidas, sendo necessário um maior número de estudos (BABUSHOK *et al.*, 2016). A identificação dessas mutações (Tabela 1.1) deve ser integrada na avaliação dos pacientes com SMD com suspeita de predisposição genética, pois podem estar associadas a um pior prognóstico necessitando de mudanças na conduta do tratamento.

Tabela 1.1: Principais doenças associadas ao desenvolvimento de SMD/LMA

Doenças	Hereditariedade	Genes	Risco de SMD/LMA
Síndromes de falha da medula óssea herdáveis			
Trombocitopenia megacariocítica Congênita	aR	<i>MPL</i> <i>RPS19, RPS17, RPS24, RPL35A, RPL5, RPL11, RPS7, RPS26,</i> <i>RPS10, GATA1</i>	desconhecido
Anemia de Diamond-Blackfan	aD, XLR	<i>DKC1, TERT, TERC, TINF2, RTEL1, NOP10, NHP2, WRAP53,</i> <i>CTCI, PARN</i>	1-20%
Disqueratose Congênita	XLR, aD, aR	<i>FANCA, FANCC, FANCD1/BRCA2, FANCD2, FANCE, FANCF, FANCG/XRCC9, FANCI, FANCIJ/BACH1/BRIP1, FANCL, FANCM, FANCN/PALB2, FANCO/RAD51C, FANCP/SLX4, FANCO/ERCC4, FANCB</i>	30%
Anemia de Fanconi	aR, XLR	<i>ELA2, HAX1, GFII</i>	40%
Neutropenia Severa Congênita	aR	<i>SBDS</i>	10%
Síndrome de Shwachman-Diamond	aR		20-30%
Outras Síndromes herdáveis associadas SMD/LMA			
Síndrome de Bloom	aR	<i>BLM</i>	15-25%
Síndrome de Li-Fraumeni	aD	<i>TP53, CHEK2</i>	8%
Neurofibromatose Tipo I	aD	<i>NF1, SPRED1</i>	<1%
SMD/LMA familiar			
Trombocitopenia relacionada a <i>ANKRD26</i>	aD	<i>ANKRD26</i>	8%
LMA familiar relacionada a <i>CEBPA</i>	aD	<i>CEBPA</i>	100%
SMD/LMA familiar associada a <i>DDX41</i>	aD	<i>DDX41</i>	desconhecido
Trombocitopenia e neoplasia hematológica associada a <i>ETV6</i>	aD	<i>ETV6</i>	desconhecido
Haploinsuficiência em <i>GATA2</i>	aD	<i>GATA2</i>	desconhecido
Doença plaquetária associada a <i>RUNX1</i>	aD	<i>RUNX1</i>	20-60%
Aplasia e mielodisplasia familiar associada com <i>SRP72</i>	aD	<i>SRP72</i>	desconhecido

aD autossômica dominante, aR autossômica recessiva, XLR, Ligada ao X recessiva. (Adaptado de BABUSHOK, *et al.*, 2016).

1.2 Tratamento em SMD pediátrica

O tratamento dos pacientes pediátricos com citopenia refratária da infância (CRI) é desafiador e depende principalmente das características clínicas e citogenéticas. Pacientes com cariótipo normal podem apresentar um curso estável da doença por muito tempo; portanto, nesses pacientes, na ausência de dependência transfusional ou neutropenia grave a estratégia recomendada é o acompanhamento clínico laboratorial (KARDOS, *et al.*, 2003; GALAVERNA *et al.*, 2018).

Por outro lado, para os pacientes que apresentam neutropenia persistente e necessidade transfusional regular é indicado o uso de terapia imunossupressora com globulina anti-timócito e ciclosporina (YOSHIMI *et al.* 2007; LOCATELLI, *et al.* 2018). Além do uso de amplo espectro de antibióticos para controlar as infecções e febre recorrentes da neutropenia (GREENBERG, *et al.*, 2017).

Para todo paciente pediátrico com SMD que necessita de algum tipo de tratamento deve ser considerado o transplante de células-tronco hematopoéticas alogênico (TCTH-alogênico) que continua sendo o único tratamento com potencial curativo para SMD (GREENBERG *et al.*, 2017; MAHER *et al.* 2017; GALAVERNA *et al.*, 2018). Este também deve ser indicado aos pacientes com CRI com a monossomia 7 ou cariótipo complexo (GALAVERNA *et al.*, 2018).

Os resultados dos pacientes pediátricos com SMD tratados com o TCTH-alogênico são melhores quando realizados antes da progressão da doença. Cuidados como a vigilância rotineira da medula óssea é importante em pacientes com citopenias leves, sem necessidade de transfusão ou infecções, e na ausência de monossomia 7 ou cariótipo complexo (NIEMEYER & KRAZ, 2008; GLAUBACH *et al.*, 2014; HOFMANN, 2015). Tradicionalmente, pacientes com os subtipos mais avançados da SMD recebem indução por quimioterapia semelhante à utilizada para os pacientes com LMA. Entretanto, dados recentes mostram que a indução com quimioterapia antes do transplante não melhora o resultado, nem diminui a chance de recidiva. Deste modo, o uso de quimioterapia pré-transplante continua sendo controverso nos pacientes pediátricos com SMD (HOFMANN, 2015; GALAVERNA *et al.*, 2018;). Além disso, o uso de quimioterapia convencional do tipo LMA sem o TCTH resultou em taxas de sobrevivência abaixo de 30% (WOODS *et al.*, 2002).

Recentemente o tratamento com os agentes hipometilantes como azacitidina (AZA) e decitabina vem sendo utilizado em alguns casos pediátricos (CSEH *et al.*, 2016; WAESPE *et al.*, 2016). A azacitidina é um ribonucleosídeo, e a decitabina é um desoxirribonucleosídeo, ambos atuam na depleção das DNA metiltransferases, estas duas drogas desempenham um papel na diferentes mecanismos específicos: a azacitidina é incorporada em RNA e DNA, enquanto a decitabina é fosforilada por diferentes cinases e é incorporada apenas no DNA. Devido à incorporação no RNA, a azacitidina inibe a síntese proteica como uma função adicional (XIE *et al.*, 2015). Essas drogas têm sido utilizadas principalmente naqueles pacientes com AREB/AREB-t sem doador compatível, numa tentativa de melhorar a sobrevida (CSEH *et al.*, 2016; WAESPE *et al.*, 2016).

O uso de AZA em doses baixas tem sido efetivo em pacientes pediátricos e parece ser uma opção não tóxica para situações de tratamento paliativo para prolongar a sobrevida (CSEH *et al.*, 2016). O tratamento com AZA também tem sido sugerido antes do TCTH em pacientes pediátricos com SMD avançada. Nesses casos, o agente hipometilante leva à diminuição da porcentagem de blastos na medula óssea e tem se mostrado eficiente na redução da incidência de recaída após o TCTH, sem adicionar os efeitos da toxicidade da quimioterapia (WAESPE *et al.*, 2016).

1.3 Classificação e Escalas Prognósticas em SMD

1.3.1 Desenvolvimento da Classificação da SMD Pediátrica

A SMD foi descrita pela primeira vez por Giovanni Antonio Di Guglielmo em 1920 como “Bil morbo Di Guglielmo” (BAIN, 2003). Até a década de 1980, uma variedade de anormalidades hematológicas com bloqueio de diferenciação mieloide e citopenias crônicas era classificada como pré-leucemia (KOEFFLER & LEONG, 2017). No entanto, de 10-40% dos pacientes com mielodisplasias, de fato, evoluíam para uma leucemia aguda (ARBER *et al.*, 2016). Desta forma, a denominação de pré-leucemia não era condizente com curso clínico das mielodisplasias em todos os pacientes.

Em 1982, o grupo de hematologistas franceses, americanos e britânicos (FAB) propôs a primeira classificação para as mielodisplasias, que passaram a ser denominadas “Síndrome Mielodisplásica”. Assim, a terminologia “pré-leucemia” deixou de ser utilizada (VARDIMAN, 2012; HOFMANN, 2015).

A classificação do grupo FAB foi baseada, principalmente, na porcentagem de blastos e nas características morfológicas. Dessa forma, a SMD foi dividida em 5

subgrupos: anemia refratária (AR), anemia refratária com sideroblastos em anel (ARSA), anemia refratária com excesso de blastos (AREB), anemia refratária com excesso de blastos em transformação (AREB-t) e leucemia mielomonocítica crônica (LMMC) (Tabela 1.2) (BENNETT *et al.*, 1982).

Tabela 1.2: Critérios para classificação da SMD propostos pelo grupo FAB

Subtipo	Monócitos (µL) Sangue Periférico	Sideroblastos em anel (%) Medula óssea	Células Blásticas (%)		
			Sangue Periférico	Medula óssea	Bastões de Auer Medula óssea
AR	Não	< 15	< 1	< 5	Não
ARSA	Não	> 15	< 1	< 5	Não
AREB	Não	Não	< 5	5 - 20	Não
AREB-t	Não	Não	> 5	20 - 30	Sim ou Não
LMMC	> 1000	Não	< 5	< 20	Não

(Adaptado de BENNETT *et al.*, 1982)

Nas duas décadas seguintes, a classificação FAB foi utilizada em centenas de estudos morfológicos, clínicos e genéticos, que ajudaram a esclarecer alguns aspectos da patogênese da SMD e seu tratamento. Todavia, em qualquer esquema de classificação, as questões podem surgir na sua aplicação em subgrupos específicos de pacientes ou pode haver controvérsias relacionadas à nomenclatura específica, critérios diagnósticos ou significado científico. Além disso, para se manter relevante deve incluir novas informações (VARDIMAN, 2012).

Em 2001, a Organização Mundial de Saúde (OMS) reuniu clínicos, patologistas e citogeneticistas e propôs uma nova classificação para a SMD (Figura 1.1). A classificação da OMS manteve os princípios básicos da classificação FAB, porém incorporou informações mais recentes, como as alterações citogenéticas, para refinar o diagnóstico e melhorar seu valor prognóstico (VARDIMAN *et al.*, 2002; BENNETT, 2005).

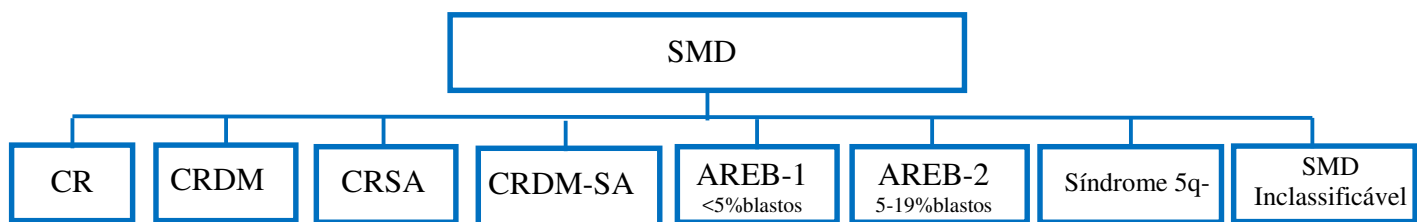


Figura 1.1: Classificação da SMD proposta pela OMS em 2001. (CR) citopenia refratária, (CRDM) citopenia refratária com displasia de multi-linhagens; (CRSA) citopenia refratária com sideroblastos em anel; (CRDM-SA) citopenia refratária com displasia de multi-linhagens com sideroblasto em anel; (AREB-1) Anemia refratária com excesso de blastos 1; (AREB-2) Anemia refratária com excesso de blastos 2. Adaptado de VARDIMAN *et al.*, 2002.

Alterações na classificação da OMS incluem uma mudança na nomenclatura dos subtipos iniciais, AR e ARSA, que passaram a ser denominados como citopenia refratária (CR) e citopenia refratária com sideroblastos em anel, uma vez que nem sempre a citopenia apresentada era uma anemia. Houve a adição de novas categorias: a citopenia refratária com displasia em múltiplas linhagens (CRMD) e a citopenia refratária com displasia em múltiplas linhagens com sideroblastos em anel (CRDM-SA) (VARDIMAN *et al.*, 2002; BENNETT, 2005).

A classificação da OMS também reconhece uma alteração citogenética como entidade clínica definida como a “síndrome 5q-”, originando o subgrupo da SMD associado com a deleção 5q isolada. Foi criado o grupo da SMD inclassificável, que inclui os pacientes com displasia significativa de uma única linhagem, mas sem outros critérios de classificação. Por último, a leucemia mielomonocítica crônica (LMMC), por apresentar características mielodisplásicas e mieloproliferativas, foi incluída no grupo de doenças mielodisplásicas/mieloproliferativas (VARDIMAN *et al.*, 2002; BENNETT, 2005. GERMING *et al.*, 2006).

A principal diferença entre as classificações FAB e OMS foi a exclusão do subtipo AREB-t, agora pacientes com 20-30% de blastos na medula óssea passam a ser considerado uma leucemia. Desta forma, os pacientes com mielodisplasia e contagem de blastos entre 20-29% passaram a ser classificados com LMA de múltiplas linhagens. O subtipo AREB passou a ser dividido em dois grupos utilizando-se como base a porcentagem de blastos na medula óssea: AREB-1 (5 - 9% de blastos) e AREB-2 (10-19% de blastos) (VARDIMAN *et al.*, 2002; BENNETT, 2005).

Essa modificação apresentou um impacto direto na conduta com os pacientes pediátricos, uma vez que aqueles pacientes com blastos acima de 20% passaram a ser tratados como LMA e demonstravam-se refratários à quimioterapia com alto índice de

recaídas. Além disso, diversos estudos apontam diferenças significativas morfológicas, citogenéticas e prognósticas da doença entre os pacientes adultos e os pediátricos, propondo que a SMD pediátrica primária passe a ser vista como uma entidade distinta (HASLE *et al.*, 2003; HASEGAWA, 2016; HASLE, 2016; VASEKOVA & PLANK 2016).

A SMD pediátrica frequentemente apresenta bicitopenia (trombocitopenia e neutropenia) e raramente apresenta anemia isolada. A síndrome da del(5q) isolada e o subtipo ARSA raramente são observados nos pacientes pediátricos (HASLE *et al.*, 2016; KARDOS *et al.*, 2003). Na tabela 1.3 podemos observar as principais diferenças entre os pacientes pediátricos e os adultos.

Tabela 1.3: Principais diferenças observadas entre os pacientes pediátricos e adultos com SMD primária

Parâmetros	Crianças	Adultos
Incidência/ milhão	1- 2	40
Sintomas clínicos associados	1/3	<5 %
Grupos Morfológicos		
ARSA	<2%	25%
SMD hipoplásica	Comum	Rara
Alterações citogenéticas	60%	40%
-7 / 7q -	30%-40%	10%
5q-	1%-2%	20%
Hipermetilação	>50%	>50%
Alteração em genes de <i>splicing</i>	<2%	Comum
Objetivo principal do tratamento	Curativo	Paliativo

(HASLE, 2016)

Diante dessas diferenças, Hasle e colaboradores em 2003 propuseram uma classificação baseada nos achados dos pacientes pediátricos, tendo como base os parâmetros da classificação FAB e OMS. Os critérios utilizados foram: citopenias sem uma causa esclarecida (anemia, neutropenia e trombocitopenia); pelo menos duas linhagens apresentando displasias, alteração citogenética clonal adquirida e número de blastos igual ou maior que 5% na medula óssea. Nessa classificação são reconhecidos três grupos: o grupo das doenças mieloproliferativas e mielodisplásicas (LMMJ); o grupo da síndrome de Down associada com a SMD e o grupo da SMD primária propriamente dita, o qual foi subdividido em: citopenia refratária (CR), anemia refratária com excesso de blastos (AREB) e anemia refratária com excesso de blastos em transformação (AREB-t) (Figura 1.2) (HASLE *et al.*, 2003).

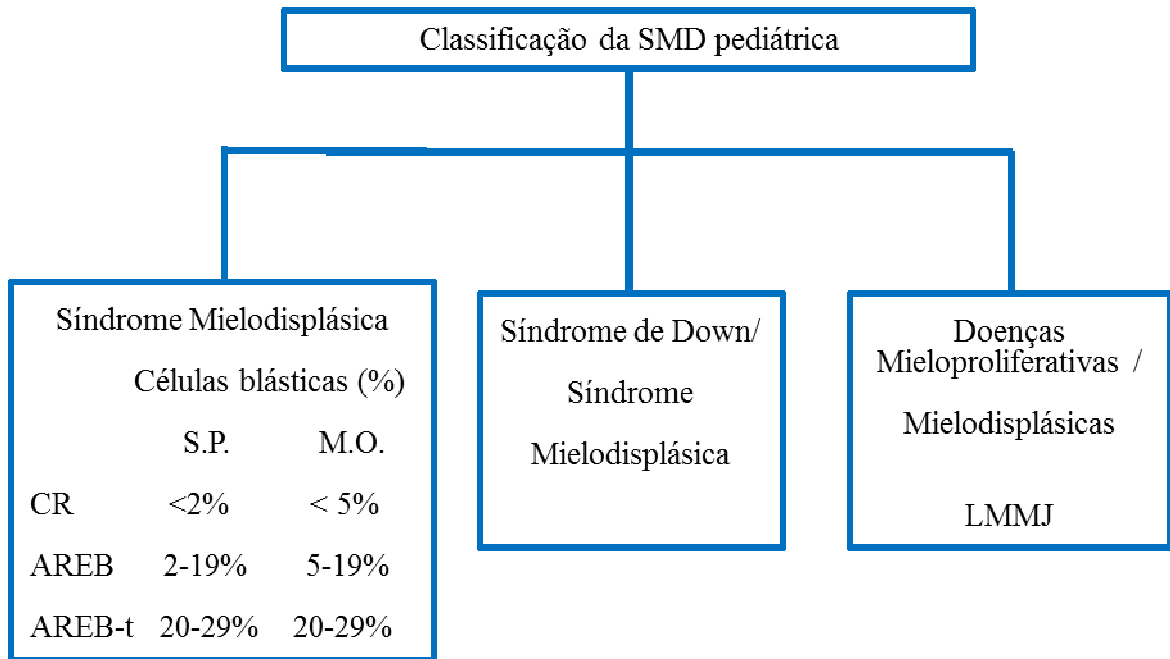


Figura 1.2: Classificação da SMD pediátrica proposta em 2003. (CR) citopenia refratária; (AREB) anemia refratária com excesso de blastos; (AREB-t) anemia refratária com excesso de blastos em transformação; (LMMJ) leucemia mielomonocítica juvenil; (S.P) sangue periférico; (M.O.) medula óssea (Adaptada de HASLE *et al.*, 2003).

Em 2008, foi feita uma revisão da classificação da OMS para os pacientes adultos e nessa ocasião foram reconhecidas características exclusivas da SMD pediátrica. Foi introduzida uma entidade provisória, a citopenia refratária da infância (CRI). Contudo, para os pacientes pediátricos com os subtipos mais avançados, foi sugerido que passassem a ser classificados com os pacientes adultos em AREB-1 e AREB-2 (Figura 1.3) (VARDIMAN *et al.*, 2008; HASEGAWA 2016).

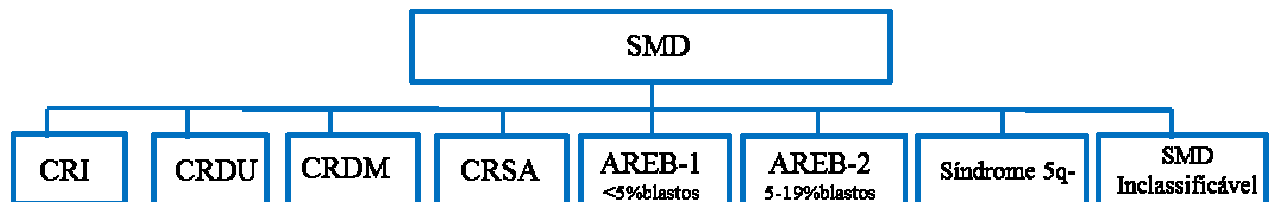


Figura 1.3: Classificação sugerida pela OMS em 2008 para os pacientes com SMD. (CRI) citopenia refratária da infância; (CRDU) citopenia refratária com displasia de uni-linhagem; (CRDM) citopenia refratária com displasia de multi-linhagem; (CRSA) citopenia refratária com sideroblasto em anel; (AREB-1) anemia refratária com excesso de blastos 1; (AREB-2) anemia refratária com excesso de blastos 2 (Adaptado de VARDIMAN *et al.*, 2008).

A classificação em AREB-1 e AREB-2 não apresentou impacto prognóstico para pacientes da faixa etária pediátrica. Assim, o subtipo AREB-t ainda é usado para a classificação dos pacientes pediátricos. Além disso, crianças com AREB-t apresentam contagens nas células sanguíneas periféricas estáveis durante semanas ou meses e não comportam-se clinicamente como a LMA (CHATTERJEE & CHOUDHRY, 2013; GLAUBACH *et al.*, 2014).

Desde a classificação da OMS de 2008, houve muitos avanços na identificação de biomarcadores associados com as neoplasias mieloides. Esses novos biomarcadores, decorrentes de diversos estudos de análise de expressão gênica e sequenciamento de nova geração, estão sendo introduzidos na prática clínica como critérios diagnósticos e prognósticos, tornando necessária uma revisão atualizada da classificação das neoplasias mieloides. Dessa forma, em 2016, através de um consenso entre patologistas, hematologistas, oncologistas e geneticistas, a OMS publicou sua nova classificação (ARBER *et al.*, 2016).

No entanto, não houve alterações na classificação da SMD da infância continuando como uma entidade provisória (ARBER *et al.*, 2016). No mesmo ano, Hasle retoma a discussão sobre a classificação da SMD pediátrica dividindo em SMD de baixo risco (CRI) e SMD avançada (AREB, AREB-t), utilizando os mesmos critérios da classificação proposta em 2003. Além disso, enfatizou que a porcentagem de blastos não é suficiente para diferenciar SMD de LMA, que o diagnóstico deve incluir avaliação clínica, taxa de progressão, morfologia, imunofenotipagem e citogenética (HASLE, 2016).

1.3.2 Escala de Prognóstico em SMD

O prognóstico dos pacientes com SMD é muito heterogêneo. Dessa forma, para auxiliar na escolha do tratamento foi desenvolvida uma escala prognóstica chamada Sistema Internacional de Escala Prognóstica em SMD, o IPSS (GREENBERG *et al.*, 1997).

O IPSS foi criado em 1997 a partir de um estudo envolvendo 816 pacientes, onde ficou definido que as variáveis preditivas de prognóstico e sobrevida mais importantes para os pacientes com SMD são: porcentagem de blastos na medula óssea, cariótipo e número de citopenias. A escala de prognóstico apresenta 4 grupos de risco: baixo risco, intermediário 1, intermediário 2, e alto risco (Tabela 1.4) (GREENBERG *et al.*, 1997).

Tabela 1.4: Sistema Internacional de Escala Prognóstica para a SMD (IPSS, 1997)

Variáveis Prognósticas	Pontuação				
	0	0,5	1	1,5	2,0
Blastos M.O.	< 5%	5 -10%	-	11 - 20%	21 -30%
Cariótipo*	Bom	Intermediário	Mau		
Citopenias	0 - 1	2 - 3			

Pontuação para os grupos de risco: **Baixo risco:** 0 pontos; **Intermediário 1:** 0,5-1,0 pontos; **Intermediário 2:** 1,5-2,0; **Alto risco:** $\geq 2,5$ pontos. ***Cariótipos: bom prognóstico:** cariótipos normais, -Y, del(5q), del(20q); **mau prognóstico:** cariótipos complexos, anomalias envolvendo o cromossomo 7; **prognóstico Intermediário:** outras anomalias cromossômicas (GREENBERG *et al.*, 1997).

O IPSS é um sistema muito fácil de ser aplicado na rotina da assistência, com grande reprodutibilidade, sendo utilizado em diversos estudos científicos. Contudo, um ponto crítico apontado no IPSS é em relação ao grupo citogenético intermediário que abrange um grande número de alterações cromossômicas e algumas parecem estar associadas com a transformação leucêmica. Dessa forma, em 2012 foi elaborado o IPSS revisado (IPSS-R). (GARCIA-MANEIRO, 2012; GREENBERG *et al.*, 2012), em que houve a definição de 5 grupos de prognóstico citogenético: muito baixo, baixo, intermediário, alto e muito alto (Tabela 1.5) (GARCIA-MANEIRO, 2012; GREENBERG *et al.*, 2012).

Embora fatores prognósticos adicionais tenham sido identificados e novos sistemas de pontuação prognóstica tenham demonstrado a estratificação dos pacientes com SMD, a eficácia das evidências científicas e a segurança dos agentes terapêuticos atualmente disponíveis são derivadas de estudos clínicos que adotaram a escala do IPSS como referência para a inclusão de pacientes e análise de resultados. Como consequência, recomendações terapêuticas baseadas em evidências referem-se ao IPSS (MALCOVATI *et al.*, 2013). Alguns estudos já estão utilizando o impacto prognóstico do IPSS-R. Nesses estudos, foi observado que a nova escala estratificou significativamente a sobrevida global em pacientes com SMD recebendo TCTH-alogênico (DELLA PORTA *et al.*, 2014).

Tabela 1.5: Classificação citogenética de grupos de risco para SMD segundo o IPSS-R

Subgrupo Citogenético	Cariótipos
Muito bom	del(11q), -Y
Bom	normal, del(5q), del(12p), del(20q), del(5q) acompanhado de outra alteração
Intermediário	del(7q), +8, +19, +21, i(17q), outras e mais de uma alteração
Desfavorável	-7, inv(3), t(3), del(3q), -7/del(7q), acompanhadas de outras alterações e cariótipo complexo até 3 alterações
Muito desfavorável	Complexo com mais de 3 alterações cromossômicas

(Adaptado de GARCIA-MANERO, 2012)

1.4 Alterações Citogenéticas em SMD Primária Pediátrica

A citogenética possui um papel fundamental no diagnóstico e prognóstico dos pacientes com SMD, auxiliando na indicação do tratamento, como o transplante de células-tronco hematopoéticas alogênico. Durante o curso da doença, a análise citogenética contribui para avaliar a resposta ao tratamento ou pode identificar a evolução clonal com a aquisição de novas alterações cromossômicas (JABBOUR *et al.*, 2013). A análise do cariótipo da medula óssea faz parte da rotina da prática clínica (BACHER *et al.*, 2009; NYBAKKEN & BAGG, 2014; SPERLING *et al.*, 2016). Os pacientes pediátricos apresentam uma frequência de anormalidades cromossômicas em cerca de 50-70% dos casos (HASLE *et al.*, 2003, HASLE, 2016).

As alterações citogenéticas podem variar desde uma simples mudança estrutural ou numérica até complexas lesões genômicas, envolvendo três ou mais cromossomos distintos. Anormalidades simples ocorrem, frequentemente, na fase inicial da doença. Entretanto, durante a transformação leucêmica e/ou progressão da doença, novas alterações citogenéticas podem surgir gerando subclones (FERNANDEZ *et al.*, 2000).

Diferente das leucemias, que são predominantemente caracterizadas pelas translocações cromossômicas (GREAVES & WIEMELS, 2003), na SMD, as alterações mais observadas são as perdas cromossômicas parciais /totais (deleções / monossomias) ou ganhos cromossômicos (trissomias) (PANANI & ROUSSOS, 2005). Embora as translocações cromossômicas sejam raramente observadas na SMD, alguns estudos têm descrito a ocorrência das seguintes translocações: t(11;16)(q23;p13), t(3;21)(q26;q22),

t(1;3)(p36;q21), t(2;11)(p21;q23), t(6;9)(p23;q34) e t(9;11)(p24;q22) (OLNEY & LE BEAU, 2001; NYBAKKEN & BAGG, 2014; LOVATEL, *et al.* 2018).

As alterações citogenéticas mais frequentes em SMD são: a deleção do braço longo do cromossomo 5 [del(5q)], seguida da trissomia do cromossomo 8 (+8), cariótipos complexos (≥ 3 alterações citogenéticas), alterações no cromossomo 7 [tanto monossomia (-7) quanto deleções [del(7q)]], deleção do braço longo do cromossomo 11 [del(11q)], do braço curto do cromossomo 12 [del(12p)], do braço curto do cromossomo 17 [del(17p)], do braço longo do cromossomo 20 [del(20q)] e a nulissomia do cromossomo Y (-Y) (FERNANDEZ *et al.*, 2000; De Souza *et al.*, 2014; BACHER *et al.*, 2015). Outras alterações menos frequentes são: deleção do braço longo do cromossomo 13 [del(13q)], alterações envolvendo o cromossomo 3 [como a inversão do braço longo [inv(3)(q21q26)], translocações ou deleção do braço longo (del(3q)], isocromossomo de 17p [i17(q)], perda do cromossomo X (-X), monossomia do cromossomo 1 (-1) e trissomia do cromossomo 14 (+14) (BACHER *et al.*, 2015).

Quando analisamos somente os pacientes pediátricos, a perda completa [monossomia do cromossomo 7 (-7)] ou parcial do cromossomo 7 [del (7q)] é a alteração citogenética mais frequente, ocorrendo em cerca de 30% dos casos de SMD, seguida pela +8, +21 e cariótipos complexos (KARDOS *et al.*, 2003; HASLE *et al.*, 2007; RAU *et al.*, 2012; GLAUBACH *et al.*, 2014, HASLE, 2016).

Crianças com SMD e alterações envolvendo o cromossomo 7 apresentam um alto risco de progressão clonal e, portanto, necessitam de transplante de células-tronco hematopoéticas. Além disso, possuem grandes chances de apresentarem outras alterações associadas a nível molecular. No cromossomo 7, estão localizados diversos genes relacionados com neoplasia relevantes, que são considerados supressores tumorais e que atuam como fator transcricional, na regulação epigenética e no ciclo celular (Figura 1.4) (WLODARSKI *et al.*, 2018).

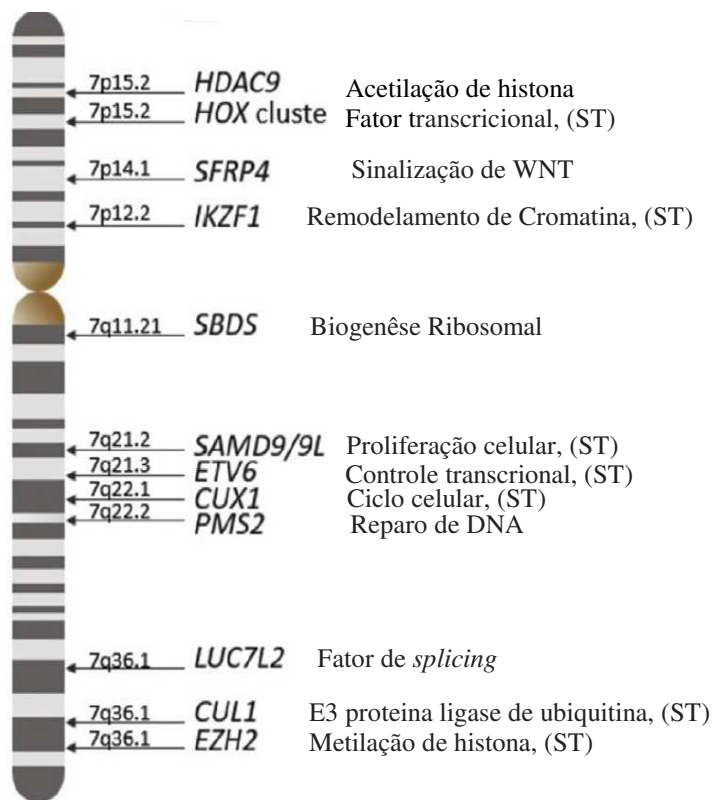


Figura 1.4: Genes localizados no cromossomo 7 associados à predisposição de neoplasias

No cromossomo 7 estão agrupados vários genes considerados supressores tumorais (ST), que atuam em funções diversas que vão ser importantes para o desenvolvimento e progressão da SMD (Adaptado de Wlodarski et al., 2018).

Ambas as escalas prognósticas, IPSS e IPSS-R, classificam a monossomia do cromossomo 7 como uma alteração de mau prognóstico, sendo que anormalidades que envolvem esse cromossomo [-7/ del(7q)] são consideradas de alto risco e estão associadas com desfechos clínicos desfavoráveis (GREENBERG *et al.*, 1997; GREENBERG *et al.*, 2012).

A trissomia do cromossomo 8 (+8) é a alteração cromossômica numérica mais comum (5-7%) presente em SMD pediátrica (SAUMELL *et al.*, 2015). Os pacientes apresentando a +8 isolada são classificados no grupo de risco citogenético intermediário de acordo com o IPSS e com IPSS-R (GREENBERG *et al.*, 2012; GARCIA-MANEIRO, 2012). O significado biológico da trissomia de 8 ainda não está claro, contudo vem sendo associado ao aumento do número de cópias do gene *c-MYC*. O gene *c-MYC* está localizado na região 8q24 e atua como mediador central em uma variedade de funções como o controle do crescimento e apoptose, bem como metabolismo, adesão e diferenciação celular (ANGELOVA *et al.*, 2011). O valor prognóstico da +8 é contraditório. Alguns

estudos classificam esta alteração como intermediária, no entanto, outros trabalhos demonstraram que a +8 e a amplificação de *c-MYC* está correlacionada com a progressão da doença e a diminuição da sobrevida (MEYER & PENN, 2008; ANGELOVA *et al.*, 2011).

A trissomia do cromossomo 21(+21) é bem conhecida no contexto da Síndrome de Down (SD), sendo associada a um risco aumentado de desenvolvimento de LMA durante a infância. Além da SD, a +21 também pode ocorrer como uma anormalidade clonal somática em várias neoplasias hematológicas, como a SMD primária pediátrica (BACHER *et al.*, 2009).

A trissomia do cromossomo 21 é a segunda alteração cromossômica numérica mais comum nos pacientes pediátricos com SMD e é classificada pelo IPSS e IPSS-R como uma alteração de risco prognóstico intermediário (GREENBERG *et al.*, 2012; GARCIA-MANEIRO, 2012). No entanto, devido ao pequeno número de pacientes com +21 isolada, o conhecimento sobre o impacto prognóstico dessa alteração é limitado e a mesma deve ser observada com atenção. Também pode ocorrer a monossomia do 21 (-21) isolada ou em combinação com uma ou mais alterações citogenéticas; porém, a frequência da +21 e - 21 como parte de cariótipos complexos continua não sendo bem definida (BACHER *et al.*, 2009).

O cariótipo complexo é associado com uma instabilidade genômica; é tradicionalmente definido pela presença de três ou mais alterações independentes, e é classificado pelo IPSS e IPSS-R como uma alteração de mau ou de muito mau prognóstico em SMD (GREENBERG *et al.*, 2012; GARCIA-MANEIRO, 2012). Cariótipo complexo passou a ser definido por cariótipos que apresentem três ou mais alterações cromossômicas incluindo, pelo menos, uma alteração estrutural. Nessa nova definição, a presença de cariótipo complexo passa a ser um marcador prognóstico independente para prever o desfecho clínico desfavorável de crianças com SMD (GÖHRING *et al.*, 2010).

A maioria dos pacientes pediátricos na fase inicial da doença, CRI, apresenta cariótipo normal (HOFMANN, 2015) e são classificados pelo IPSS e IPSS-R como um grupo de bom prognóstico (GARCIA-MANEIRO, 2012; GREENBERG *et al.*, 2012). Todavia, alguns desses pacientes, mesmo apresentando cariótipo normal, possuem uma rápida evolução da doença. Nesses casos, tem sido sugerido a presença de alterações moleculares (BEJAR & STEENSMA, 2014).

As alterações cromossômicas hoje são vistas como eventos secundários às alterações a nível molecular, sendo originadas a partir de uma instabilidade genômica causada por essas alterações precedentes (LINDSLEY & EBERT, 2013).

1.5 Alterações Genéticas e Epigenéticas em SMD

O conhecimento da patogênese da SMD na última década tem sido aprimorado com base na descoberta de novas alterações genéticas e epigenéticas (GANGULY & KANDAM, 2016). Tem sido sugerido que alterações moleculares afetariam uma célula progenitora hematopoética pluripotente levando ao surgimento de clones e subclones aberrantes. As neoplasias malignas mieloides são caracterizadas por alterações epigenéticas no genoma (epigenoma) devido, em parte, às mutações observadas em genes que atuam como modificadores epigenéticos. Algumas mutações levam a uma instabilidade genômica, promovendo a aquisição de lesões genéticas e citogenéticas subsequentes. Assim, aquisições sequenciais dessas alterações permitem durante o curso da progressão da doença o desenvolvimento de múltiplos clones geneticamente relacionados (Figura 1.5) (LINDSLEY & EBERT, 2013, SPERLING *et al.*, 2016). No entanto, ainda não é conhecida a sequência eventos que culminam com desenvolvimento e evolução da SMD. Além disso, devido à heterogeneidade da SMD, é provável que existam diferentes mecanismos de iniciação e de progressão da doença (HASLE, 2016).

As alterações genéticas incluem: mutações pontuais, grandes deleções ou ampliações gênicas, ou alterações que modificam a expressão gênica (como a presença de mutações em promotores e potenciadores gênicos, ou mesmo que atuam na regulação epigenética) (GANGULY & KANDAM, 2016; BEJAR & GREENBERG, 2017).

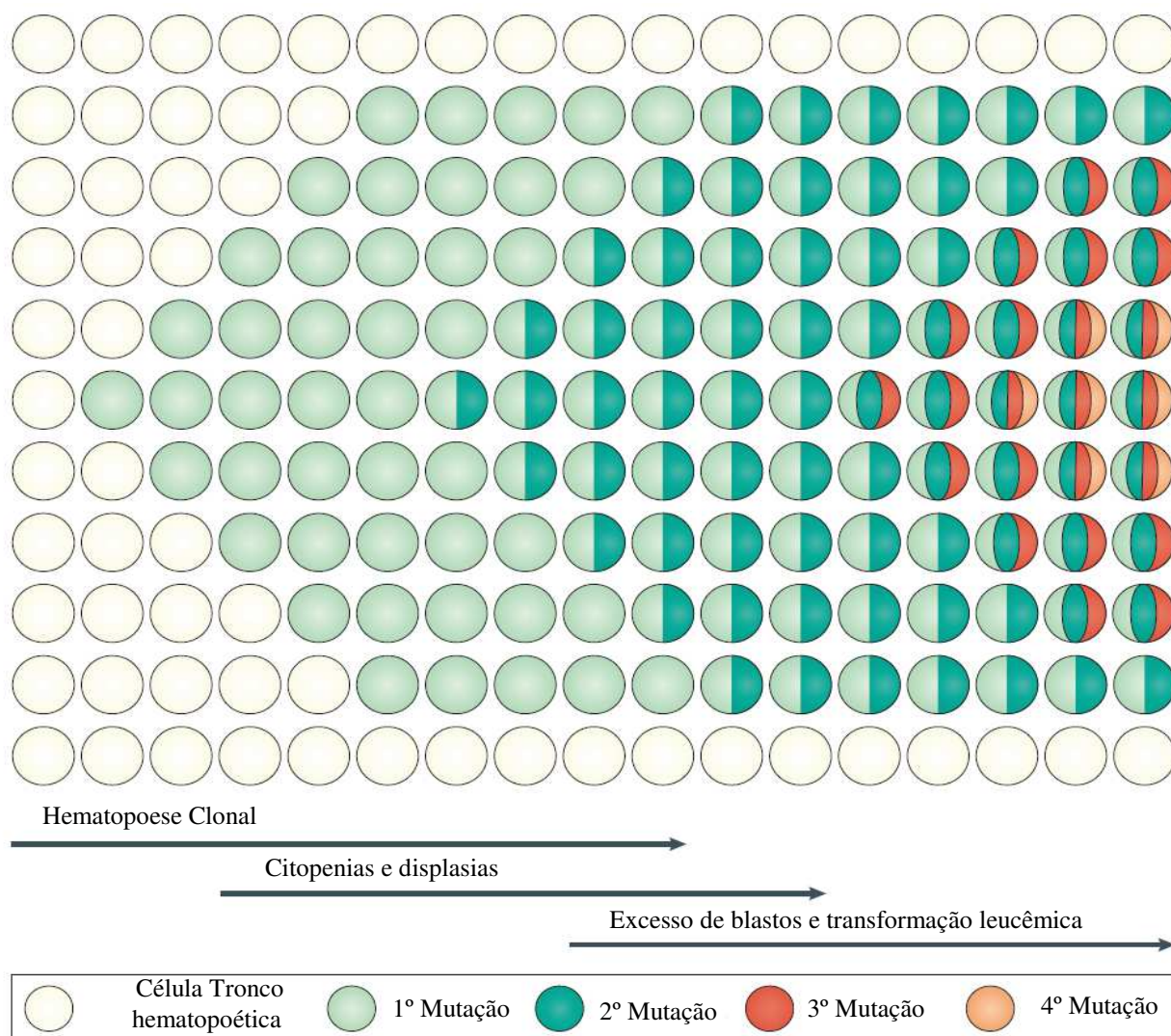


Figura 1.5: Múltiplas etapas do desenvolvimento da SMD. As mutações iniciais tendem a levar ao aumento da auto renovação das células-tronco hematopoéticas, à expansão clonal e ao desenvolvimento de hematopese clonal de potencial indeterminado. À medida que o clone mutante continua a crescer, dá origem a uma população em expansão de células em que a aquisição de lesões genéticas e/ou epigenéticas adicionais pode promover a progressão para a malignidade aparente. Esses eventos subclonais secundários tendem a levar ao desenvolvimento de displasias com o aparecimento da SMD e eventualmente sua evolução para LMA (SPERLING *et al.*, 2016).

Dentre os genes alterados há um pequeno grupo denominado mutações “condutoras”, assim chamado devido ao seu comportamento mais agressivo e associação à evolução clonal. Já aqueles genes cujas mutações não impactam a dominância clonal e não são observados regularmente, recebem o nome de mutações “passageiras”.

Estudos genéticos conduzidos em pacientes com SMD entre 1987 e 2005 identificaram mutações nos genes que atuam principalmente como fatores de transcrição *TP53*, *RUNX1*, *GATA2* e genes que estão envolvidos em vias de sinalização importantes como *NRAS*, *KRAS*. Desses, *TP53*, *RUNX1* e *NRAS* foram encontrados mais frequentemente mutados em neoplasias mieloides (BEJAR & STEENSMA, 2014).

A frequência de mutação em pacientes adultos com SMD é elevada, cerca de 80-90% apresentaram uma ou mais mutações dentre um número limitado de 40 genes (HAFERLACH *et al.*, 2014; ARBER *et al.*, 2016). Os genes mais comumente mutados na mielodisplasia atualmente são: *SF3B1*, *TET2*, *SRSF2*, *ASXL1*, *DNMT3A*, *RUNX1*, *U2AF1*, *TP53* e *EZH2* (HAFERLACH *et al.*, 2014; ARBER *et al.*, 2016, GREENBERG, *et al.*, 2017). A mutação mais frequente, tanto na hematopoese quanto na SMD em adultos, é a troca de uma citosina por uma timina (C> T), que se configura em uma característica da desaminação de metilcitidina associada à idade (JAISWAL *et al.*, 2014; ARBER *et al.*, 2016; SPERLING *et al.*, 2016). Embora essa troca venha sendo associada ao envelhecimento normal, um estudo recente com pacientes pediátricos com neoplasias mielóides também relata ser a troca mais comum (SCHWARTZ *et al.*, 2017).

Outros processos relacionados com a idade como a redução progressiva dos telomêros também podem contribuir para a patogênese da SMD (SPERLING *et al.*, 2016). Isso pode explicar em parte porque as frequências de mutações são menores nos pacientes pediátricos. Na Figura 1.6 podemos observar a distribuição da frequência de mutação na SMD em pacientes adultos, sendo as mais frequentes aquelas que envolvem fatores de *splicing* e reguladores epigenéticos. Os fatores de *splicing* representam em torno de 50% de todas as mutações observadas em SMD, e esse percentual pode chegar a mais de 70% em pacientes com o subtipo ARSA. A segunda classe de genes, que apresenta uma fração semelhante aos primeiros citados, são os genes que atuam como reguladores epigenéticos. Aproximadamente 25% dos pacientes têm mutações em ambas as classes. (PAPAEMMANUIL *et al.*, 2013). Além disso, muitos outros genes podem estar comutados com fatores de *splicing* e regulares epigenéticos, contudo tais mutações também ocorrem em 15% dos pacientes com ausência de lesões nessas duas classes principais (BEJAR & STEENSAMA, 2014).

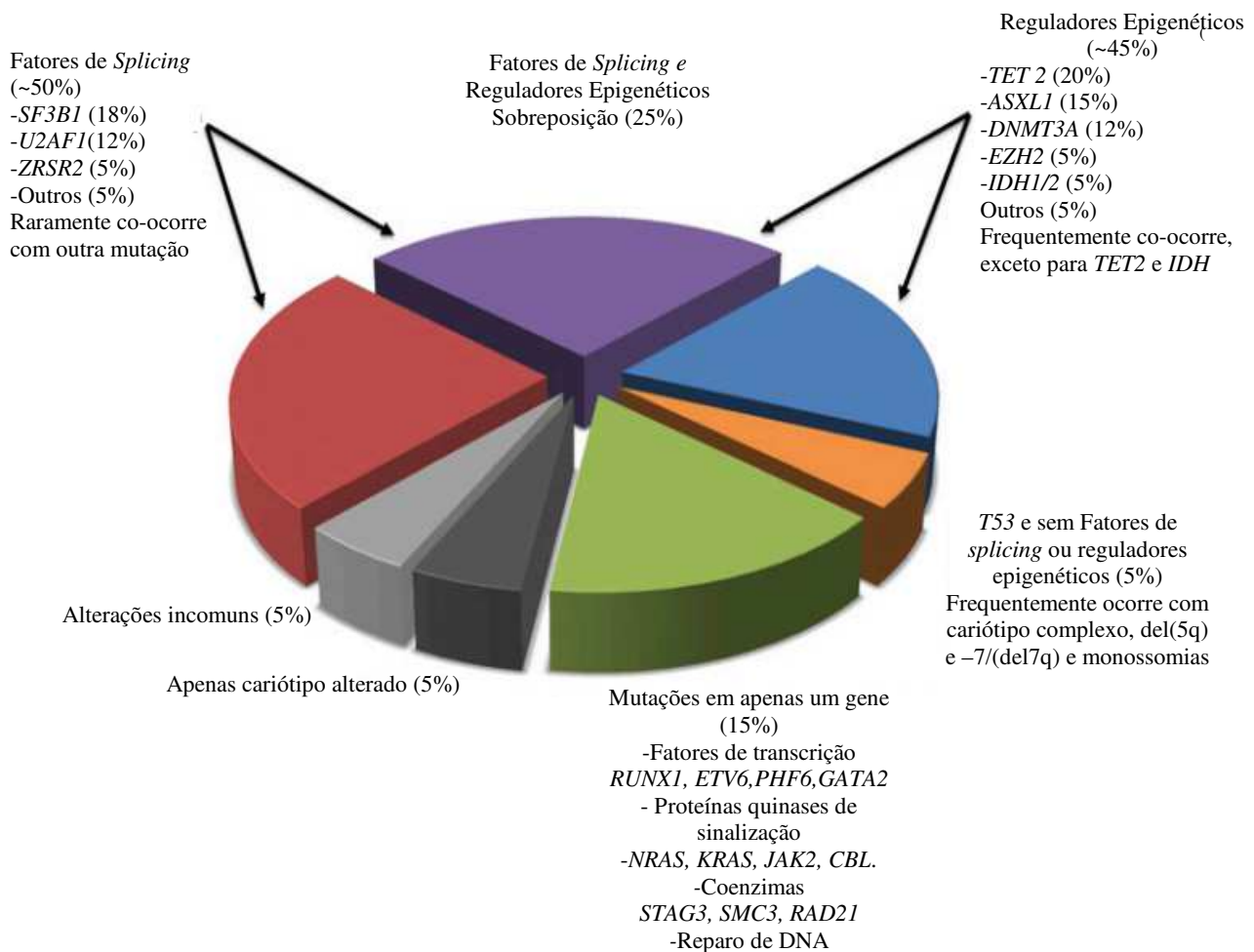


Figura 1.6: Distribuição das classes gênicas com mutação em SMD. Aproximadamente 50% dos pacientes apresentam mutação em gene de fator de *splicing*, os genes reguladores epigenéticos representam a segunda maior classe de genes mutados, sendo que aproximadamente 25% dos pacientes possuem mutações em genes de ambos os grupos. Pacientes com mutações em *TP53* possuem menos mutações cooperantes, mas são frequentemente associadas a anormalidades cromossômicas. E apenas 10% dos pacientes apresentam mutações fora desses genes mais comuns (BEJAR & STEENSAMA, 2014).

Curiosamente, a maioria dessas mudanças, em particular as que envolvem os de fatores de *splicing*, são eventos raros nos pacientes pediátricos, sendo sugerido um mecanismo patogênico diferente na SMD pediátrica (HIRABAYASHI *et al.*, 2012; OBENAUER *et al.*, 2016; PASTOR *et al.*, 2016, SCHWARTZ *et al.*, 2017).

Um estudo recente sugere que o panorama epigenético nos pacientes pediátricos seja mais permissivo para a transformação leucêmica que nos adultos. Tem sido observado que a frequência das mutações em genes que atuam como reguladores epigenéticos é rara na infância, sendo mais comuns as mutações somáticas em genes envolvidos na via de RAS/MAP quinase (Figura 1.7) (SCHWARTZ *et al.*, 2017).

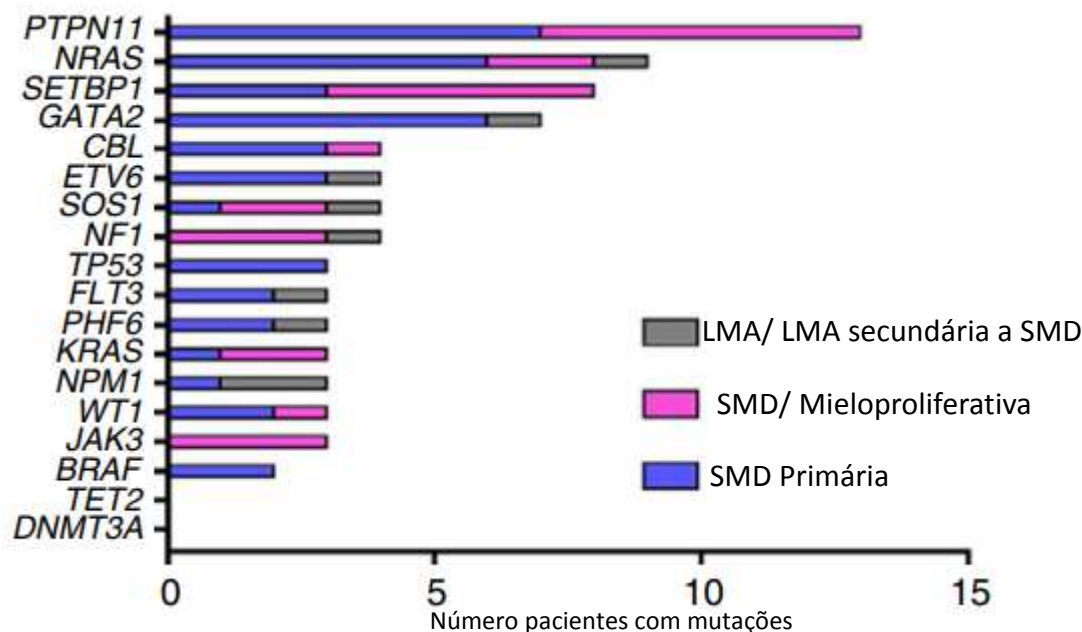


Figura 1.7: Mutações somáticas frequentes na SMD pediátrica. Gráfico mostrando a frequência das mutações somáticas mais observadas na coorte de 77 pacientes pediátricos (Adaptado de SCHWARTZ *et al.*, 2017).

Diferente da SMD no adulto em que há o acúmulo de mutações passageiras e condutoras para o desenvolvimento da doença, nos pacientes pediátricos o panorama das mutações é composto de mutações somáticas do tipo condutoras em genes importantes como *SETBP1*, *ASXL1*, *RUNX1* e oncogenes como *RAS* (WLODARSKI *et al.*, 2018).

Por outro lado, Obenauer e colaboradores, em 2016, identificaram mutações clonais e subclonais em pacientes pediátricos em genes envolvidos na metilação do DNA, regulação epigenética, sinalização e transcrição em frequências comparáveis às relatadas na SMD no adulto (OBENAUER *et al.*, 2016).

1.5.1 Maquinaria Epigenética na SMD

Embora a etiopatologia da SMD seja extremamente heterogênea, alguns casos podem ser originados por alterações epigenéticas das células-tronco hematopoéticas. Essa natureza epigenética pode ser explicada, em parte, por dois pontos: dentre os genes observados com maior frequência de mutação na SMD, aproximadamente 45% são responsáveis pela regulação de mecanismos epigenéticos (BEJAR & STEENSAMA, 2014); segundo ponto, a SMD é a doença mais responsiva ao tratamento com inibidores de DNA metiltransferases (DNMTs). Com base nessas observações, a SMD vem sendo considerada um modelo ideal para estudo das alterações epigenéticas (ISSA, 2013).

As alterações epigenéticas são reconhecidas como causa central para várias alterações das “marcas” do câncer por ter um impacto no ciclo celular, no metabolismo das células, no sistema imunológico e na angiogênese. A desregulação dos mecanismos epigenéticos permite que outras mutações ocorram, dando às células neoplásicas uma vantagem proliferativa sobre as células normais (STAHL *et al.*, 2016).

O termo epigenética refere-se a modificações reversíveis e herdáveis que alteram o padrão de expressão de um gene sem que haja variação na sequência de nucleotídeos (HOLLIDAY, 1987; ALLIS & JENUWEIN, 2016). Os três principais mecanismos epigenéticos são as modificações das histonas, metilação do DNA e os RNAs não codificantes (como os microRNAs e RNA longos não codificantes (*lncRNAs*)). A atuação destes mecanismos pode ocorrer de forma isolada, mas, em sua maioria, se dá em conjunto podendo haver interferência mútua (VASILATOU *et al.*, 2013; ALLIS & JENUWEIN, 2016). Ademais, podem ser modulados por fatores ambientais como estilo de vida, estresse, estado nutricional, metabolismo e envelhecimento (FEIL & FRAGA, 2012).

A perda ou ganho de função dos mecanismos epigenéticos, muitas vezes, interrompe o padrão normal das modificações químicas (marcas epigenéticas), o que pode levar à expressão aberrante de um gene. Deste modo, o epigemona é também dinâmico e suscetível à intervenção farmacológica, denotando enorme importância para os pacientes com SMD, uma vez que a quimioterapia convencional se mostra ineficaz (MELDI & FIGUEROA, 2014).

Entre os mecanismos de regulação epigenética destacam-se as enzimas “escritoras” que colocam as marcas epigenéticas no DNA ou nas caudas das histonas; as enzimas que modificam ou retiram essas marcas são consideradas “editoras”; e enzimas que medeiam a interação de proteínas ou complexos proteicos “leitoras” (Figura 1.8), que são capazes de detectar os diferentes padrões de modificações da cromatina, do DNA e, a partir delas, desencadear um processo de regulação. Enzimas que fazem a leitura também são capazes de iniciar ou silenciar a transcrição, reparo de DNA e outros processos vitais. Algumas dessas enzimas são produtos de genes supressores de tumor (DAWSON *et al.*, 2012, PLASS *et al.*, 2013).

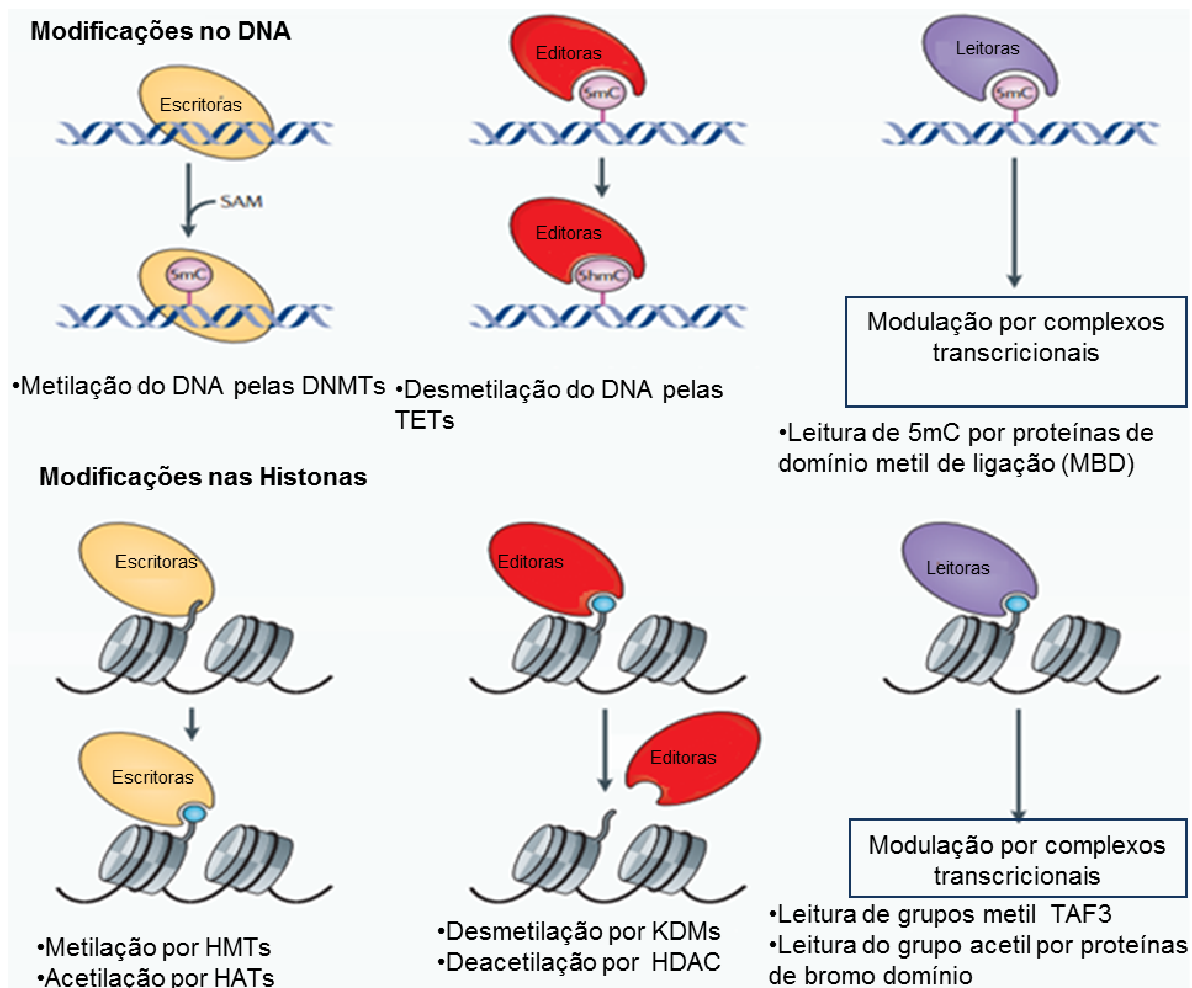


Figura 1.8: Enzimas envolvidas na modulação do epigenoma. Enzimas que estabelecem uma marca no DNA ou na cauda das histonas são chamadas de “escritoras”. Essas modificações podem ser removidas ou modificadas por enzimas “editoras”. A terceira classe de enzimas inclui as “leitoras” de marcas epigenéticas, que medeiam a interação das marcas com um complexo protéico que exerce efeitos sobre a transcrição. DNMT, DNA metiltransferase; HAT, histona acetiltransferase; HDAC, histona desacetilase; HMT, histona metiltransferase; KDM, histona desmetilase específica de lisina; TAF3, subunidade TFIID do fator de iniciação da transcrição 3; TET (Ten-eleven-translocation) (Adaptado de PLASS *et al.*, 2013).

1.5.2 Maquinaria de Metilação e Desmetilação do DNA

A metilação do DNA é considerada o mecanismo epigenético mais importante e melhor compreendido na SMD (ISSA, 2013). A metilação envolve a adição de um grupamento metil (CH_3) no carbono 5 de uma citosina seguida de guanina (dinucleotídeos CpG). Embora, nos mamíferos, em torno de 80% dos dinucleotídeos CpG encontrem-se metilados (SINGAL & GINDER, 1999), existem regiões do genoma que são ricas em dinucleotídeos CpGs, denominadas ilhas CpG e que estão próximas de regiões promotoras

de genes com expressão constitutiva, que se apresentam desmetiladas no genoma em condições normais (BERNSTEIN *et al.*, 2007).

Inicialmente, a maioria dos estudos realizados com foco nas neoplasias avaliaram a presença de metilação em ilhas CpGs presentes em regiões promotoras, uma vez que 60% das regiões promotoras são associadas com ilhas CpGs e a hipermetilação de citosinas destas ilhas CpGs está relacionada ao silenciamento de genes supressores de tumor (Figura 1.9) (BAYLIN & JONES, 2012; SANTINI, *et al.* 2013). Atualmente, novas regiões genômicas, como o corpo gênico e regiões com CpGs até 2 Kb de uma ilha CpG (denominadas “costa CpGs”) e regiões distantes com “potencialisadores” também começam a ser estudadas, visto que são frequentemente reguladas por metilação (WOUTERS & DELWEL, 2016).

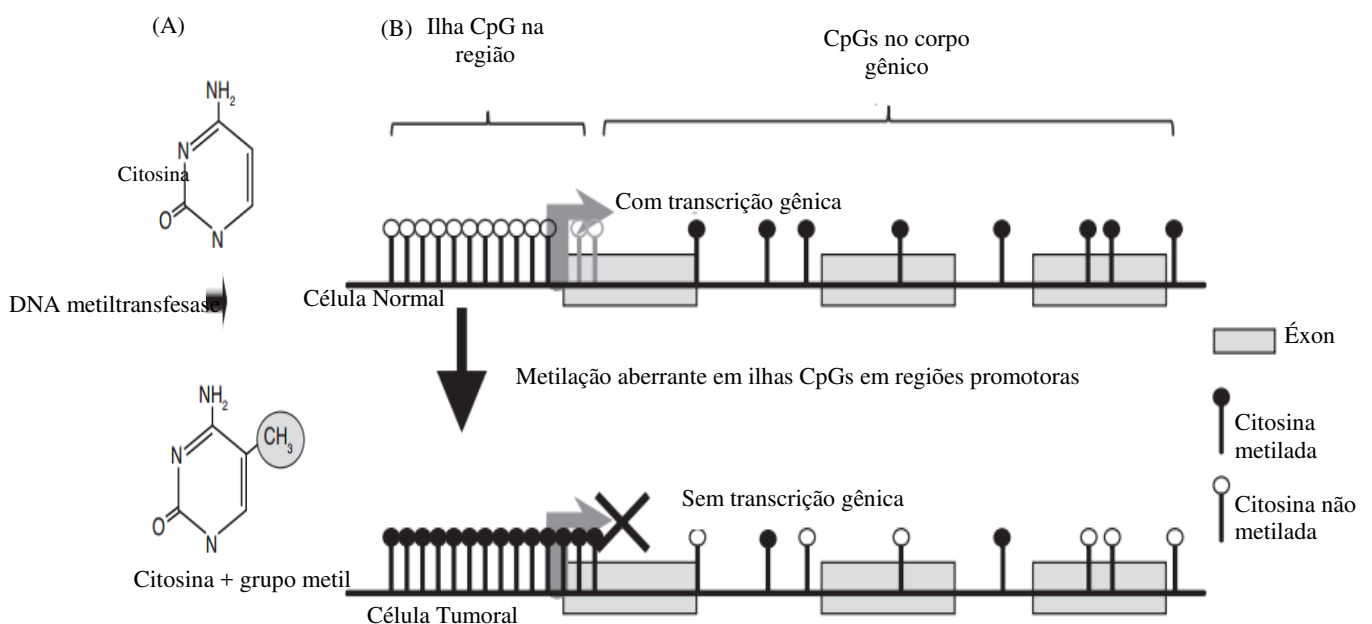


Figura 1.9: Metilação do DNA. (A): Reação de metilação da citosina. (B): Diagrama ilustrativo do efeito da metilação em uma região promotora gênica (Adaptada de Santini, *et al.*, 2013).

As enzimas DNA metiltransferases (DNMTs) são as enzimas “escritoras” responsáveis pela adição de um grupamento metil (CH_3) na posição 5 da citosina tendo, como doador de radicais metil, o S-adenosil-metionina (SAM) (SINGAL & GINDER, 1999). Nos mamíferos, existem 5 diferentes tipos de DNA metiltransferases: DNMT1, DNMT2, DNMT3A, DNMT3B e DNMT3L (LI *et al.*, 2013). A DNMT1 é uma enzima de manutenção para garantir a fidelidade da cópia do padrão de metilação durante a divisão de

células somáticas. A DNMT2 atua como uma RNA metiltransferase, enquanto a DNMT3L não apresenta de atividade catalítica e é inativa, mas pode ser importante para a estabilização de DNMT3A e complexos de montagem associados durante a metilação “de novo”. A metilação de CpG é principalmente catalisada pelas enzimas DNMT3A e DNMT3B, que são responsáveis pelo estabelecimento da metilação “de novo” no DNA durante o desenvolvimento. No entanto, os conceitos “de novo” e “manutenção” das DNA metiltransferases estão sendo reavaliados uma vez que as enzimas DNMT3A / B também cooperam com o DNMT1 para manter a metilação do DNA durante a replicação (LI *et al.*, 2013).

As *DNMTs* são expressas constitutivamente na hematopoese normal e podem estar super expressas em neoplasias hematológicas mieloides como LMA e na fase aguda da leucemia mieloide crônica (LMC). Tem sido proposto que o aumento da expressão das *DNMTs de novo* ou de manutenção contribui para o desenvolvimento da leucemia por catalisar a hipermetilação aberrante de regiões importantes do genoma (MIZUNO *et al.* 2001).

A DNMT1 tem um papel essencial na sobrevivência autônoma e na diferenciação mieloide das células-tronco hematopoéticas (BENETATOS & VARTHOLOMATOS, 2016). A perda de função da DNMT1 afeta células progenitoras mieloides, causando proliferação aumentada com expressão inapropriada de genes de linhagem madura. Além disso, em indivíduos adultos com alterações em *DNMT1* nas células-tronco hematopoéticas possuem defeitos na auto renovação, retenção de nicho de medula óssea e a capacidade de gerar linhagens de sangue apropriadas (TROWBRIDGE *et al.*, 2009). Mutações em *DNMT1* são raramente observadas em contraste com o aparecimento frequente de mutações em *DNMT3A* em SMD e LMA (Cancer Genome Atlas Research Network, 2013).

Acredita-se que as mutações em *DNMT3A* sejam eventos precoces, que estejam atuando no desenvolvimento e progressão da SMD (WALTER *et al.*, 2011). Estudos conduzidos em camundongos demonstraram que deleções de *DNMT3A* em células hematopoéticas resultam na expansão de células-tronco e na redução da diferenciação celular das mesmas. Também foram identificadas alterações no padrão de metilação nas células hematopoéticas (CHALLEN *et al.*, 2011).

A perda combinada de *DNMT3A* e *DNMT3B* em camundongos levou a defeitos mais severos na proliferação e diferenciação das células-tronco hematopoéticas (CHALLEN *et*

al., 2011; CHALLEN *et al.*, 2014). No entanto, a contribuição de *DNMT3B* para a regulação gênica na hematopoese ainda não está clara (MAYLE *et al.*, 2012).

Na SMD, ainda são poucos os estudos sobre o perfil de expressão das *DNMTs* (AOKI *et al.*, 2003; LÄNGER *et al.*, 2004). Assim, ainda é necessário estabelecer o perfil de expressão da *DNMTs* e seu papel no desenvolvimento da SMD e evolução para LMA, principalmente em pacientes pediátricos, para os quais não há dados. Isso é fundamental uma vez que pequenas mudanças na expressão na maquinaria dos modificadores epigenéticos podem alterar o panorama epigenético, resultando na expressão aberrante de diversos genes (SANTINI *et al.*, 2013).

O processo reverso é catalisado pela maquinaria de desmetilação de citosinas e pode ser realizado por duas vias. Uma delas é iniciada pelas enzimas “editoras” da família TET (*Ten-eleven-translocation*) TET1, TET2 e TET3. As proteínas TET são dioxigenases, dependentes de íons de ferro [Fe(II)] e alfa-cetoglutarato, que convertem 5-metilcitosina em 5-hidroximetil citosina (5hmC), e tornam a converter para 5- formilcitosina (5fC) e 5-carboxilcitosina (5caC). No processo final de desmetilação, a 5fC e a 5caC podem ser diretamente reconhecidas e reparadas pela enzima timina DNA-glicosilase (TDG) por reparo por excisão de bases (BER), sendo colocada em seguida uma citosina não metilada na posição que antes estava metilada (MELDI & FIGUEROA, 2014, KUNIMOTO & NAKAJIMA, 2017). A segunda via de desmetilação ativa tem como primeiro passo a conversão de 5mC em timina ou de 5hmC a 5-hidroximetiluracila (5hmU), reações catalisadas pelas enzimas da família de citidina desaminases (AID/APOBECs), seguido pela excisão de base por BER para reincorporação de uma citosina não metilada (Figura 1.10) (KUNIMOTO & NAKAJIMA, 2017).

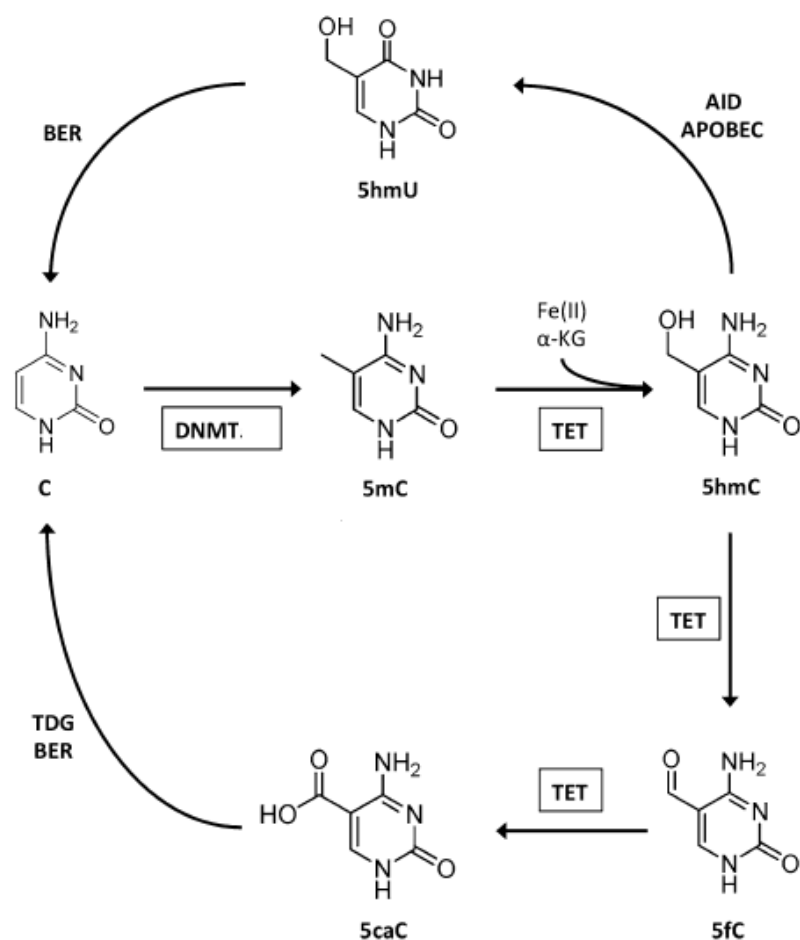


Figura 1.10: Processo de metilação e desmetilação do DNA. A metilação é catalisada pelas enzimas DNMTs e a desmetilação é catalisada principalmente pela família TET até haver a excisão de base por BER. No entanto, a desmetilação também pode seguir por uma via alternativa onde é iniciada pela família TET e finalizada por AID/APOBEC para depois haver a excisão de base por BER (Adaptado de KUNIMOTO & NAKAJIMA, 2017).

A ação das TETs é crucial no controle da manutenção da metilação normal do DNA durante o desenvolvimento e tumorigênese (BAYLIN & JONES, 2011). *TET2* é um dos genes mais comumente mutados na SMD em uma frequência de aproximadamente 20% dos pacientes adultos e essas mutações associam-se a um pior prognóstico (BEJAR & STEENSAMA, 2014). Ademais, a redução na expressão de *TET2* em precursores eritróides e granulocíticos de pacientes tem sido observada, o que sugere um mecanismo alternativo na regulação desse gene. Tem sido sugerido que a proteína *TET2* tenha um papel de supressor tumoral na fisiologia de algumas neoplasias (GANGULY *et al.*, 2016).

Foi demonstrado que *TET2* regula a diferenciação mieloide e a sua expansão clonal durante a hematopoese (KUNIMOTO & NAKAJIMA, 2017). Essas alterações em *TET2* estão associadas com a hipermetilação de citosinas localizadas dentro de potencializadores

gênicos e, subsequentemente, a repressão de vários genes importantes durante o processo de diferenciação mieloide (SPERLING *et al.*, 2016).

Além da família das TETs, tem sido proposto que a desmetilação via família das citidina desaminases APOBECs (“apolipoprotein B mRNA editing enzyme, catalytic polypeptide-like”) também teriam um papel importante na regulação epigenética (BRANCO, 2012; ITO, *et al.*, 2017). A família das APOBECs está envolvida em vários outros processos biológicos importantes como diversificação/maturação de anticorpos, restrição de infecção viral e de retrotransposons, geração de mutações somáticas e regulação epigenética (Knisbacher *et al.*, 2016; ITO, *et al.*, 2017). Sabe-se que dos 11 membros da família APOBECs, quatro membros (AID, APOBEC3A, APOBEC3B e APOBEC3H) podem atuar na desaminação de 5mC e 5hmC (ITO *et al.*, 2017).

Desses membros, a APOBEC3B possui localização unicamente nuclear e tem sido indicada como fator mutagênico impactando no desenvolvimento e na evolução de diversos tipos de câncer. Essa hipótese tem sido sustentada por diversos estudos que mostram que *APOBEC3B* está superexpressa em vários tipos de células tumorais. Além disso, esse aumento na expressão está correlacionado com o aumento da taxa de mutação de C>T (BURNS *et al.*, 2013; ZOU *et al.*, 2017). No entanto, no contexto das neoplasias hematológicas o papel das APOBECs vem sendo pouco explorado e até momento não há nenhum estudo com pacientes com SMD.

Um desequilíbrio na expressão da maquinaria de metilação e desmetilação nas células hematopoéticas pode levar a alterações no padrão da metilação no DNA desencadeando diversas alterações no genoma que podem culminar com o desenvolvimento da SMD assim como em outras neoplasias hematológicas. Desde modo, torna-se essencial estudos que demonstrem como os genes atuantes nestes processos se comportam nos pacientes quando comparados com indivíduos saudáveis.

1.5.3 Alterações no Padrão de Metilação em SMD

A metilação do DNA é considerada uma guardiã do destino das células-tronco hematopoéticas, pois atua na manutenção do equilíbrio dessas células e sua capacidade de auto renovação e diferenciação em qualquer uma das linhagens de células do sangue (BRÖSKE *et al.*, 2009).

As alterações no padrão de metilação do DNA das células tumorais em geral vêm se apresentando de duas maneiras: hipometilação global do DNA e hipermetilação em ilhas CpGs principalmente no contexto de regiões promotoras de genes supressores de tumor. A hipometilação global possui um papel crucial na instabilidade genômica/cromossômica, levando ao desenvolvimento e progressão de vários tipos de câncer (BAYLIN *et al.*, 2001). Alguns estudos têm sugerido que a hipometilação global deve possuir um papel mais importante no desenvolvimento do câncer do que a hipermetilação em promotores de genes supressores de tumor (WOLFF *et al.*, 2010; HUR *et al.*, 2014).

O perfil de metilação de elementos repetitivos vem sendo estudado neste contexto, uma vez que cerca de 56% de todos os sítios CpGs são localizados dentro dessas sequências e que em condições fisiológicas normais estariam metilados (MIOUSSE & KOTURBASH, 2015). Os elementos móveis transponíveis são semelhantes a retrovírus endógenos, quando não metilados são transcritos e assim, após a transcrição reversa, podem se inserir no genoma novamente, podendo levar a mutações e rearranjos cromossômicos (BURNS, 2017).

Os elementos intercalados nucleares longos 1 (LINE-1) são os elementos repetitivos mais abundantes no genoma, representando cerca de 20% de todo genoma. LINE-1 consiste de uma região 5' não traduzida (UTR), um quadro de leitura aberto bicistrônico que codifica duas proteínas - ORF1 e ORF2, e uma 3'-UTR com uma cauda poli (A) (Figura 1.11) (MIOUSSE & KOTURBASH, 2015).

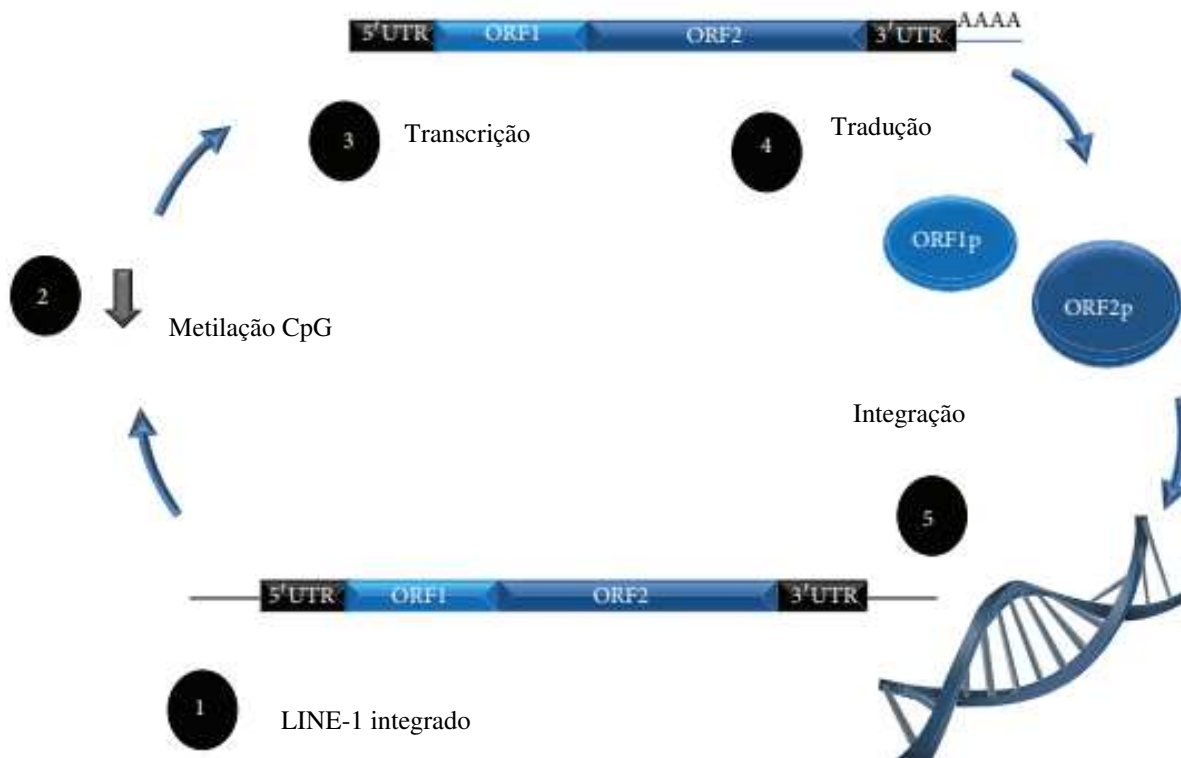


Figura 1.11: Biologia do elemento repetitivo LINE-1. O elemento LINE-1 é composto por quatro unidades: uma região 5' não traduzida (UTR), um quadro de leitura aberto bicistrônico que codifica duas proteínas - ORF1 e ORF2, e uma 3'-UTR com uma cauda poli (A). (1). Uma diminuição na metilação dos dinucleótidos CpG (2) podem induzir um aumento na transcrição de LINE-1 (3). Tradução das proteínas ORF1p e ORF2p (4) As proteínas ORF1p e ORF2p codificadas e medeiam a reinserção de LINE-1 no genoma (5) (Adaptada de (MIOUSSE & KOTURBASH, 2015).

As sequências LINE-1 encontram-se fortemente metiladas em condições fisiológicas normais e em alguns tipos de câncer apresentam-se hipometiladas. Nesse sentido, são consideradas bons indicadores do nível de metilação global do DNA, sendo já aceito em alguns tipos de câncer como biomarcador preditivo de prognóstico (SHIGAKI *et al.*, 2013; HUR *et al.*, 2014; BURNS, 2017;). A hipometilação de LINE-1 pode resultar em muitos efeitos indesejados associados à atividade aberrante de LINE-1. A retro-transposição de LINE-1, principalmente dentro de regiões promotoras e de introns de genes codificantes, podem levar à expressão aberrante desses genes (MIOUSSE & KOTURBASH, 2015).

A análise do nível de metilação global continua sendo pouco explorada em SMD. Até o presente momento, existem apenas dois estudos com pacientes adultos, além disso os resultados destes trabalhos em relação ao nível de metilação em LINE-1 são controversos (RÖMERMANN *et al.*, 2009; KIM *et al.*, 2015). No primeiro estudo, foi observado um aumento da metilação em LINE-1, mesmo nos pacientes com SMD classificados como baixo risco (RÖMERMANN *et al.*, 2009). Por outro lado, o estudo mais recente

demonstrou uma hipometilação tanto das células hematopoéticas quanto das células estromais da medula óssea de pacientes com SMD (KIM *et al.*, 2015).

Na SMD, o padrão de metilação é estudado principalmente nas regiões promotoras de genes específicos que exercem diversas funções, como: reparo do DNA, apoptose, transcrição, proliferação e regulação do ciclo celular (ISSA, 2013; SANTINI *et al.*, 2013; ZHAO X., *et al.*, 2014). Um dos genes já estudados que demonstrou estar metilado em pacientes com SMD foi o $p15^{INK4B}$ (*CDKN2B*). O gene $p15^{INK4b}$ está localizado na região 9p21. É um supressor tumoral importante da família dos inibidores de quinase dependente de ciclina, o qual, em conjunto com outros fatores, é capaz de induzir a parada do ciclo celular na fase G1 por modulação do complexo quinase dependente de ciclina 4/6 (CDK4/6) (Figura 1.12). Também desempenha um papel importante na regulação do comprometimento celular de células progenitoras hematopoéticas e diferenciação celular mieloide (DE BRAEKELEER *et al.* 2016). Assim, a perda de expressão de $p15^{INK4b}$ afeta a diferenciação celular durante a hematopoese e está associada com alta taxa de proliferação celular (COTRAN *et al.*, 2000; WOLFF & BIES, 2013).

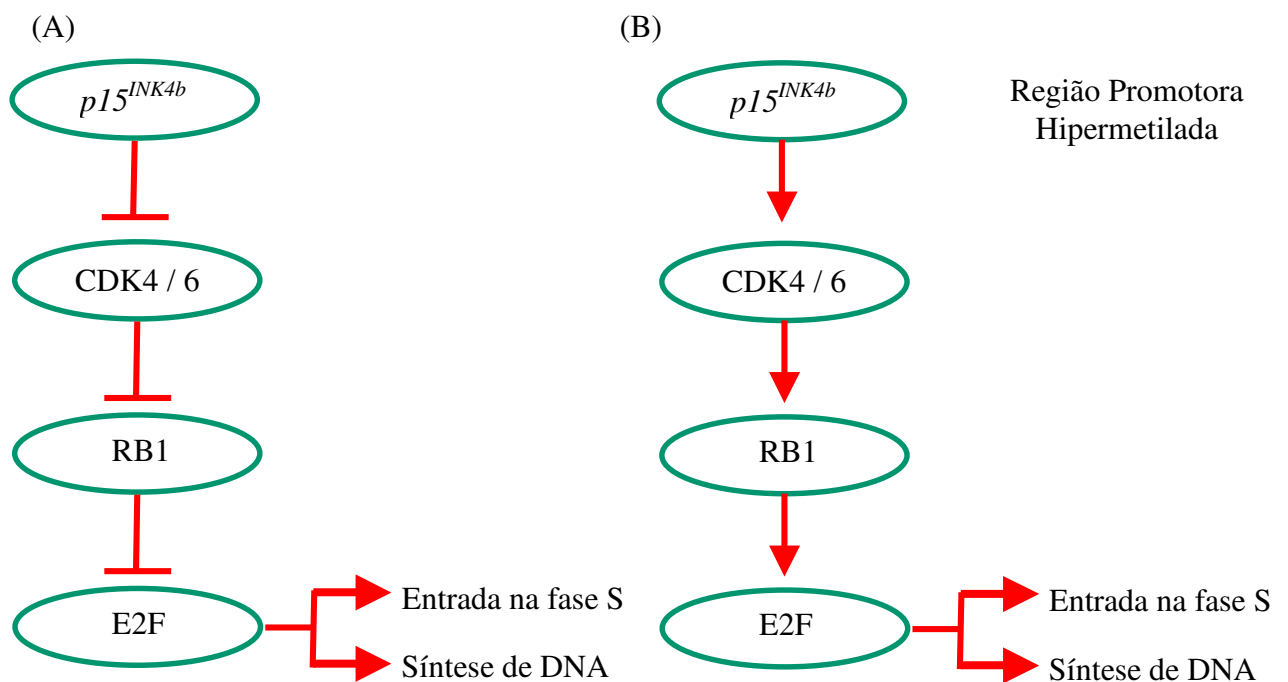


Figura 1.12: Papel de gene $p15^{INK4b}$ no ciclo celular. (A) Em condições normais, $p15^{INK4b}$ inibe CDK4 / 6, mantendo RB1 em estado hipofosforilado, o que impede a ativação de fatores de transcrição ($E2F$) e inibindo deste modo, a transcrição de genes necessários para a entrada na fase S do ciclo celular e a síntese de DNA. (B) Após a hipermetilação do promotor de $p15^{INK4b}$, a síntese da proteína p15 é reduzida; O CDK4 / 6 não é mais inibido, permitindo a fosforilação de RB1 e a ativação de fatores de transcrição ($E2F$) (Adaptada de DE BRAEKELEER *et al.* 2016)

Ainda são poucos os estudos que analisam pacientes pediátricos com SMD e, dentre aqueles realizados, podemos observar um número pequeno de pacientes investigados devido à baixa incidência de SMD na infância (UCHIDA *et al.*, 1997; CHIM *et al.*, 2001; AGGERHOLM *et al.*, 2006; VIDAL *et al.*, 2007; KIM *et al.*, 2009; RODRIGUES *et al.*, 2010, KIM *et al.*, 2013).

A maioria destes estudos utilizou a análise qualitativa através da técnica de reação em cadeia da polimerase específica para a metilação (MSP), sendo necessário o uso de uma análise quantitativa mais sensível como o pirosequenciamento para mensurar os níveis de metilação. Atualmente, sabe-se que indivíduos saudáveis podem ter metilação em certos níveis, mesmo em regiões promotoras de genes importantes para o ciclo celular, por exemplo. A hipermetilação e a hipometilação aberrantes de certas regiões genômicas vêm sendo associadas ao desenvolvimento de doenças. Portanto, se faz imprescindível uma caracterização do perfil de metilação da região promotora do gene *p15^{INK4B}* em um maior número de pacientes pediátricos com SMD, de modo a avaliar de maneira mais precisa sua associação com a evolução da doença.

Devido à raridade da SMD pediátrica primária poucos estudos sobre o seu desenvolvimento e a sua evolução para LMA vem sendo realizados. A maior parte de conhecimento da biologia da SMD vem de estudos conduzidos em pacientes adultos, embora já se saiba que a patogênese da SMD pediátrica é diferente. Além disso, os trabalhos realizados com pacientes pediátricos tendem a reunir as mielodisplasias de forma geral com a LMA na infância o que pode distorcer os dados referentes a SMD pediátrica primária. A própria heterogeneidade da SMD torna difícil o diagnóstico dos pacientes pediátricos, principalmente aqueles em fase inicial e sem alterações citogenéticas. Além disso, a baixa frequência de mutações nesses pacientes torna difícil o rastreamento dessas alterações dentro da realidade de saúde pública no Brasil. Estudos com enfoque nas alterações epigenéticas têm avançado nos pacientes adultos, mas para os pacientes pediátricos continuam escassos, mesmo sabendo que os agentes hipometilantes poderiam ser uma opção terapêutica em alguns casos.

Dentro deste contexto da SMD pediátrica primária, nosso grupo vem tentando através de estudos citogenéticos e moleculares realizar pesquisa translacional, visando aplicar os conhecimentos adquiridos na área clínica, com objetivo de melhorar a qualidade de vida dos pacientes pediátricos com SMD. Através de artigos científicos e da divulgação de nossos resultados, o grupo tornou-se um centro de referência de estudo da SMD no

Estado do Rio de Janeiro, auxiliando no diagnóstico, na escolha do tratamento e no acompanhamento dos pacientes com SMD.

2. OBJETIVO PRINCIPAL

Caracterizar as alterações citogenéticas e epigenéticas em células de medula óssea de pacientes pediátricos com SMD para verificar sua associação com o estabelecimento da doença e sua evolução para LMA.

2.1 Objetivos secundários

- Analisar o padrão citogenético de pacientes pediátricos com SMD primária;
- Verificar o padrão de expressão das *DNMTs* (*DNMT1*, *DNMT3A* e *DNMT3B*), *TET2* e *APOBEC3B* de pacientes pediátricos na tentativa de identificar as causas associadas com a hiper e/ou hipometilação do DNA nos pacientes com SMD;
- Investigar o perfil de metilação do gene *p15^{INK4B}* em pacientes pediátricos com SMD primária e sua associação com as características citogenéticas e clínicas;
- Investigar o perfil de metilação global através da análise de metilação em LINE-1 em pacientes pediátricos com SMD e sua associação com as características citogenéticas e clínicas;
- Correlacionar as principais alterações epigenéticas com o cariótipo, porcentagem de blastos na medula óssea, citopenias e a evolução de SMD para LMA visando sugerir um modelo de evolução da SMD para LMA em pacientes pediátricos.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Pacientes

Este estudo foi realizado utilizando amostras de medula óssea de pacientes pediátricos com SMD primária coletadas no período 1996-2018 (Anexo I). Esses pacientes foram provenientes das seguintes instituições: Centro de Transplante de Medula Óssea (CEMO-INCA), Serviço de Hematologia (INCA), Instituto Estadual de Hematologia Arthur de Siqueira Cavalcanti (HEMORIO), Hospital Federal da Lagoa (HFL) e Instituto de Pediatria e Puericultura Martagão Gesteira (IPPMG). Foram utilizados como critérios de inclusão: pacientes pediátricos com até 18 anos de idade, com diagnóstico de SMD primária, confirmado através das análises clínicas, morfológicas, citogenéticas e imunofenotípicas. Foram utilizados como critérios de exclusão: crianças com diagnóstico de SMD secundária, associada ao tratamento de uma neoplasia primária, crianças com leucemia mielomonocítica juvenil, síndromes de pré-diposição genética, com exceção de uma criança com Anemia de Fanconi acompanhada em nosso centro que apresentou evolução de SMD para LMA, e alteração citogenética ainda não descrita.

Os estudos hematológicos e clínicos foram realizados pelos próprios hematologistas nas instituições de origem, como parte da investigação de rotina e os diagnósticos seguiram os critérios propostos pela classificação segundo HASLE e colaboradores (2003/2016), CRI (<5% de blastos MO), AREB (5-19% de blastos MO) e AREB-t (20-29% de blastos na MO). Do total de 152 pacientes pediátricos, 44% eram do sexo feminino e 56% do sexo masculino. A idade média foi de 8,5 anos, variando de 3 meses a 18 anos. Como controles foram utilizadas 13 amostras de doadores pediátricos de medula óssea, 38,4% pertenciam ao sexo feminino e 61,5% do sexo masculino. A idade média foi de 10 anos, variando de 4 a 18 anos. Este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto Nacional do Câncer (Anexo II).

3.2 Análise Citogenética

3.2.1. Cultura de Células de Medula Óssea

Para a cultura de células de medula óssea utilizamos a técnica de Testa e colaboradores (1985), com algumas modificações. Inicialmente, as células de medula óssea dos pacientes pediátricos com SMD foram lavadas com meio RPMI 1640 (Life Technologies, USA). Em seguida, foi feita uma diluição de 1:20 da suspensão celular em líquido de Thomas (1 mL de ácido acético glacial, uma gota de violeta de genciana, 100 mL de água destilada) e as células foram contadas utilizando a câmara de Newbawer em microscópio ótico utilizando o contraste de fase (Olympus, USA). Foram incubadas de 5×10^6 a 10×10^6 células/mL em 80% de RPMI e 20% de soro fetal bovino (Life Technologies, USA) a 37°C, numa atmosfera de 5% de CO₂ por 24 horas. Duas horas antes do término da cultura foi adicionado colchicina (0,05 µg/mL) e a cultura foi incubada por mais uma hora.

Ao final da incubação, o material foi centrifugado a 1500 rpm (Sorvall T16R, Thermo Scientific) por 6 minutos. O sobrenadante foi desprezado e o precipitado ressuspenso em 5 mL de uma solução hipotônica (KCl 0,075 M). O material foi incubado a 37°C por 15 minutos, sendo em seguida centrifugado a 1500 rpm (Sorvall T 16R, Thermo Scientific) por 6 minutos. Foi feita a fixação do material com Solução Carnoy 3:1 (metanol:ácido acético), sendo na primeira fixação adicionado lentamente um volume de 5 mL. Após 20 minutos à temperatura ambiente, o material foi centrifugado a 1500 rpm (Sorvall T 16R, Thermo Scientific) durante 6 minutos e o sobrenadante desprezado. O procedimento foi repetido mais 2 vezes e o precipitado da última fixação foi ressuspenso em 8 ml de fixador e armazenado a 4°.

3.2.2 Análise Citogenética Clássica: Bandeamento GTG

Para verificar o índice mitótico e a qualidade das metáfases foi preparada inicialmente uma lâmina corada com corante Giemsa [Giemsa 2% em tampão fosfato (0,102 M NaH₂PO₄; 0,098 M Na₂HPO₄, pH 6,8)]. A lâmina foi preparada a partir do material fixado. Inicialmente, o material foi centrifugado a 1500 rpm (Sorvall T 16R, Thermo Scientific, USA) durante 5 minutos e o fixador é desprezado até 1 mL. A partir dessa suspensão celular, foi colocada uma gota em uma lâmina limpa, umedecida e o material foi fixado sobre a lâmina através da chama do bico Busem. As demais lâminas foram feitas com o mesmo procedimento e envelhecidas de 1 dia a 1 semana à temperatura

ambiente para o bandeamento GTG, método utilizado para a análise dos cromossomos segundo a técnica de Seabright (1971). As lâminas foram incubadas em uma solução de tripsina 0,1% em solução Dulbecco (0,137 M NaCl; 0,0027 M KCl; 0,0015 M KH₂PO₄; 0,011 M NaH₂PO₄; pH 7.8), em tempos que variaram de 1 segundo a 1 minuto. Em seguida, as lâminas foram lavadas com solução de soro fisiológico (NaCl 9%) e coradas em uma solução de Giemsa a 2% em tampão fosfato durante 15 minutos. Os cromossomos foram identificados e classificados de acordo com o Sistema Internacional de Nomenclatura de Citogenética Humana de 2016 (ISCN, 2016) (JORDAN *et al.*, 2016). A análise cromossômica foi realizada em microscopia ótica utilizando no mínimo 20 metáfases por paciente, sendo considerado anormal quando a mesma alteração citogenética numérica ou estrutural esteve presente em pelo menos três metáfases. As imagens dos cariótipos anormais dos pacientes analisados foram adquiridas pelo sistema de Cariotipagem Ikaros -MetaSystems, Zeiss, Alemanha.

3.2.3 Análise através da Citogenética Molecular: Hibridização “in situ” por Fluorescência (FISH)

Para análise através do FISH foi utilizado o material da preparação citogenética (metáfases e núcleos interfásicos em fixador) nos casos onde a morfologia do cromossomo foi duvidosa, para confirmar uma alteração citogenética previamente observada no bandeamento GTG e nos casos com índice mitótico baixo para confirmar a alteração em um maior número de células. As sondas usadas foram para -7/del(7q) (D7S486 *spectrum orange*/CEP7 *spectrum Green*), del(11q22) (LSI ATM, *spectrum orange*), del(11)(q23) (LSI MLL *dual color break apart rearrangement probe*) e del(17)(p13.1) (LSI p53, *spectrum orange*), +8 (LSI cMYC, *spectrum orange*), del(5)(q31) (LSI CSF1R “*spectrum orange*”/LSID5S23:D5S721 “*spectrum green*”). Todas as sondas utilizadas foram da Vysis, Abbott Laboratories, USA.

As lâminas foram preparadas em lençol d’água e envelhecidas durante 24 horas. Após este período, as lâminas foram colocadas em uma solução 2x SSC (a partir de diluição de uma solução 20x SSC: 3,0 M de NaCl e 0,3 M de citrato de sódio, pH 7,0) a 37°C por 30 minutos. Posteriormente, o material passou pela desidratação em uma série de etanol 70%, 90% e 100% à temperatura ambiente por 2 minutos. Em seguida, o material foi desnaturado em uma solução de 70% formamida (Life Technologies, USA)/ 2x SSC, a 73°C por 5 minutos. Foi dimensionado um volume de 10 µl da diluição da sonda (1 µl da sonda, 2 µl de água e 7 µl de tampão), previamente desnaturada a uma temperatura de

73°C por 5 minutos, em uma área de 20 mm x 20 mm da lâmina e aplicada lamínula de vidro. As lâminas foram seladas com cola de isopor e incubadas por 16 horas em câmara úmida a 37°C. Após o período de hibridização, as lâminas foram transferidas para solução de 0,4x SSC e 0,3% TWEEN (SIGMA, USA) a 73°C durante 2 minutos. Os cromossomos e os núcleos interfásicos foram corados em uma solução de DAPI/Antiphade (125 ng/mL) e a área foi coberta com uma lamínula de vidro e selada com esmalte incolor. A análise foi realizada em microscópio de fluorescência (OLYMPUS BX51, USA) com filtros apropriados e o resultado obtido foi adquirido pelo Sistema de captura Isis (MetaSystem, Zeiss, Alemanha).

3.3 Análise Molecular

3.3.1 Extração de DNA

O DNA das células de medula óssea de pacientes pediátricos com SMD primária e de doadores pediátricos foi extraído pelo método de Dnazol (Life Technologies, USA), segundo o protocolo do fabricante. Inicialmente, foi adicionada na amostra de medula óssea uma solução de lise de hemácias RCBL (Sacarose 1,6 M, Triton X-100 5%, MgCl₂ 25 mM e Tris-HCL 60 mM pH 7.5). Após a lise, o material foi centrifugado a 1500 rpm por 5 minutos (Sorvall ST 16R, Thermo Scientific, USA). Em seguida, foi adicionada uma solução de soro fisiológico (9% NaCl) e centrifugado a 1500 rpm por 5 minutos (Sorvall ST 16R, Thermo Scientific, USA). Posteriormente, foi adicionado 1 mL do reagente Dnazol (Life Technologies, USA) e o material foi homogeneizado lentamente. Para a precipitação do DNA foram adicionados 2 mL de etanol 100%. Ao DNA precipitado, foi adicionado 1 mL de etanol 75%. A amostra de DNA foi centrifugada (Sorvall ST 16R, Thermo Scientific, USA), retirado o etanol, acrescentando a solução de TE (10 mM Tris e 1 mM EDTA; pH 7.4). As amostras de DNA foram armazenadas a uma temperatura de aproximadamente 15°C.

A concentração das amostras de DNA foi avaliada através de espectrometria em um espectrofotômetro (Nanodrop- ND1000). A estimativa da concentração da amostra de DNA, assim como o seu grau de pureza, foi calculada pelo equipamento.

3.3.2 Extração de RNA e Obtenção de cDNA

O RNA total de células mononucleadas da medula óssea de 39 pacientes pediátricos e 13 doadores pediátricos foi extraído pelo método do TRIzol (LIFE TECHNOLOGIES, USA), de acordo com o protocolo do fabricante. Primeiramente, foi adicionada nas

amostras de medula óssea uma solução de lise de hemácias RCBL (Sacarose 1,6 M, Triton X-100 5%, MgCl₂ 25 mM e Tris-HCl 60 mM pH 7.5). Em seguida, o material foi centrifugado a 1500 rpm por 6 minutos (SORVALL ST16R, THERMO SCIENTIFIC, USA). Após a centrifugação, o sobrenadante foi retirado, o “pellet” contendo as células mononucleadas foram lavadas com solução de soro fisiológico (9% NaCl). Ao final da lavagem, foi adicionado 1 mL de TRIzol (para cada 5-10 x 10⁶ células). Em seguida, foram acrescentados 0,2 mL de clorofórmio, homogeneizado e incubado à temperatura ambiente por 3 minutos seguido por centrifugação do material a 7000 rpm por 10 minutos em centrífuga refrigerada a 4°C (SORVALL ST16R, THERMO SCIENTIFIC, USA). Após centrifugação, foi retirada a fase correspondente ao RNA (fase aquosa) e o material foi precipitado com 100% de álcool isopropílico (Merk, Alemanha). Esse material foi ressuspendido em 10 µL de água tratada com DEPC e armazenado a temperatura de -70°C. A concentração de RNA foi realizada através de espectometria em um biofotômetro (Nanodrop, ND-1000).

Para a obtenção de cDNA, inicialmente foi adicionada nas amostras de RNA (2 µg) 1U de “DNase I amplification grade” (INVITROGEN, USA), 1µL de tampão 10X e água com DEPC para um volume final de reação de 10 µL. Este material foi incubado durante 15 minutos a temperatura 37°C. Após este período, foi adicionado 1 µL de EDTA (25 mM) para inativação da enzima e incubado a 65°C por 10 minutos. Em seguida, foi realizada a reação de transcrição reversa (RT) usando o kit High-Capacity Reverse Transcription (APPLIED BIOSYSTEMS, USA), segundo especificações do fabricante, e o cDNA foi armazenado a uma temperatura de -70°C.

3.3.3 Análise do Padrão de Expressão dos Genes *DNMTs*, *TET2* e *APOBEC3B*

Análise de expressão relativa dos genes *DNMT1*, *DNMT3A*, *DNMT3B*, *TET2* e *APOBEC3B* em pacientes pediátricos com SMD primária foi realizada pela metodologia de PCR em tempo real (termociclador Corbett Research, Rotor-Gene 6000 software 1.7, Qiagen). Amostras de medula óssea de doadores pediátricos para o TCTH foram utilizadas como controle e para o controle interno da reação foi utilizado o gene *β-actina*. Para cada reação foram utilizados 25 ng de cDNA, 1,875 µM de cada oligonucleotídeo para amplificação dos genes de interesse e 5 µl de SsoFast EvaGreen Supermix (BIO-RAD, USA).

As sequências dos oligonucleotídeos de cada gene e as condições de ciclagem estão descritas na tabela 3.1. Para cada reação foram realizados 50 ciclos e todas as reações foram feitas em triplicata. Para avaliar a expressão de cada gene nos pacientes e nos doadores foi utilizado o método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (LIVAK, 2001).

Tabela 3.1: Oligonucleotídeos utilizados para a análise de expressão

Genes	Oligonucleotídeos (senso/ anti-senso)	Desnaturação	Anelamento e extensão
<i>β-actina</i>	5'-TGGAACGGTGAAGGTGACA-3'/ 5'-ATGTGCAATCAAAGTCCTCGGC-3'	95°C/20 segundos	60°C/45 segundos
<i>DNMT1</i>	5'-AACTCCAAGACCCACCTCC-3 ' 5'-CAGACTCGTTGGCATCAAAGAT- 3'	95°C/20 segundos	60°C/45 segundos
<i>DNMT3A</i>	5-'GGCTCTTCTTTGAGTTCTACC-3' 5-'GATGTCCCTCTTGTCACCTAAC-3'	95°C/20 segundos	60°C/45 segundos
<i>DNMT3B</i>	5'-ATCAGGATGGGAAGGAGTTT-3' 5'-TCGGAGAACTTGCCATCGCC-3'	95°C/20 segundos	60°C/45 segundos
<i>TET2</i>	5'-GCTGGGACTGCTGCATGACT-3' 5'-ACGCAAGCCAGGCTAAACA-3'	95°C/20 segundos	60°C/45 segundos
<i>APOBEC3B</i>	5'-ACCCATCCTCTATGGTCCGA-3' 5'-GCTTGAAATACACCTGGCCTC-3'	95°C/20 segundos	60°C/45 segundos

3.3.4 Análise Quantitativa de Metilação de LINE-1 e da Região Promotora do Gene *p15^{INK4B}* em Pacientes Pediátricos com SMD

A quantificação dos níveis de metilação de LINE-1 e do gene *p15^{INK4B}* em amostras de DNA dos pacientes pediátricos com SMD e de doadores foi analisada pela técnica de pirosequenciamento (Sistema PyroMark Q96, Qiagen). Inicialmente, 500 ng de DNA genômico foram submetidos ao tratamento com bissulfito de sódio, utilizando o kit EpiTect Bisulfite (QIAGEN), segundo as especificações do fabricante. Neste processo, as citosinas não metiladas são transformadas em uracilas e, após a PCR, em timina, enquanto citosinas metiladas não podem ser transformadas devido ao grupamento metil presente no carbono 5. Em seguida, um total de 100 ng de DNA genômico tratado com bissulfito de sódio foi amplificado por uma reação em cadeia da polimerase (PCR) com os oligonucleotídeos segundo Kim e colaboradores para a região promotora do gene *p15^{INK4B}* (KIM *et al.*, 2010) e para LINE-1 (LIMA *et al.*, 2001)(Tabela 3.2).

As reações de PCR foram realizadas em um volume final de 50 µL contendo Tampão 10X, 10 mM dNTP Mix, 50 mM de MgCl₂, 10 mM de cada primer e 1,25 unidades de DNA polimerase (INVITROGEN). As condições de ciclagem para a região promotora do gene *p15^{INK4B}* foram: desnaturação inicial a 95°C por 10 minutos, “hot-start” a 72°C por 5 minutos, 35 ciclos de desnaturação a 95°C por 20 segundos, pareamento a 57°C por 20 segundos, extensão a 72°C por 20 segundos; e extensão final a 72°C por 7 minutos. As condições de ciclagem para LINE-1 foram: desnaturação inicial a 95 ° C durante 15 minutos, seguido por 50 ciclos consistindo em desnaturação a 95°C, por 40 segundos, anelamento a 56°C por 40 segundos, e extensão em 72 durante 40 segundos. Uma etapa final de extensão a 72°C por 10 minutos foi realizado. Após, a amplificação, as amostras foram verificadas em gel de agarose 2% e aquelas positivas para amplificação foram preparadas para o pirosequenciamento.

Tabela 3.2: Oligonucleotídeos referentes a Line-1 e a região gene *p15^{INK4B}* utilizados para análise da PCR

Gene	Oligonucleotídeos (senso/ anti-senso)
<i>p15^{INK4B}</i>	5'GGTTGGTTTTTTATTTTGTAG3'
	5'-biotina-CCTAAATTACTTCTAAAAAAAAC3'
sequenciamento	5'GGGGTAGTGAGGATTT 3 '
Line- 1	5'- AACTCCCTAACCCCTTAC3'
	5'-biotina-TAGGGAGTGTTAGATAGTGG 3'
sequenciamento	5'-AACTCCCTAACCCCTTAC 3'

Foi incluído no programa para análise, além da sequência a ser analisada, ao menos uma citosina que não seja parte de um sítio CpG como controle interno da conversão com bissulfito de sódio. Em seguida, os produtos de PCR foram coletados utilizando “beads” revestidas com estreptavidina diluídas em tampão de ligação (10 mM Tris-HCl; 2 mM NaCl; 1 mM EDTA; 0,1% Tween 20 pH 7,6) com o objetivo de ligar apenas as fitas biotiniladas. Após 10 minutos de agitação, as “beads” foram aspiradas utilizando “Vacuum Prep Workstation” e lavadas com etanol 70%. Em seguida, foi feita a desnaturação com NaOH e lavagem usando uma solução de 10 mM Tris-Acetato, pH 7,6. Após a adição de 40 µL da solução de oligonucleotídeo de sequenciamento 0,4 mM diluído em tampão de pareamento (20 mM Tris-Acetato; 2 mM MgAc₂ – pH 7,6), o MIX (“beads” e oligonucleotídeos) foi desnaturado por 2 minutos a 80°C e, então, resfriado por 20 minutos para alcançar a temperatura de pareamento dos oligonucleotídeos. Os volumes de dNTPs,

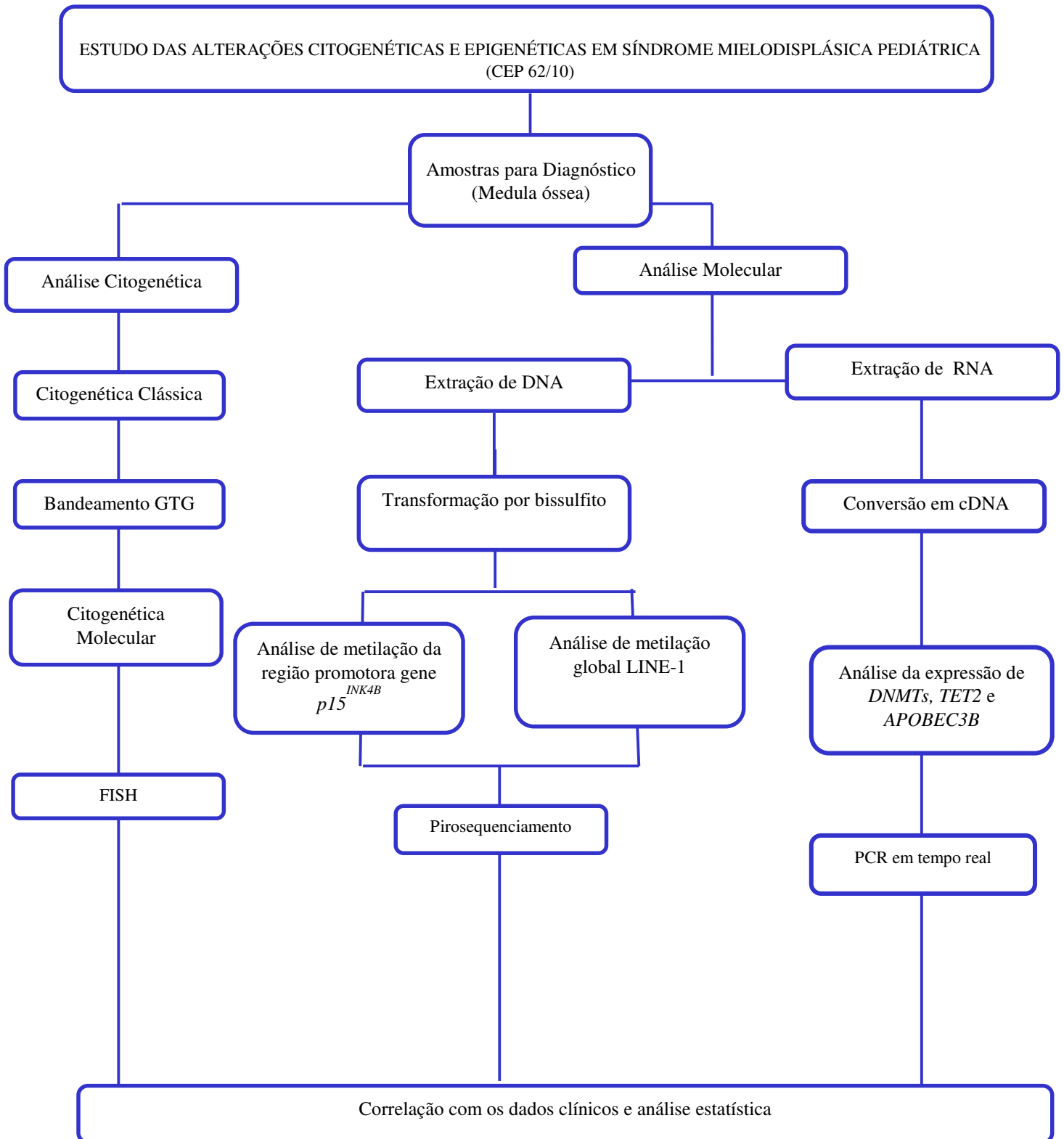
enzimas e substrato foram definidos de acordo com a sequência a ser analisada. A fita biotinizada foi sequenciada utilizando o sistema PyroMark Q96 (QIAGEN). Durante o pirosequenciamento foram gerados eletropirogramas da sequência com quantificação de células que estavam metiladas para os sítios CpG analisados.

3.3.5 Análise Estatística

Para a análise estatística, foi utilizado o programa GraphPad Prism versão 5.0. (Graphpad Software, Inc., São Diego, CA, EUA). O teste de Mann-Whitney foi utilizado para as comparações não paramétricas realizadas para análise do perfil de metilação da região promotora do gene *p15^{INK4B}* e de LINE-1 e para a análise de expressão dos genes das *DNMTs*, *TET2* e *APOBEC3B*. O teste T foi utilizado para a análise paramétrica realizada para comparação da média dos sítios CpG nos estudos para região promotora do gene *p15^{INK4B}* e LINE-1 entre os controles e os pacientes. A força da associação entre os níveis de expressão de cada gene em diferentes categorias de amostra foi calculada pelo coeficiente de correlação de pontos de Spearman. Em nossa amostra foi considerado estatisticamente significativo valor $p < 0,05$.

Para determinar os pacientes que apresentam no DNA regiões hipermetilados ou hipometilados foi utilizado o cálculo de “cut off ” baseado na média e no desvio padrão dos controles [média +2*(desvio padrão)] descrito por Kim e colaboradores em 2010 (KIM *et al.*, 2010).

3.4 Desenho de Estudo



4. RESULTADOS

4.1 Análise Citogenética

A análise citogenética foi realizada em 152 pacientes pediátricos com SMD. A distribuição entre os sexos foi de 56% (85/152) de pacientes do sexo masculino e 44% (67/152) do sexo feminino. Cariótipos anormais foram observados em 83 pacientes (55%) (Figura 4.1). Cariótipos anormais foram observados em maior frequência no sexo masculino (59% - 49/85) quando comparado com o feminino (51% - 34/67).

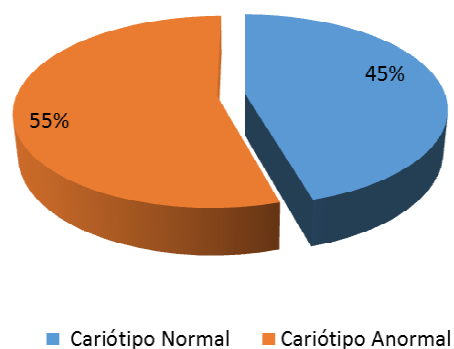


Figura 4.1: Distribuição da frequência de cariótipos normais e anormais em pacientes pediátricos com SMD

Em relação à idade, os pacientes foram divididos em dois grupos: aqueles com menos 12 anos e aqueles com mais de 12 anos formando, assim, o grupo da SMD na infância e o grupo da SMD em adolescentes. Dessa maneira, foram classificados 100 pacientes (66%) no grupo da SMD da infância e 52 (34%), no grupo da SMD na adolescência. No grupo dos pacientes com SMD da infância foram observados 64% (64/100) de cariótipos anormais, enquanto no grupo com adolescentes com SMD foram observados 36,5% (19/52) de cariótipos anormais (Figura 4.2).

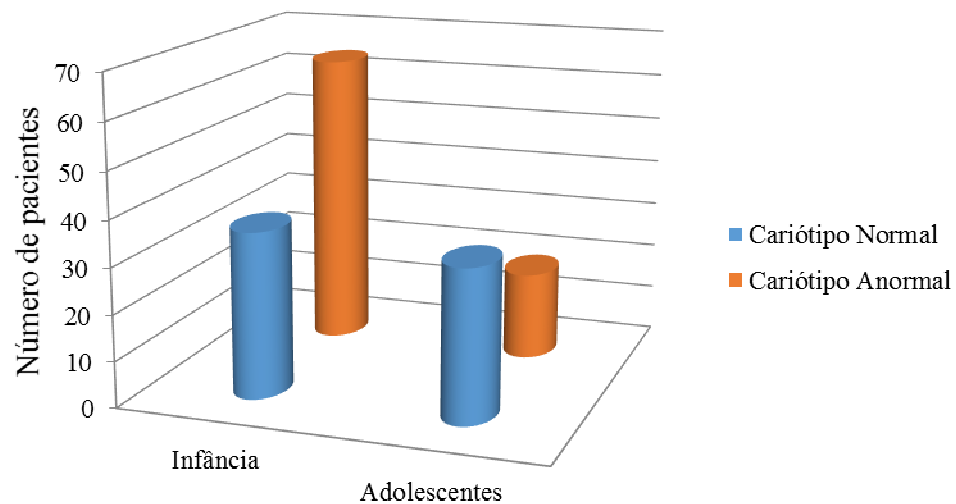


Figura 4.2: Distribuição do padrão cariотípico entre os pacientes da infância e os adolescentes

Em nosso estudo, os cariотipos anormais envolveram, sobretudo, deleções e monossomias, como pode ser observado na figura 4.3.

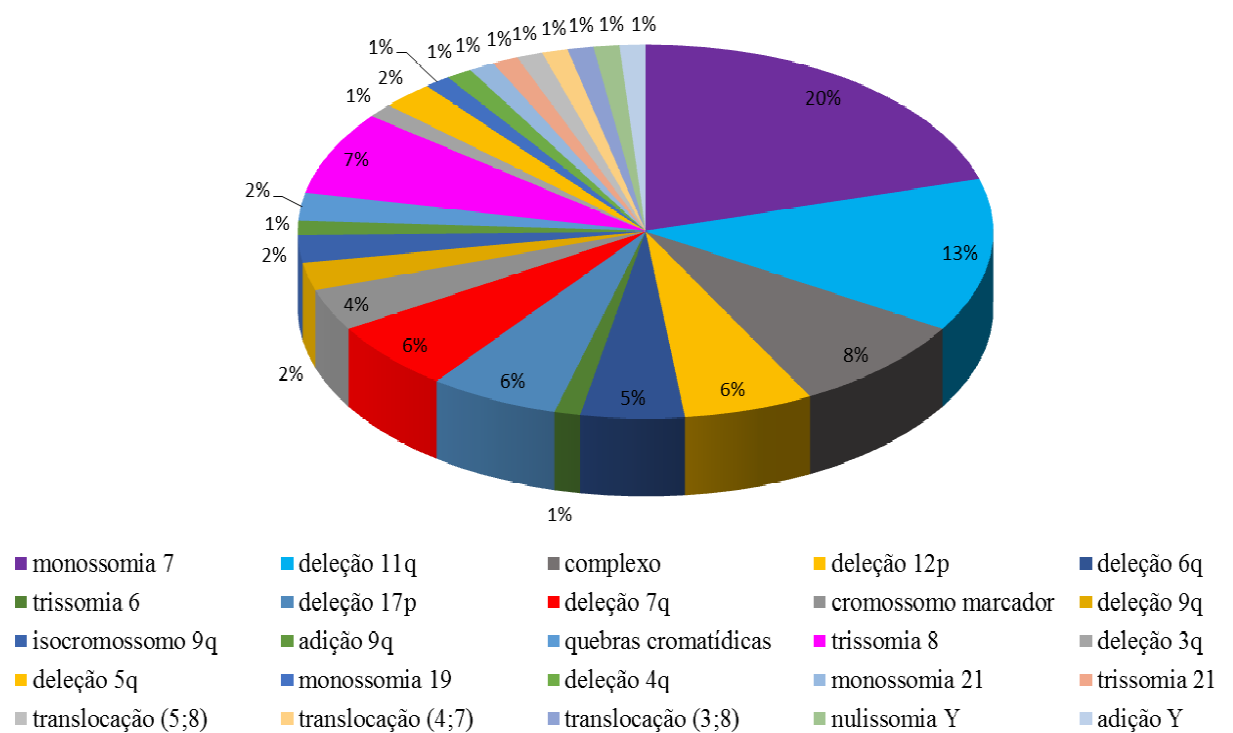


Figura 4.3: Frequência das alterações cromossômicas em SMD pediátrica

Alterações envolvendo o cromossomo 7 [monossomia (-7) e deleção no braço longo [del(7q)] foram as alterações cromossômicas mais frequentes, representando 26,5% (22/83) do total de casos com cariótipos anormais. Desses, 17 pacientes apresentaram a monossomia do 7 (20%) sendo a alteração numérica mais frequente (Figura 4.4 A) e 5 (6%) a deleção 7q (Figura 4.4 B). A segunda alteração cromossômica mais observada foi uma deleção do braço longo do cromossomo 11 [del(11q23)] presente em 11 pacientes (13%) (Figura 4.5), seguida dos cariótipos complexos, ou seja, aqueles cariótipos com 3 ou mais alterações citogenéticas, presente em 7 (8,4%) pacientes (Figura 4.6).

A trissomia do cromossomo 8 (+8) foi observada em 6 (7,2%), sendo o ganho cromossômico mais frequente. Deleções no braço curto dos cromossomos 12 [del(12p)] e 17 [del(17p)] foram observadas em 6% dos casos com cariótipos anormais, enquanto a deleção no braço longo do cromossomo 6 [del(6q)] esteve presente em 4 (4,8%) . Em nosso estudo, as translocações cromossômicas foram observadas em 3 pacientes, representando 4% dos casos com cariótipos anormais. As translocações foram as seguintes: t(3;8)(q29;q11), t(5;8)(q32;q22) e t(4;7)(p16;p15).

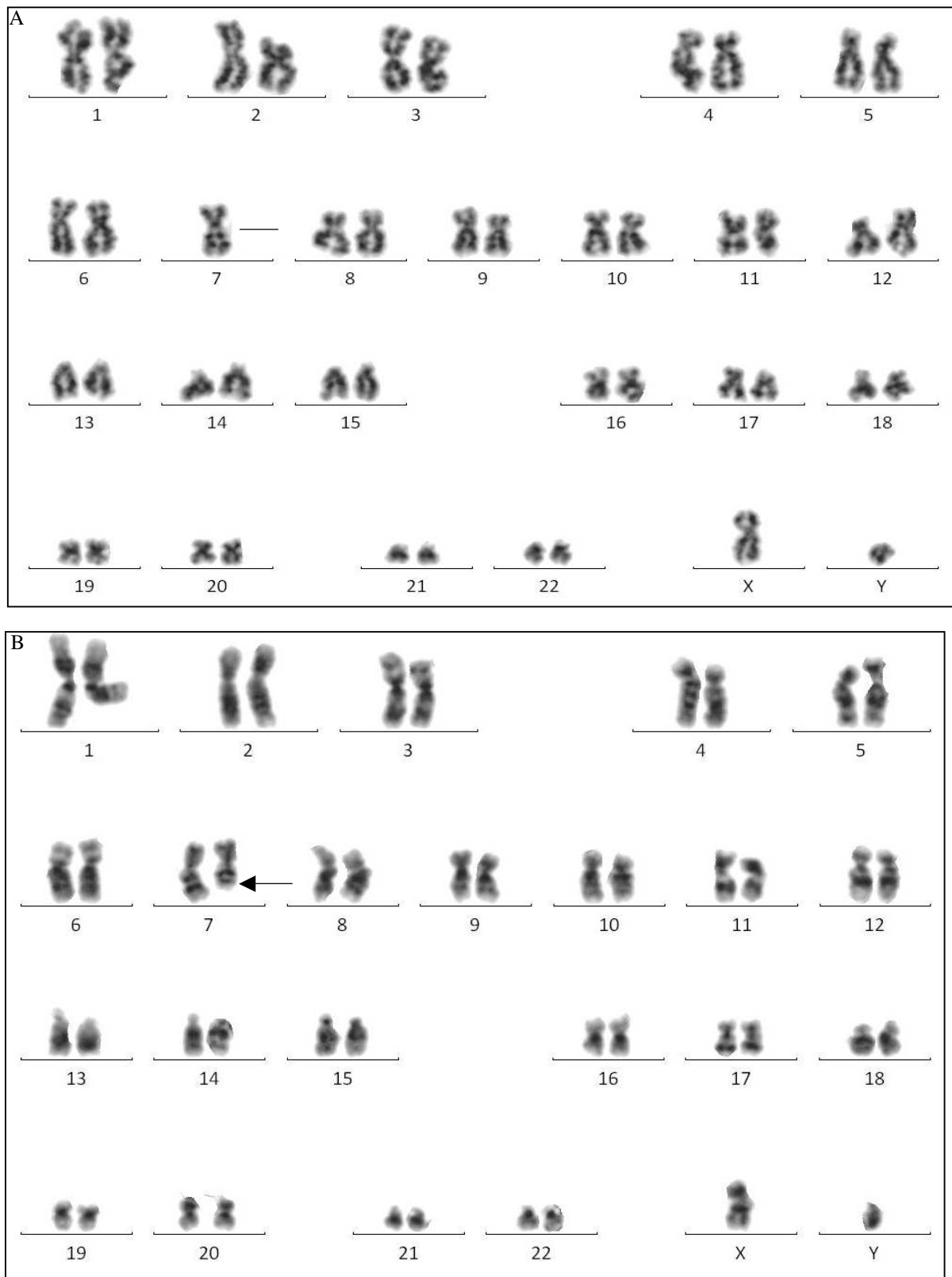


Figura 4.4: Análise citogenética em células de medula óssea de um paciente pediátrico com SMD mostrando a alteração envolvendo o cromossomo 7 em dois subclones (Bandeamento GTG). (A) Cariótipo 45,XY,-7. (B) Cariótipo 46,XY,del(7)(q22).

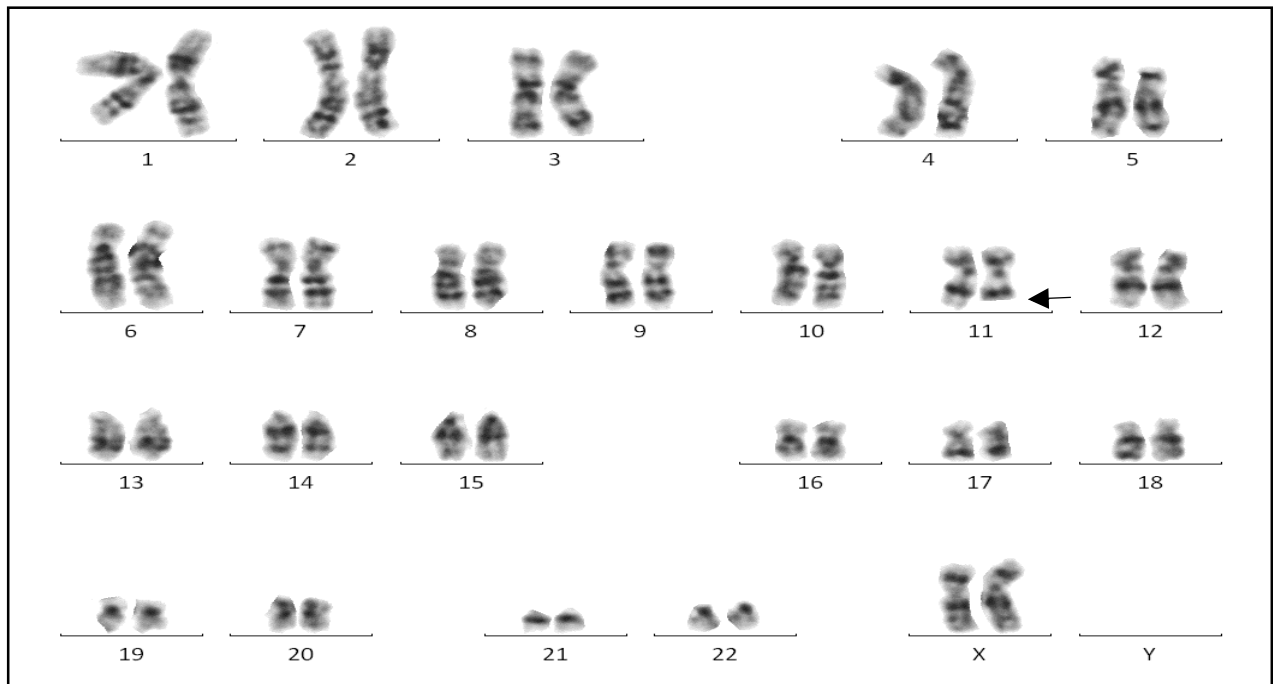


Figura 4.5: Análise citogenética em células de medula óssea de um paciente pediátrico com SMD apresentando deleção do braço longo do cromossomo 11 (Bandeamento GTG). Cariótipo 46,XX,del(11)(q23).

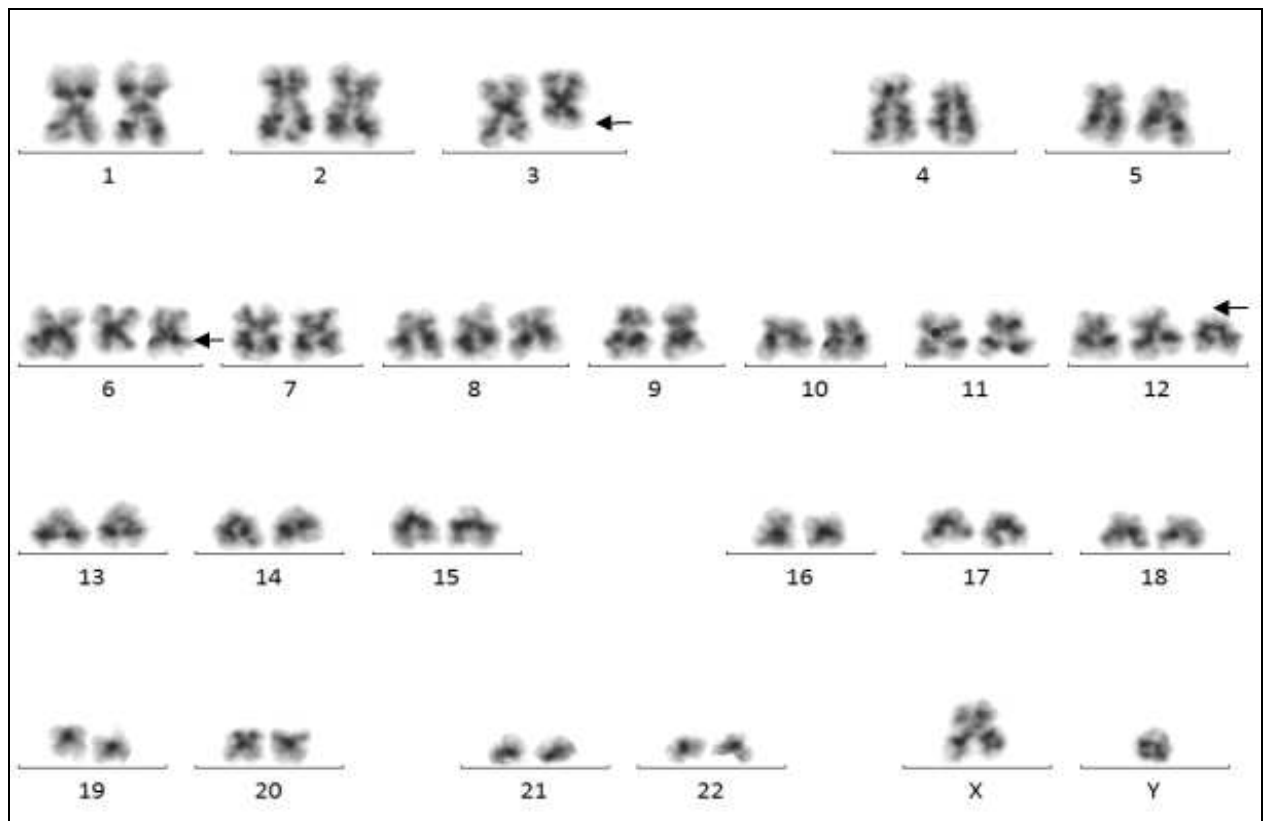


Figura 4.6: Análise citogenética em células de medula óssea de um paciente pediátrico com SMD apresentando cariótipo complexo (Bandeamento GTG). Cariótipo 49,XY,del(3)(q21), del(6)(q21), +der(6)del(6)(q21),+8, +der(12) del(12)(p11).

Dos pacientes que possuíam cariótipo anormal, três apresentaram alteração cromossômica biclonal, isto é, dois clones com alterações distintas, representando 3,6% do total de casos com cariótipo anormal. O primeiro caso foi um paciente do sexo masculino diagnosticado aos 13 anos de idade com SMD primária hipocelular e classificado com CRI. Ele apresentou o seguinte cariótipo ao diagnóstico: 46,XY,del(17)(p12)[9]/46,XY,del(17)(p12), del(12)(p13)[5]/46,XY,del(11)(q23)[3]/46,XY[34]. O primeiro clone possuía a del(17)(p12); o segundo clone a del(11)(q23), sendo que o primeiro clone apresentou uma evolução clonal com a aquisição da del(12)(p13). Esse paciente recebeu transplante de células de cordão umbilical e entrou em remissão completa.

O segundo caso de alteração cromossômica biclonal foi de um paciente do sexo masculino com 1 ano de idade diagnosticado com CRI hipocelular e apresentando displasia de múltiplas linhagens. O cariótipo ao diagnóstico foi: 46,XY,del(7)(q22q32)[5]/45,XY,-7[15] o primeiro clone possuía -7 e o segundo, del(7)(q22q32). Esse paciente recebeu transplante de células-tronco hematopoéticas alogênico, porém, faleceu.

O terceiro caso com alteração biclonal foi detectado em um paciente do sexo masculino com 5 anos de idade com suspeita de SMD hiperclular. Apresentou na primeira citogenética um clone majoritário que apresentava +22 e o segundo +8 com o seguinte cariótipo: 47,XY,+8[3]/47,XY,+22[6]/46,XY[34]. Após 1 ano e 3 meses de acompanhamento, apresentou 25% de blastos e foi classificado como AREB-t. Citogeneticamente foi observada evolução cariotípica clonal. O clone inicial apresentava +8 e, após o transplante, adquiriu +X. Além disso, houve o desaparecimento do clone majoritário com +22 e aparecimento de um novo clone com um segmento cromossômico adicional no braço curto do cromossomo 7 [add(7p)], constituindo o seguinte cariótipo 48,XY,+X,+8[6]/46,XY,add(7p)[9]/46,XY[9]. Esse paciente recebeu transplante de células de cordão umbilical, no entanto, após um mês, apresentou rejeição primária do enxerto e crise blástica com o mesmo cariótipo pré-transplante (48,XY,+X,+8[5]/46,XY, add(7p)[8]/46,XY[10]).

Cariótipos hiperdiplóides foram observados em dois pacientes, representando 2,4% do total de cariótipos anormais. O primeiro caso foi de uma paciente de 6 anos de idade diagnosticada com AREB, e o cariótipo [58,XX,+X,+3,+5,+6,+8,+10,+11,+12,+13,+18,+20,+21/58,XX,idem,dup(1)(q21q31)]. Essa paciente evoluiu para LMA e foi tratada com quimioterapia.

O segundo caso foi de um cariótipo hiperdiplóide em uma paciente com 16 anos, classificada com CRI e com o cariótipo [51,XX,+4,+6,+8,+14,+20]. Essa adolescente foi

tratada com transplante de células-tronco hematopoéticas alogênico e, até sua última consulta 12 anos após TCTH, apresentava-se em remissão completa.

4.2 Citogenética Molecular: Análise através da Hidridização *in situ* por Fluorescência (FISH)

A técnica de FISH foi utilizada como uma metodologia complementar à citogenética clássica (bandeamento GTG), nos casos onde o clone anormal citogeneticamente foi muito pequeno (3/20) e nos casos onde a morfologia do cromossomo era de difícil interpretação. Isso ocorreu para as alterações cromossômicas del(17p) e del(11q). A confirmação del(17p) foi realizada em cinco pacientes, sendo quatro do sexo masculino e um do sexo feminino, onde foi observada a perda do gene supressor de tumor *TP53* (sonda LSI *p53*, *spectrum orange Vyses*) (FIGURA 4.7 A). A técnica de FISH utilizando a sonda do gene *MLL/KMT2A* (LSI *MLL dual color break apart rearrangement probe Vyses*), região q23 do cromossomo 11, foi aplicada em 11 pacientes para a confirmação da del(11)(q23), sendo sete pacientes do sexo masculino e quatro do sexo feminino. Em todos os casos analisados observamos a deleção do gene *MLL/KMT2A* localizado nesta região cromossômica (FIGURA 4.7 B).

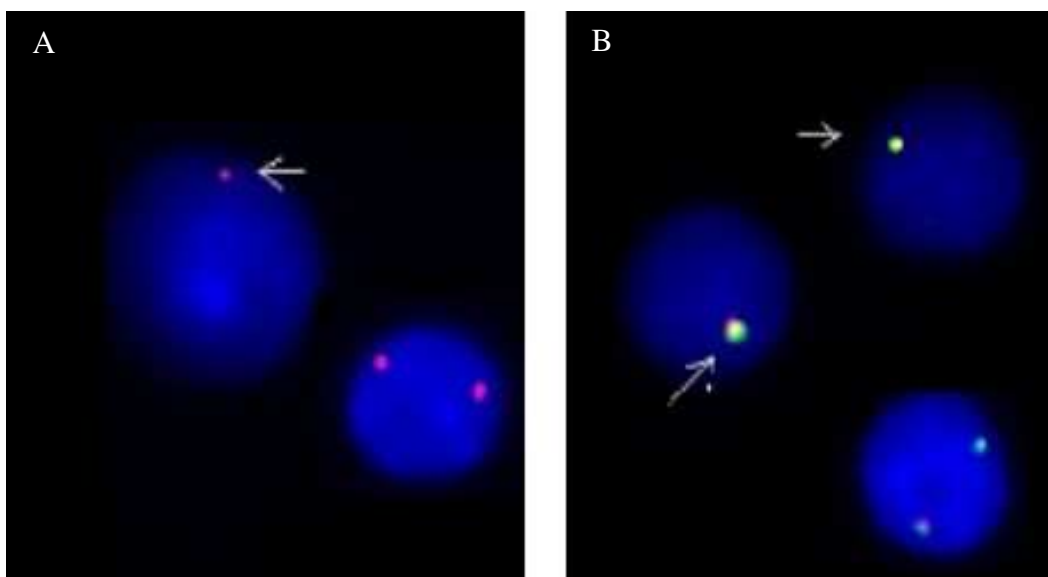


Figura 4.7: Análise de hibridização *in situ* por fluorescência (FISH). (A) Na figura, observa-se um único sinal da hibridização da sonda marcada em vermelho para o gene *TP53* (seta), confirmando a deleção do gene *TP53*; (B) Na figura, observa-se apenas um sinal (seta), confirmando a deleção do gene *MLL/KMT2A*. A sonda do gene *MLL* é marcada com dois fluoróforos, sendo um da cor vermelha e o outro verde. A justaposição dos dois seguimentos da sonda resulta no sinal amarelado, mostrando a ausência de rearranjo.

O FISH foi utilizado no acompanhamento de um paciente do sexo masculino de três anos de idade após o transplante de células-tronco hematopoéticas alogênicas. Ao diagnóstico, essa criança apresentou o cariótipo complexo: 49,XY,del(3)(q21),del(6)(q21),+der(6)(del(6)(q21),+8,+der(12)del(12)(p11)[21], sendo diagnosticada com AREB, possuindo 14% de blastos na medula óssea. Esse paciente, em um mês, evoluiu para AREB-t e foi tratado com o transplante de células-tronco hematopoéticas alogênicas. Durante o acompanhamento pós-transplante, foi observada recidiva em D+75. Pela análise citogenética, o paciente apresentou somente uma célula com cariótipo anormal, sendo as mesmas alterações cromossômicas presentes ao diagnóstico e mais o ganho de uma nova alteração [+der(3)del(3)(q21)]. O cariótipo da célula anormal foi: 50,XY,del(3)(q21),+der(3)del(3)(q21),del(6)(q21),+der(6)del(6)(q21),+8,+der(12) del(12)(p11) [1]. Nas demais células analisadas, observou-se o padrão cariotípico da doadora [46,XX]. Para confirmar a recaída citogenética do paciente, foi realizado o FISH para a trissomia do cromossomo 8, com o uso da sonda cMYC (LSI cMYC, spectrum orange, Vyses). Verificou-se que 14,2% das 204 células analisadas apresentavam a +8 (Figura 4.8).

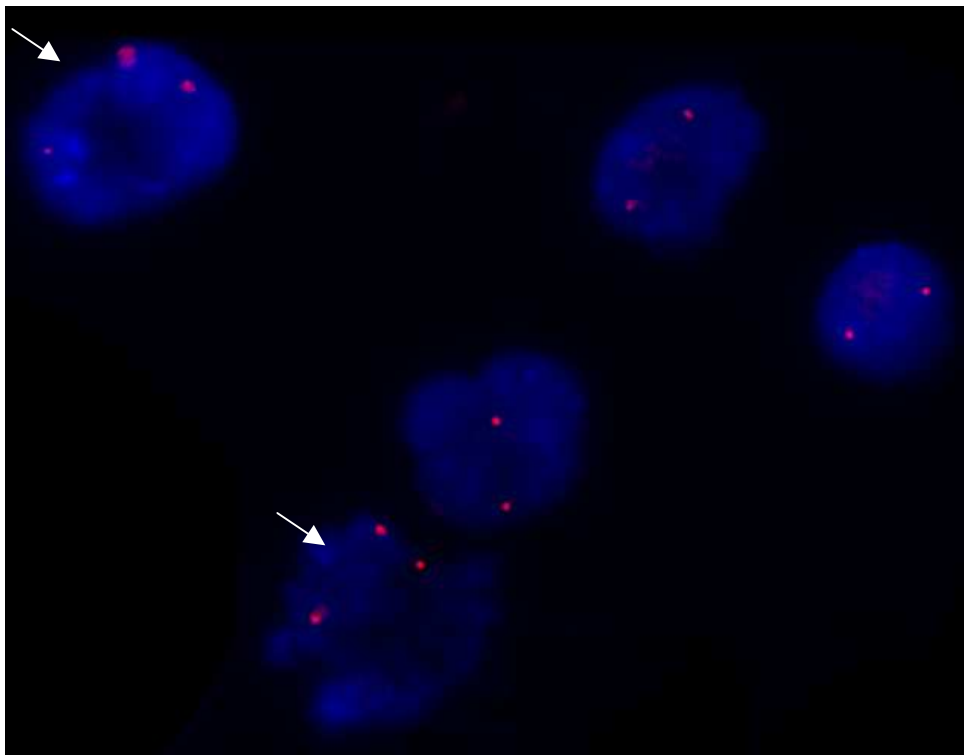


Figura 4.8: Análise através da hibridização *in situ* por fluorescência da trissomia do cromossomo 8. Presença de duas células anormais (seta) apresentando uma cópia extra para o cromossomo 8 (+8) visualizado através da hibridização da sonda para o gene *c-Myc* com fluorescência vermelha, e células normais com dois sinais para o gene *c-Myc*.

O FISH também foi realizado para o paciente de um ano de idade, já mencionado anteriormente, que foi diagnosticado como CRI e apresentou alteração cromossômica biclonal. As alterações citogenéticas encontradas envolveram o cromossomo 7. O clone apresentando -7 era o que apresentava o maior número de células e o clone com del(7q22q32) mostrava-se em menor frequência.

O cariótipo definido pelo bandeamento GTG foi: 46,XY,del(7)(q22q32)[5]/45,XY,-7 [15]/ 46,XY[3]. A fim de melhor caracterizar a frequência das células envolvendo cariótipos com alterações no 7, foi utilizado o FISH com a sonda para monossomia e deleção do braço longo do cromossomo 7 (D7s486 *spectrum orange*/CEP7 *spectrum Green*) (Figura 4.9). Foi verificada através da análise com FISH em 200 núcleos interfásicos a frequência de -7 em 75% (150 células) a del(7q) em 20% (30 células). A análise através da metodologia do FISH foi uma técnica complementar confirmando a alteração cromossômica biclonal envolvendo o cromossomo 7.

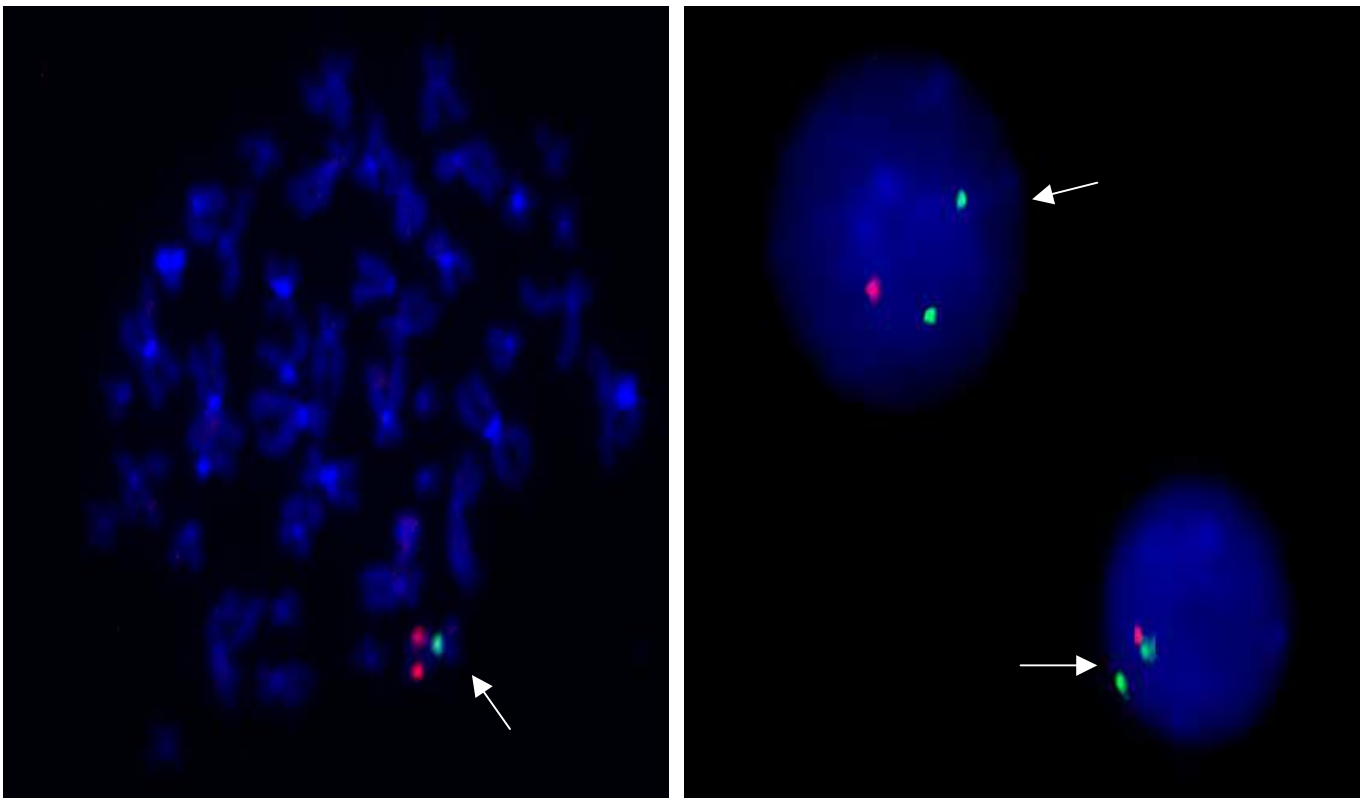


Figura 4.9: Análise através da hidridização *in situ* por fluorescência das alterações envolvendo o cromossomo 7. A sonda com fluorescência verde hibridiza com o centrômero e a sonda com fluorescência vermelha hibridiza no braço longo do cromossomo 7, na região q23. (A) Metáfase mostrando a -7. (B) Núcleos interfásicos mostrando a del(7q).

4.3 Distribuição das Alterações Cromossômicas nos Subtipos de SMD Pediátrica

Segundo a classificação da SMD pediátrica proposta por Hasle e colaboradores em 2016, do total de pacientes, 100 (66%) foram classificados com o subtipo inicial da doença, CRI. Nos subtipos mais avançados, 28 (18%) apresentaram AREB e 24 AREB-t. Os pacientes com CRI apresentaram uma frequência de 40% de cariótipos anormais, já os pacientes com AREB e AREB-t apresentaram uma frequência de 71% e 96% de cariótipos anormais, respectivamente (Tabela 4.1).

Tabela 4.1: Classificação dos pacientes e a distribuição de cariótipos anormais

Subtipo	n° de pacientes	Cariótipos anormais	Cariótipos Normais
CRI	100 (66%)	40 (40%)	60 (60%)
AREB	28 (18%)	20 (71%)	8 (28%)
AREB-t	24 (16%)	23 (96%)	1 (4%)
Total	152 (100%)	83 (55%)	67 (45%)

Analisando a distribuição do padrão cromossômico na SMD pediátrica, não foi identificado um padrão cariotípico específico por subtipo. Contudo, nos pacientes com CRI foi observada uma alta incidência (60%) de cariótipos normais. A alteração cromossômica mais frequente neste grupo foi a -7, seguida pela del(11)(q23) e del(17p). No subtipo AREB, foram verificadas as seguintes alterações cromossômicas: del(6q), +6, del(7q) isolada e associada à del(12p), +8, i(9q), del(11)(q23), del(12p) e cariótipo complexo. A alteração mais frequente neste grupo foi a del(11)(q23). Em AREB-t, 96% dos pacientes apresentaram alterações cromossômicas, sendo elas: t(4;7), t(5;8), -7, add(9q) associado com inv(1q), +8 isolada e/ou associada a del(11q23), del(12p), +21 associada a um cromossomo marcador e cariótipo complexo. Assim como na CRI, a alteração mais frequente foi a -7 (Figura 4.10).

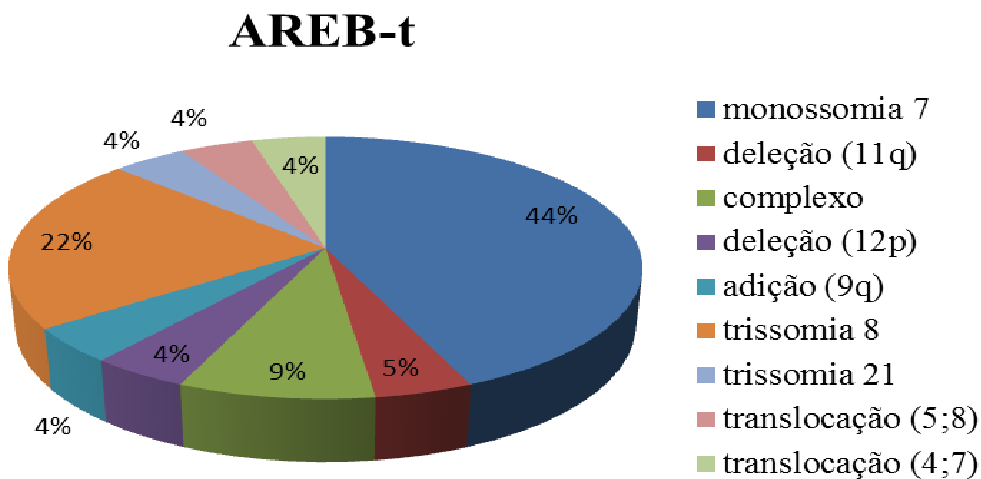
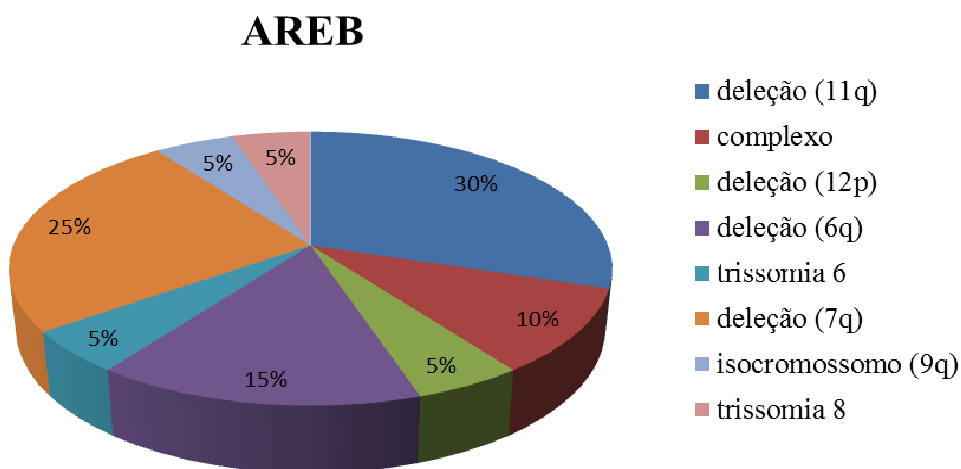
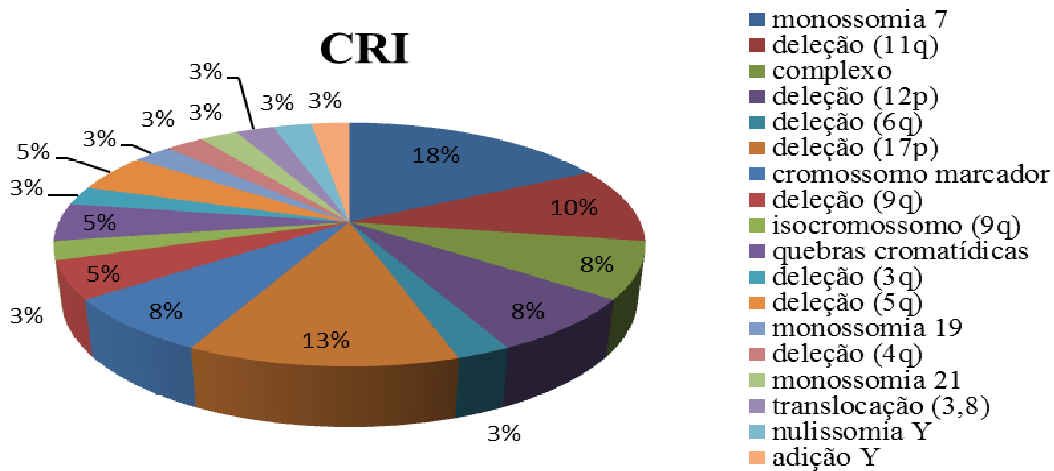


Figura 4.10: Distribuição do padrão cariotípico por subtipo da SMD Pediátrica

4.4 Associação entre a Citogenética e a Evolução da SMD Pediátrica Primária

Nos pacientes classificados com CRI, 10% (10/100) apresentaram evolução da doença. Desses, sete evoluíram para AREB, um para AREB-t e dois para leucemia (um para LMA e um para LLA-B). Daqueles classificados com AREB, 53,57% (15/28) apresentaram evolução da SMD sendo 1 para AREB-t e 11 para LMA. Já nos pacientes com AREB-t, 87,5% (21/24) apresentaram transformação leucêmica para LMA.

A progressão do curso clínico da SMD esteve presente em 46 (30,26%) dos 152 pacientes estudados. Desses, oito evoluíram dentro da própria patogênese da SMD, passando para os subtipos mais avançados [AREB (7)/ AREB-t(1)]. Contudo, a maioria dos pacientes (82,6%) evoluíram para leucemia, sendo 31 para LMA e um para LLA-B. As alterações citogenéticas observadas ao diagnóstico nesses pacientes foram: cariótipo normal, del(3p), del(4q), t(4;7), t(5;8), del(6q), -7, del(7q), +8 isolado, i(9q), add(9q), del(11q) ou acompanhado de outras alterações cromossômicas, del(12p), +21 acompanhada de um cromossomo marcador e cariótipos complexos (Tabela 4.2). As alterações citogenéticas mais frequentes no grupo com a evolução da doença foram a -7, a del(11q) e o cariótipo complexo.

Tabela 4.2: Alterações citogenéticas associadas à evolução

Cariótipo	Evolução SMD→LMA	Sem Evolução da SMD
Normal	6	63
monossomia 7	9	8
deleção (11q)	7	4
complexo	5	2
deleção (12p)	1	4
deleção (6q)	2	2
Trissomia 6	0	1
deleção (17p)	0	5
deleção (7q)	2	3
cromossomo marcador	0	3
deleção (9q)	0	2
isocromossomo (9q)	1	1
adição (9q)	1	0
quebras cromatídicas	0	2
trissomia 8	6	0
deleção (3q)	1	0
deleção (5q)	0	2
monossomia 19	0	1
deleção (4q)	0	1
monossomia 21	0	1
trissomia 21	1	0
translocação (5;8)	1	0
translocação (4;7)	1	0
translocação (3;8)	0	1
nulissomia Y	0	1
adição Y	0	1

Embora não tenha sido incluído em nosso estudo, um caso de evolução de SMD para LMA que nos chamou atenção foi de uma criança com história clínica prévia de anemia de Fanconi. Esta criança evoluiu para AREB, adquirindo uma alteração citogenética ainda não descrita na literatura: 46,XY,der(9)t(9;11)(p24;q?22), der(11)t(9;11)(p24;q?22)[9].ish del(11) (q22.3q23)(ATM-)(KMT2A-)[7] (Figura 4.11 A). A citogenética por bandeamento GTG revelou o seguinte cariótipo 46,XY,der(9)t(9;11)(p24;q?22)[9]/46,XY[12], através da técnica do FISH verificamos a deleção monoalélica dos genes *ATM* (Figura 4.11 B) e *KMT2A* (Figura 4.11 C) (localizados em 11q22 e 11q23, respectivamente) O paciente foi indicado ao TCTH halogênico, no entanto, não foi encontrado doador compatível, sendo tratado com decitabina com boa tolerância, contudo três meses depois houve a progressão para LMA. O paciente veio a óbito oito meses após o diagnóstico de AREB-t devido à progressão da doença e infecções recorrentes. Esse relato de caso resultou na publicação “An uncommon

t(9;11)(p24;q22) with monoallelic loss of ATM and KMT2A genes in a child with myelodysplastic syndrome/acute myeloid leukemia who evolved from Fanconi anemia” na revista Molecular Cytogenetics (Anexo III).

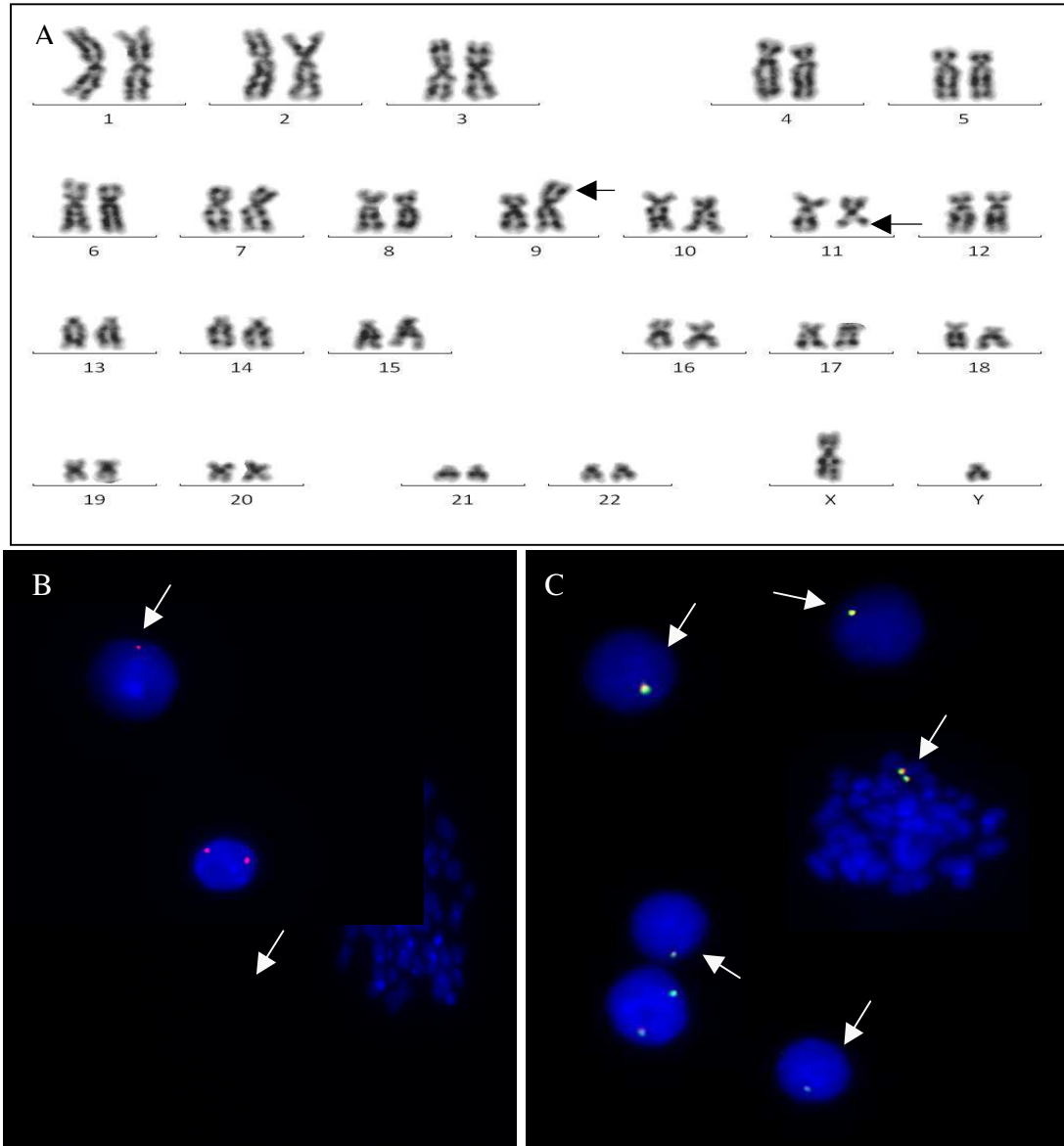


Figura 4.11: Análise por bandeamento GTG e FISH. A: Cariótipo por bandeamento GTG mostrando as alterações nos cromossomos 9 e 11 destacadas pelas setas. B: Análise por FISH usando a sonda *LSI ATM(11q22)* Vysis mostrando a deleção monoalélica, com a perda de um sinal do gene *ATM* indicado pelas setas. A sonda para o gene *ATM* é marcada com fluorescência vermelha. C: Análise por FISH utilizando a sonda *LSI MLL/KMT2A Dual Color break apart rearrangement* Vysis, mostrando a deleção monoalélica do gene *MLL* indicado pelas setas. A sonda do gene *MLL* é marcada com dois fluoróforo, sendo um da cor vermelha e a outro verde. A justaposição dos dois segmentos da sonda resulta no sinal amarelado, mostrando a ausência de rearranjo.

4.5 Distribuição dos Pacientes Pediátricos com SMD nos Subgrupos de Risco Citogenéticos de acordo com IPSS e IPSS-R

Foi utilizada a classificação segundo o grupo de risco citogenético de acordo com o Sistema Internacional de Escala Prognóstica (IPSS, de 1997) e o IPSS- revisado (IPSS-R, de 2012). De acordo com a classificação do IPSS, os pacientes foram estratificados nos grupos: bom, intermediário e mau prognóstico. Em nosso estudo, os pacientes foram agrupados da seguinte forma: a maioria dos pacientes foi classificada no grupo de bom prognóstico 73/152 (48%); no intermediário, foram 50/152 (33%); no grupo de mau prognóstico, foram 29/152 (19%). A evolução da doença foi observada em 8% dos pacientes do grupo classificados como bom prognóstico, em 46% daqueles de prognóstico intermediário e em 51% dos com mau prognóstico (Tabela 4.3).

Tabela 4.3: Distribuição dos pacientes de acordo com grupo de risco citogenético segundo o IPSS e sua associação com a evolução da doença

Grupo de risco citogenético pelo IPSS	Frequência	Evolução SMD→LMA	Sem Evolução da SMD
Bom	48%	6 (8%)	67 (92%)
Intermediário	33%	23 (46%)	27 (54%)
Mau	19%	15 (51%)	14(48%)

Foi analisada, também, a distribuição dos pacientes de acordo a citogenética segundo o IPSS-R. De acordo com essa classificação, nossos pacientes foram distribuídos nos seguintes grupos de risco: 12 (8%) pacientes como muito bom prognóstico; 75 (49%) bom prognóstico; 39 (26%) como prognóstico intermediário; 19(12%) como mau prognóstico; e apenas se e (5%) pacientes estratificados no grupo citogenético de muito mau prognóstico.

Segundo essa distribuição, a evolução da doença ocorreu em 58% (7/12) dos pacientes do grupo citogenético de muito bom prognóstico, em 11% (8/75) do grupo de bom prognóstico, em 41% (16/39) dos classificados como risco intermediário, em 53% (10/19) dos considerados como prognóstico desfavorável e em 71%(5/7) do grupo de prognóstico muito desfavorável (Tabela 4.4).

Tabela 4.4: Distribuição dos pacientes segundo o risco citogenético do IPSS-R e sua associação com a evolução

Grupo de risco citogenético pelo IPSS-R	Frequência	Evolução SMD→LMA	Sem Evolução da SMD
Muito Bom	8%	7 (58%)	5 (42%)
Bom	49%	8 (11%)	67 (89%)
Intermediário	26%	14 (35%)	24 (59%)
Desfavorável	12%	10 (53%)	9 (47%)
Muito desfavorável	5%	5 (71%)	2 (29%)

Quando comparamos a estratificação pelo IPSS e IPSS-R observamos que, no IPSS-R, há um maior número de pacientes classificados com citogenética de muito bom prognóstico que apresentaram evolução de SMD para LMA. Isso se deve ao fato que, pelo IPSS-R, cariótipos que apresentaram a del(11q23) foram considerados de muito bom prognóstico; porém, em nossos pacientes, esta alteração esteve associada com a evolução da doença. O grupo de prognóstico intermediário pelo IPSS-R apresentou uma taxa menor de evolução quando comparado ao IPSS, sendo que houve um aumento na taxa de evolução no grupo de bom prognóstico.

4.6 Análise da expressão gênica de *DNMTs*, *TET2* e *APOBEC3B* em pacientes pediátricos com SMD

Foi realizada a análise de expressão dos genes *DNMT1*, *DNMT3A*, *DNMT3B*, *TET2* e *APOBEC3B* por RT-qPCR em 39 amostras de amostras de medula óssea de pacientes com SMD pediátrica primária e em 13 doadores pediátricos de medula óssea. Do total de 39 pacientes, 23 (59%) eram do sexo masculino e 16 (41%) eram do sexo feminino. A idade média desses pacientes foi de sete anos (1-18 anos). Do total de 13 doadores pediátricos, oito (61,5%) eram do sexo masculino e cinco (38,5%) eram do sexo feminino. A idade média dos doadores foi de 10 anos (4 e 18 anos). Dos pacientes estudados, 27 (69%) foram classificados no subtipo CRI, sete (18%) AREB e cinco (13%) AREB-t (Tabela 4.5).

Tabela 4.5: Características clínicas e citogenéticas dos pacientes pediátricos com SMD incluídos na análise de expressão gênica

Pacientes	Número / (%)
Sexo	
Masculino	23/39 (59%)
Feminino	16/39 (41%)
Idade, mediana (variação)	7 (1 -18)
Hasle (2003 - 2016)	
CRI	27/39 (69%)
AREB	7/39 (18%)
AREB-t	5/39 (13%)
Número de Citopenias	
0	2/39 (5%)
1	17/39 (43,6%)
2	9/39 (23%)
3	11/39 (28,2%)
Blastos na MO (%)	
<5%	27/ (69%)
5-19%	9/ (23%)
20-29%	3/ (8%)
Citogenética	
Cariótipo Normal	22/39 (56,%)
Cariótipo Anormal	17/39 (44%)
Evolução da Doença	
Não	28/ (72%)
Sim	11/ (28%)

A expressão de todos os genes analisados nos pacientes pediátricos com SMD foi heterogênea, enquanto os doadores tiveram um perfil de expressão mais homogêneo (Figura 4.12). Foi verificado um aumento de expressão dos genes *DNMT1* ($p= 0,03$), *DNMT3A* ($p= 0,03$) e *DNMT3B* ($p= 0,02$) nos pacientes pediátricos com SMD quando comparados aos doadores pediátricos (Figuras 4.11 A, B, C). A *DNMT3B* apresentou maior nível de expressão nos pacientes em relação a *DNMT1* e *DNMT3A*. Os níveis de expressão de *TET2* e *APOBEC3B* não apresentaram diferenças significativas entre os pacientes pediátricos e doadores (Figuras 4.12 D, E).

Neste estudo, foi observada correlação positiva significativa entre a expressão de *DNMT1* e *DNMT3A* ($r = 0,52$, $p = 0,001$); *DNMT1* e *DNMT3B* ($r = 0,42$; $p = 0,01$); *DNMT3A* e *DNMT3B* ($r = 0,68$; $p = 0,0001$); *DNMT3A* e *APOBEC3B* ($r = 0,52$; $p = 0,001$); e *DNMT3B* e *APOBEC3B* ($r = 0,71$ $p = 0,0001$) (Figuras 4.13. A, B, E, G, I). No entanto, a expressão de *TET2* mostrou-se independente da expressão das *DNMTs* e *APOBEC3B*, não apresentando correlação significativa (Figuras 4.13 C, D, F, H, J).

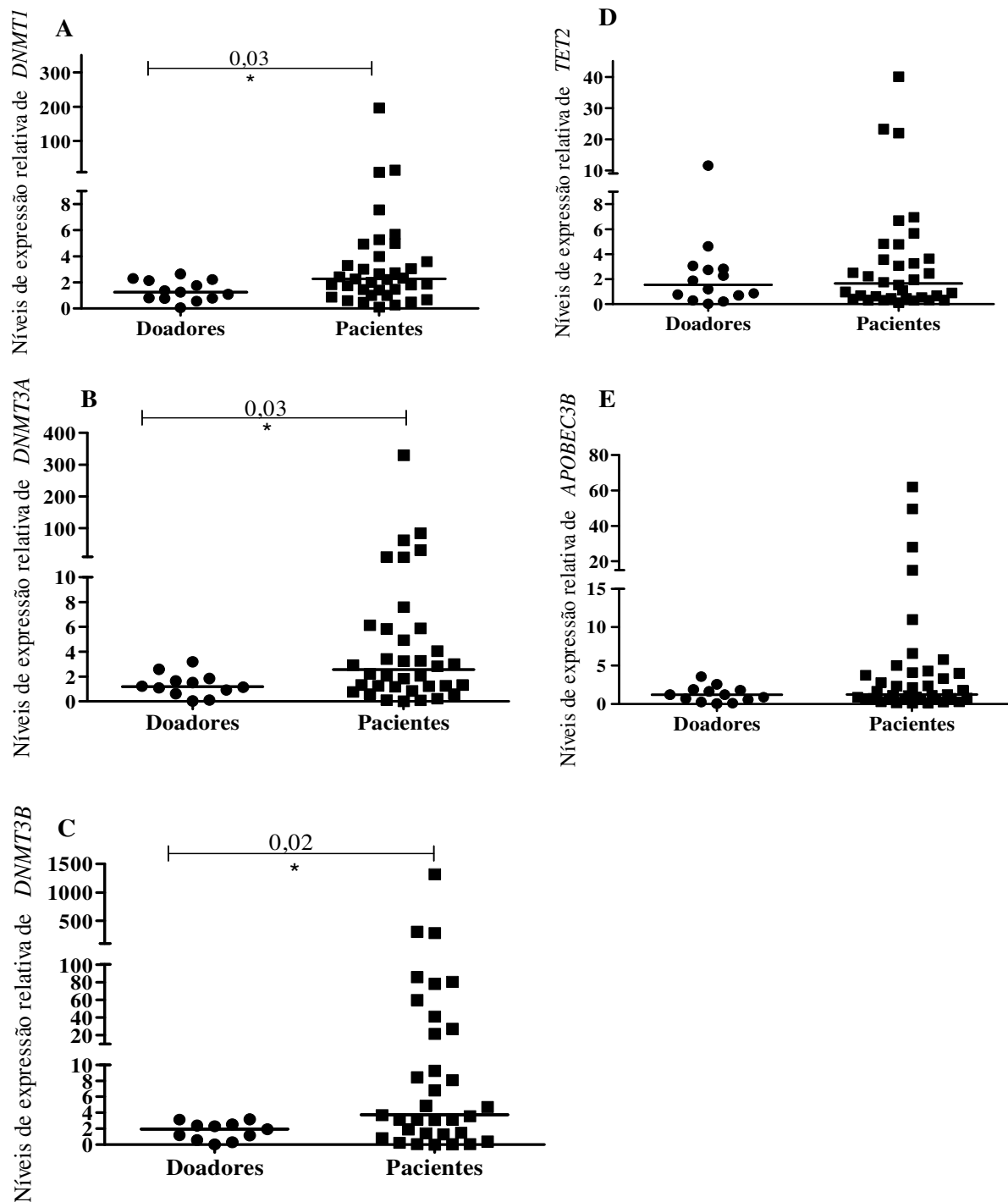


Figura 4.12. Perfil de expressão de *DNMTs*, *TET2* e *APOBEC3B* em pacientes pediátricos com SMD e doadores pediátricos saudáveis. Os resultados estão representados nos gráficos de pontos mostrando a expressão relativa aos controles dos genes: (A) *DNMT1*; (B) *DNMT3A*; (C) *DNMT3B*; (D) *TET2* e (E) *APOBEC3B*.

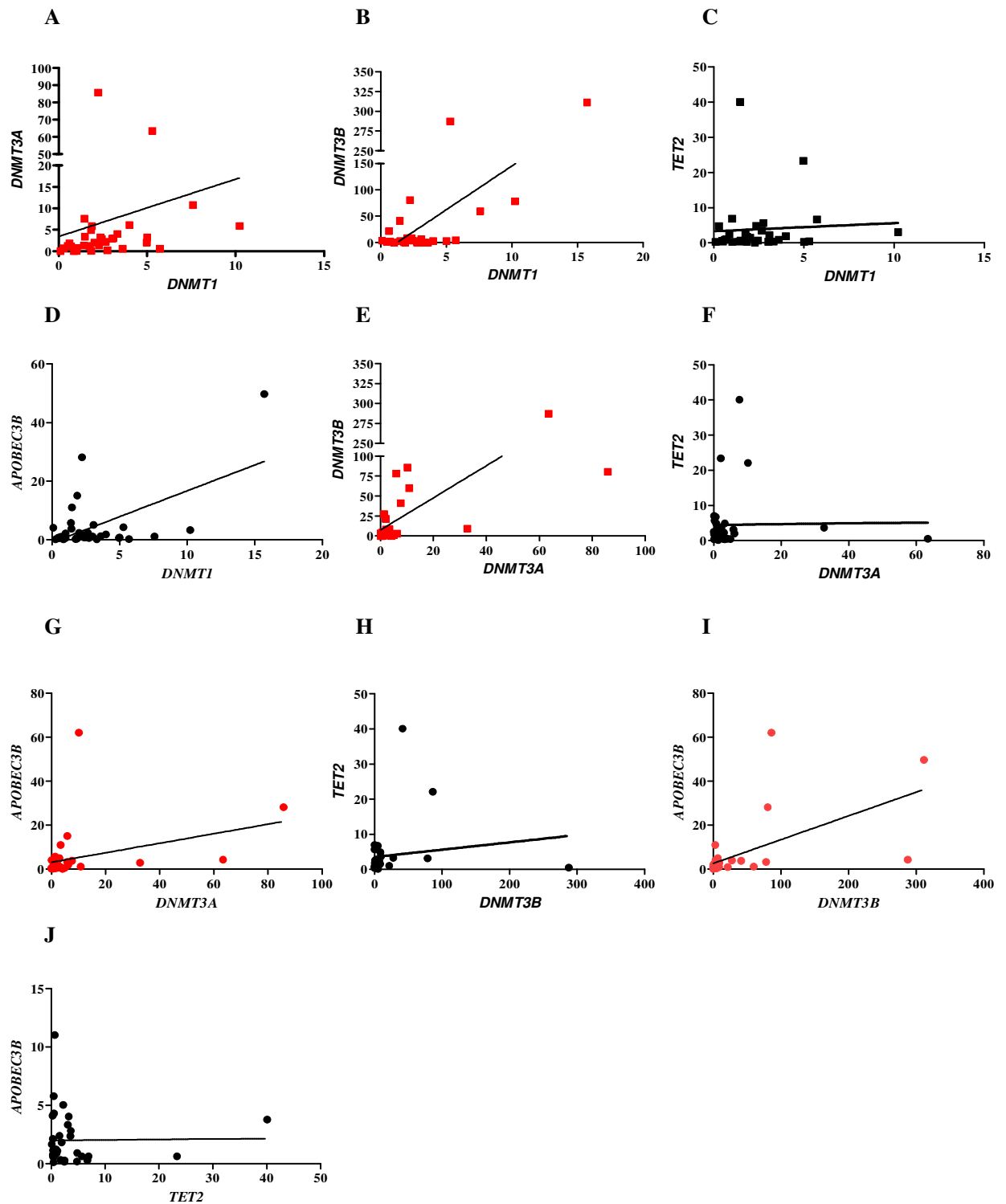


Figura 4.13. Análises de correlação entre a expressão de *DNMTs*, *TET2* e *APOBEC3B*. Gráficos de correlação entre a expressão de (a) *DNMT1* e *DNMT3A*; (b) *DNMT1* e *DNMT3B*; (c) *DNMT1* e *TET2*; (d) *DNMT1* e *APOBEC3B*; (e) *DNMT3A* e *DNMT3B*; (f) *DNMT3A* e *TET2*; (g) *DNMT3A* e *APOBEC3B*; (h) *DNMT3B* e *TET2*; (i) *DNMT3B* e *APOBEC3B* e (j) *TET2* e *APOBEC3B* são mostrados. Correlações com $p < 0,05$ são mostradas em vermelho.

4.7 Expressão de *DNMTs*, *TET2* e *APOBEC3B* de acordo com os subtipos de SMD pediátrica, citogenética e evolução da doença

Ao estudarmos os pacientes segundo o subtipo da SMD pediátrica, observamos que os pacientes em estágio inicial (CRI) apresentaram níveis de expressão *DNMT1* semelhantes aos pacientes em estágio avançado (AREB/ AREB-t). Ambos os subtipos estavam com expressão aumentada de *DNMT1* quando comparados aos doadores tendo significância estatística apenas para pacientes com CRI ($p = 0,01$) (Figura 4.14 A). Para *DNMT3A*, observamos um aumento de expressão nos pacientes com AREB/ AREB-t em relação aos pacientes com CRI, embora esse resultado não tenha significado estatístico. Além disso, em ambos os estágios, houve aumento da expressão de *DNMT3A* quando comparados aos doadores e significância estatística foi observada em pacientes com AREB/ AREB-t ($p = 0,02$) (Figura 14 B). A expressão de *DNMT3B* foi maior em pacientes com CRI do que em pacientes com AREB/ AREB-t. Pacientes com ambos os subtipos de SMD apresentaram maior expressão de *DNMT3B* em relação aos doadores saudáveis, sendo evidenciada significância nos estágios avançados ($p = 0,007$) (Figura 4.14 C). A expressão de *TET2* e *APOBEC3B* foi maior em pacientes com CRI quando comparados àqueles com AREB/ AREB-t, porém sem significância estatística (Figuras 4.14 D, E).

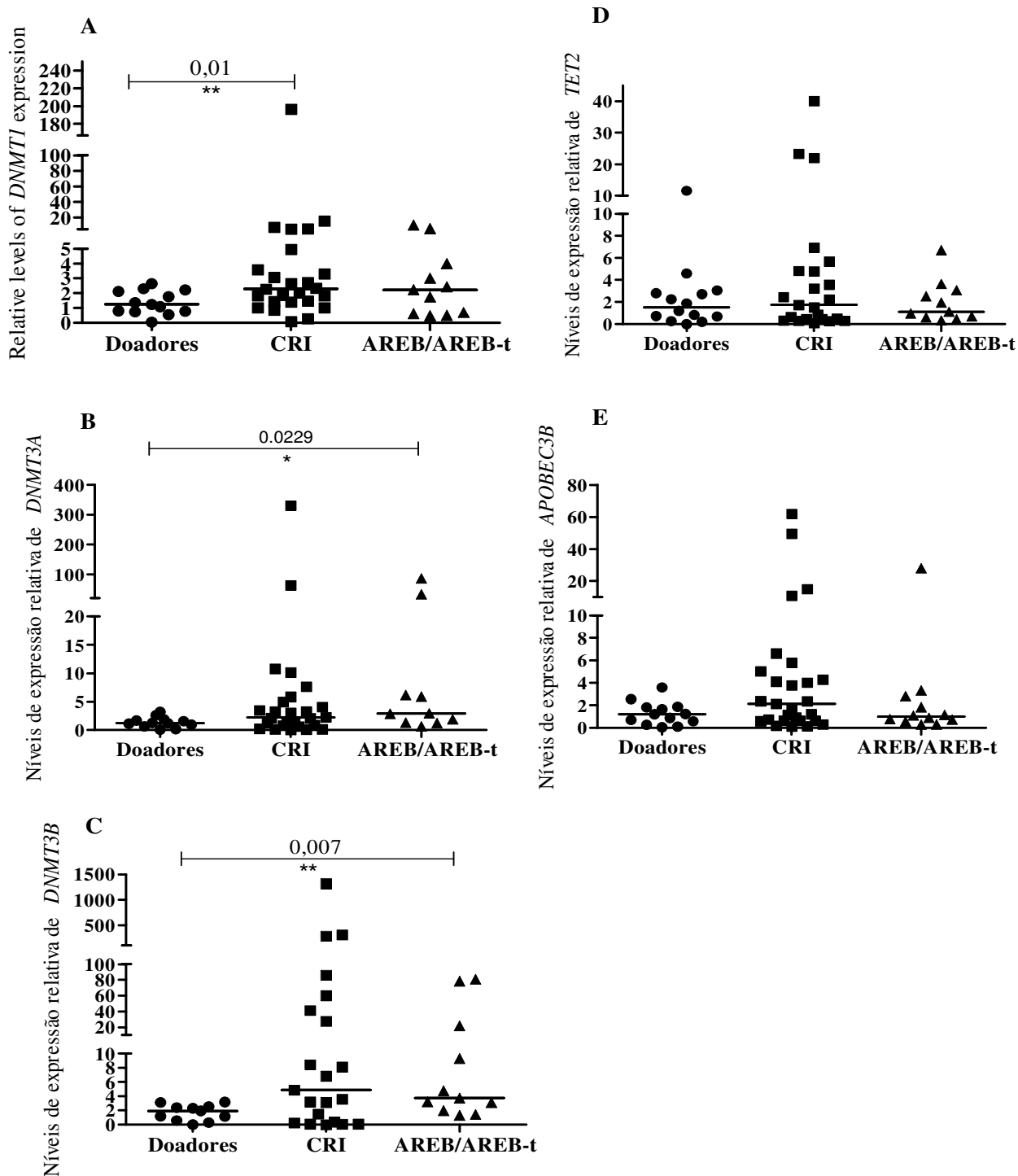


Figura 4.14. Perfil de expressão dos *DNMTs*, *TET2* e *APOBEC3B* de acordo com os subtipos de SMD pediátrica e doadores pediátricos saudáveis. Os gráficos de pontos mostram a expressão de (A) *DNMT1*; (B) *DNMT3A*; (C) *DNMT3B*; (D) *TET2* e (E) *APOBEC3B* relativa aos controles em doadores saudáveis, citopenia refratária da infância (CRI), anemia refratária com excesso de blastos (AREB) e anemia refratária com excesso de blastos em transformação (AREB-t). * $p < 0,05$.

Considerando pacientes com cariótipos normais e anormais, foi possível observar que ambos os grupos de pacientes apresentaram expressão de *DNMT1*, *DNMT3A* e *DNMT3B* aumentada em comparação com doadores saudáveis (Figuras 4.15 A, B, C). Esses resultados mostraram diferenças significativas para *DNMT1* ($p= 0,03$) e *DNMT3B* ($p= 0,02$) entre os pacientes com cariótipos normais e os doadores. Observamos também uma diferença significativa para *DNMT3A* ao comparar pacientes com cariótipos anormais e doadores saudáveis ($p= 0,03$).

Os níveis de expressão de *DNMT1* e *DNMT3A* foram semelhantes entre pacientes com cariótipos normais e anormais. Já para *DNMT3B*, foi observado um aumento de expressão nos pacientes com cariótipos normais em relação aos pacientes com cariótipos anormais, embora esses resultados não apresentem significância estatística. A expressão de *TET2* não apresentou diferenças estatísticas em relação ao cariótipo nos pacientes (Figura 4.15 D). Embora, pacientes com cariótipos anormais tenham apresentando uma expressão de *TET2* aumentada quando comparados com pacientes com cariótipos normais e os doadores. Para *APOBEC3B*, observamos um aumento na expressão nos pacientes com cariótipos normais em relação a pacientes com cariótipos anormais e doadores, sendo significativo em relação aos doadores, $p = 0,04$ (Figura 4.15 E).

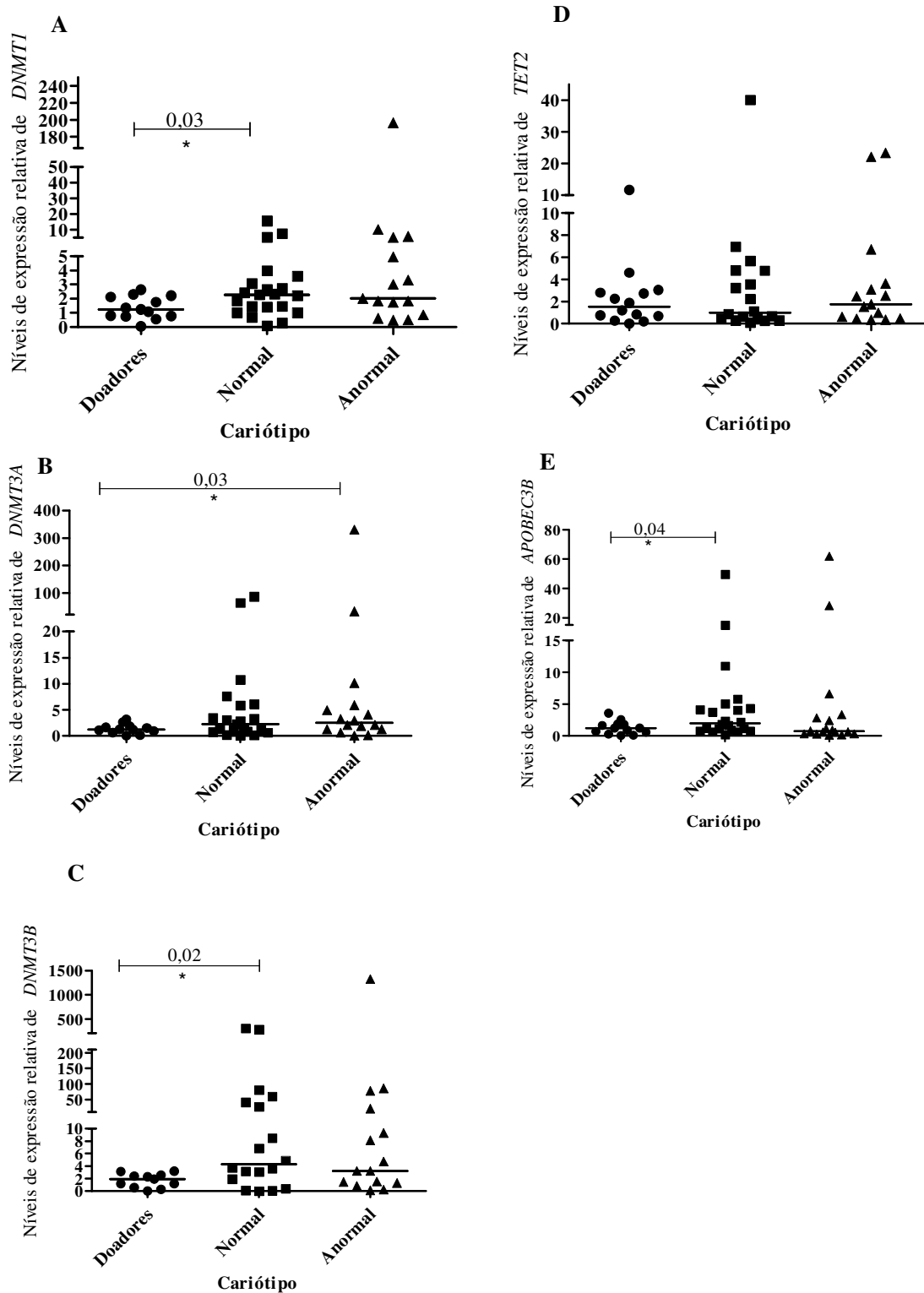


Figura 4.15. Perfil de expressão dos *DNMTs*, *TET2* e *APOBEC3B* de acordo com cariótipo de SMD pediátrica e doadores saudáveis. Os gráficos de pontos mostram a expressão de (A) *DNMT1*; (B) *DNMT3A*; (C) *DNMT3B*; (D) *TET2* e (E) *APOBEC3B* relativa aos controles em doadores e pacientes com cariótipo normal ou anormal. * $p < 0,05$.

Analizamos também a associação entre expressão de *DNMTs*, *TET2* e *APOBEC3B* e a evolução da SMD para a LMA. A evolução da doença foi observada em 28% dos pacientes (11/39). *DNMT1*, *DNMT3A* e *DNMT3B* em pacientes que apresentaram evolução da doença estavam super expressas quando comparadas aos doadores, $p= 0,04$; $p= 0,02$; $p= 0,005$, respectivamente (Figuras 4.16 A, B, C). Também observamos aumento da expressão de *DNMTs* em pacientes que evoluíram para LMA quando comparados com aqueles que não apresentaram evolução da doença. No entanto, esse resultado não apresentou significância estatística. A expressão de *TET2* foi menor em pacientes que apresentavam evolução para LMA quando comparados àqueles sem evolução da doença ou os doadores (Figura 4.16 D). No entanto, esses resultados não mostram significância estatística. Observamos um maior nível de expressão de *APOBEC3B* em pacientes que evoluíram com doença quando comparados com aqueles que não apresentaram evolução e também com doadores saudáveis, mas sem significância estatística (Figura 4.16 E).

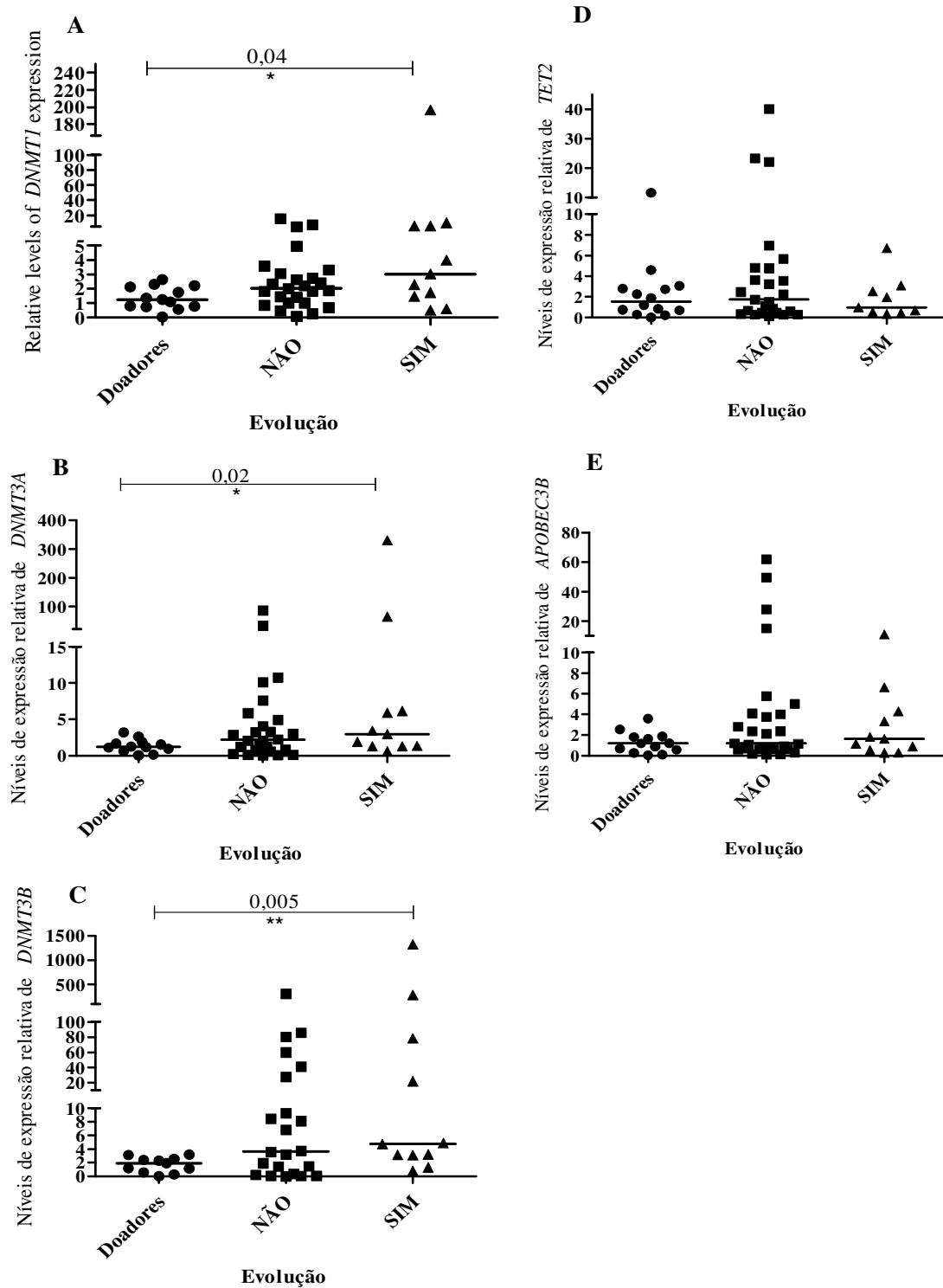


Figura 4.16. Perfil de expressão das *DNMTs*, *TET2* e *APOBEC3B* de acordo com a evolução da SMD. Os gráficos de pontos mostram a expressão de (a) *DNMT1*; (b) *DNMT3A*; (c) *DNMT3B*; (d) *TET2* e (e) *APOBEC3B* relativa aos controles em doadores saudáveis, pacientes que não apresentaram evolução da doença e pacientes que apresentaram evolução da doença. Os resultados estão representados nos gráficos “dot-plot” mostrando a mediana (GraphPad Prism versão 5).

Parte desses resultados foram enviados ao Congresso Brasileiro de Hematologia, Hemoterapia e Terapia Celular- HEMO 2017 sendo intitulado “Estudo das alterações epigenéticas em pacientes pediátricos com Síndrome Mielodisplásica e sua associação com o cariótipo e as características clínicas”. Esse trabalho foi contemplado com o melhor trabalho em hematologia pediátrica pela Associação Brasileira de Hematologia, Hemoterapia e Terapia Celular (Anexo IV).

4.8 Análise do Perfil de Metilação na Região Promotora do Gene $p15^{INK4B}$

A quantificação do nível de metilação na região promotora do gene $p15^{INK4B}$ foi realizada pela técnica de pirosequenciamento em um fragmento de 66 pares de bases contendo 11 sítios CpGs, em um total de 43 amostras de pacientes com SMD pediátrica. A idade média dos pacientes foi de oito anos (variando de três meses a 17 anos). Como controle foi utilizado o perfil de metilação de 4 doadores de medula óssea da mesma faixa etária.

A análise de quantificação desses 11 sítios permitiu diferenciar o perfil de metilação dos pacientes em relação ao perfil dos doadores. Quando utilizada a média de metilação encontrada em cada sítio CpG, a diferença entre pacientes e doadores foi significativa, $p < 0,0001$ (Figura 4.17).

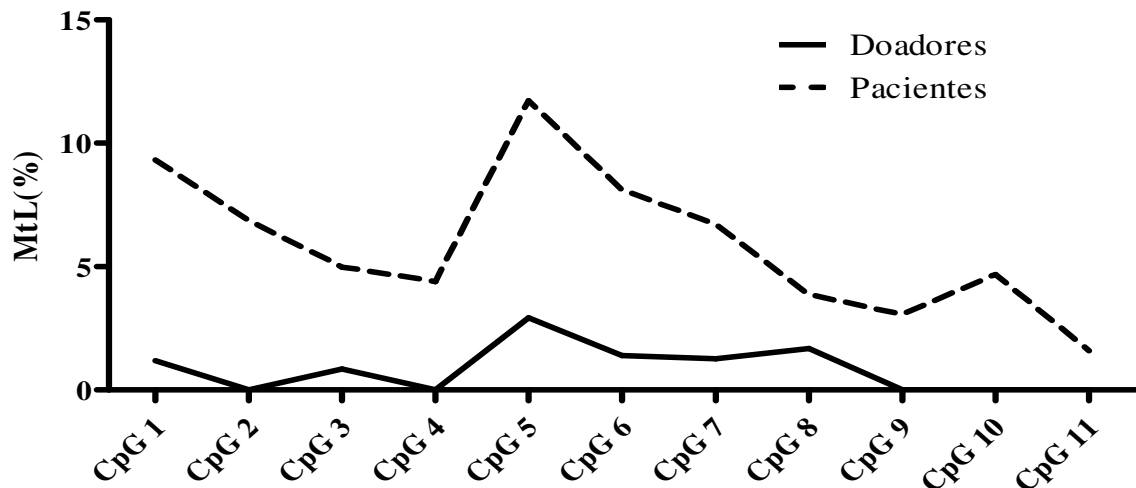


Figura 4.17: Comparação do perfil de metilação dos 11 sítios analisados na região promotora do gene *p15^{INK4b}* nos pacientes pediátricos com SMD e nos doadores pediátricos. MtL (média do nível de metilação).

O nível de metilação de cada paciente e doador foi determinado a partir da média da quantificação da metilação dos 11 sítios CpGs analisados. Através da análise comparativa entre a mediana da porcentagem de metilação observada nos pacientes (1,6%, 0 - 31,83%) e doadores (0,3%, 0 - 2,83). Dos pacientes estudados, em nove (21%) não foi detectada metilação, 19 (44%) estavam metilados e 15 (35%) estavam hipermetilados. O nível de metilação nos pacientes que apresentavam metilação estava aumentado quando comparado com os doadores, ($p= 0,02$) (Figura 4.18).

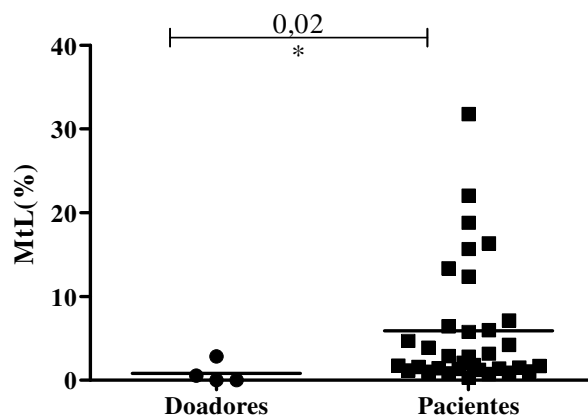


Figura 4.18: Comparação do nível de metilação da região promotora de *p15^{INK4B}* entre pacientes pediátricos com SMD e doadores pediátricos. Ao compararmos os pacientes que apresentaram metilação com os doadores, observamos diferença estatística ($p= 0,02$) (Teste de Mann- Whitney).

Os parâmetros utilizados para a definição do valor de ponto de corte (“cut-off”) do nível de metilação considerado normal (3,18 MtL) foram baseados na média (0,84 MtL) e

no desvio padrão observados nos doadores (1,16), através do cálculo [média + (2 x desvio padrão)] proposto por Kim e colaboradores em 2010. Desde modo, ao comparamos os pacientes com hipermetilação em relação aos doadores e os pacientes metilados, foi observado significância estatística ($p=0,005$; $p<0,0001$, respectivamente (Figura 4.19).

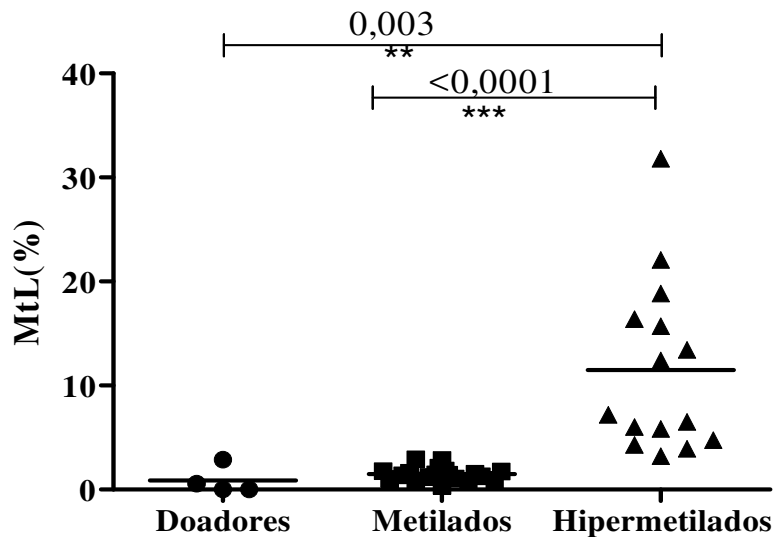


Figura 4.19: Relação entre os perfis de metilação da região promotora de $p15^{INK4B}$ observados nos pacientes pediátricos com SMD. Pacientes com hipermetilação na região promotora do gene $p15^{INK4B}$ apresentaram diferença significância estatística a quando comparados com doadores ($p=0,003$) e os pacientes com metilação ($p<0,0001$).

4.9 Análise da Associação entre o Perfil de Metilação da região promotora de $p15^{INK4B}$ com o Padrão Cariotípico e com a Evolução de SMD →LMA

Ao analisarmos os níveis de metilação da região promotora de $p15^{INK4B}$ segundo a citogenética, verificamos que os pacientes com cariótipo anormal apresentavam essa região hipermetilada em relação aos doadores pediátricos saudáveis ($p=0,03$) (Figura 4.20 A). A mediana do nível de metilação dos 24 pacientes com cariótipos anormais foi significativamente maior quando comparada com 19 pacientes pediátricos com cariótipo normal (1,07 vs 3,58 MtL, $p=0,006$, Figura 4.20A). Dos pacientes que não apresentaram metilação na região promotora do gene $p15^{INK4B}$, sete possuíam cariótipo normal e dois apresentaram cariótipos anormais. Nos pacientes com hipermetilação na região promotora do gene $p15^{INK4B}$, as alterações cromossômicas mais frequentes [40% (6/15)] envolveram o cromossomo 7 [del (7q) / -7]. Além disso, esses foram os pacientes que apresentaram o maior nível de metilação (Figura 4.20 B).

A quantificação da metilação na região promotora do gene $p15^{INK4B}$ mostrou que 24% (7/28) dos pacientes com CRI não estavam metilados, 43% (12/28) apresentavam metilação e 32% (9/28) estavam hipermetilados. Nos pacientes com AREB, 20% (2/10) não apresentavam metilação, 50% (5/10) encontravam-se metilados e 30% (3/10) hipermetilados. Já para os pacientes com AREB-t, não houve pacientes sem metilação; 40% (2/5) estavam metilados e 60% (3/5) hipermetilados (Figura 4.21). A associação entre o perfil de metilação e os subtipos de SMD pediátrica mostrou que pacientes no subtipo mais inicial já podem apresentar hipermetilação, contudo, esse evento ocorre em menor frequência quando comparado os pacientes nos subtipos mais avançados AREB/AREB-t.

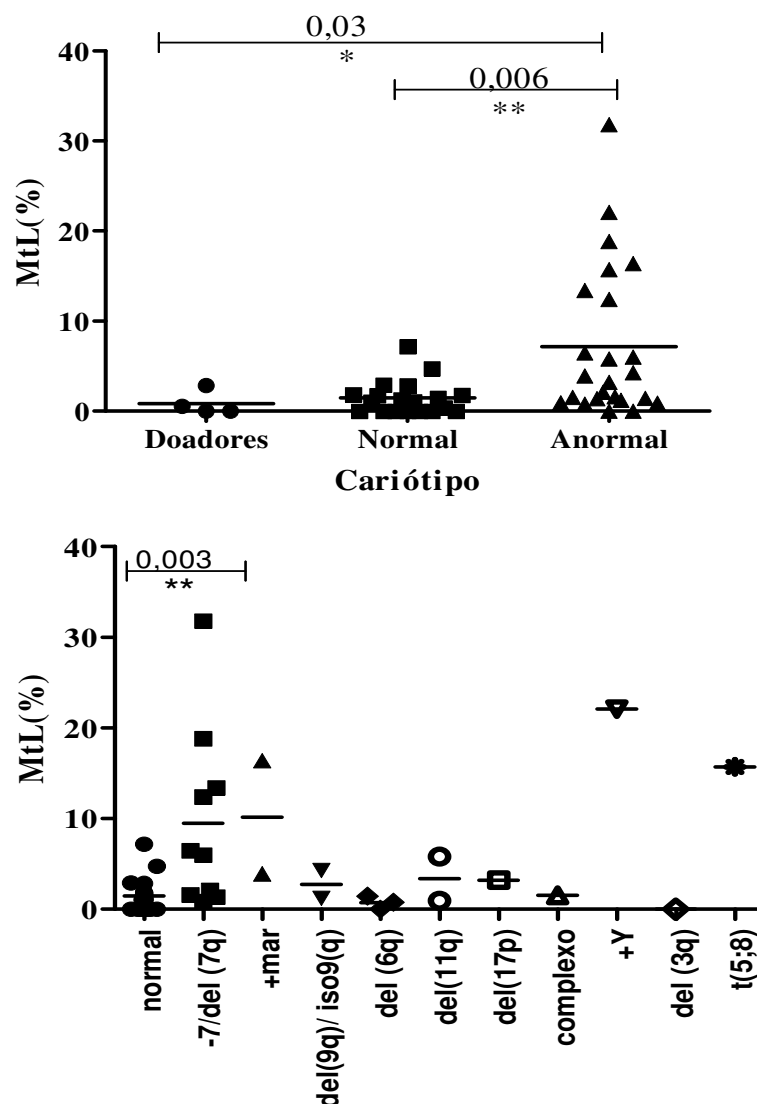


Figura 4.20: Comparação do perfil de metilação na região promotora do gene $p15^{INK4B}$ entre os pacientes com cariótipo normal e anormal. (A) O nível de metilação em pacientes com cariótipo anormal foi maior do que nos pacientes com cariótipo normal ($p < 0,0062$). (B) Metilação versus padrão cromossômico, pacientes com alteração do cromossomo 7 foram os que apresentaram uma porcentagem maior de metilação na região promotora do gene $p15^{INK4B}$.

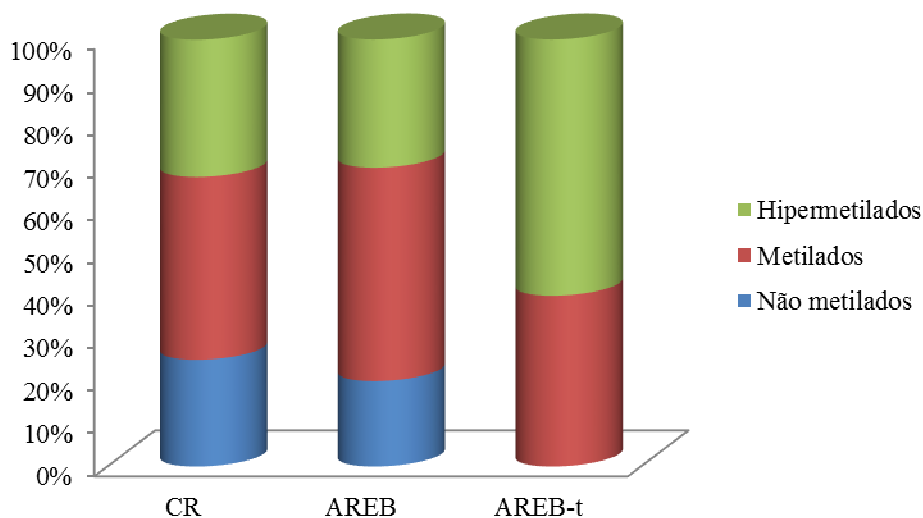


Figura 4.21: Avaliação do perfil de metilação na região promotora do gene $p15^{INK4B}$ de acordo com o subtipo da SMD pediátrica.

A evolução da doença foi verificada em 28% (12/43) dos pacientes; desses, 50% (6/12) apresentaram hipermetilação, 33% (4/12) metilação normal e 17% (2/12) não mostraram metilação. Já naqueles pacientes (31/43) que não apresentaram evolução da SMD, a hipermetilação foi observada em 29% (9/31), a metilação em 48% (15/31) e a não metilação em 22% (7/31). O aumento da metilação anormal está associada com a progressão da doença como pode ser observado na figura 4.22.

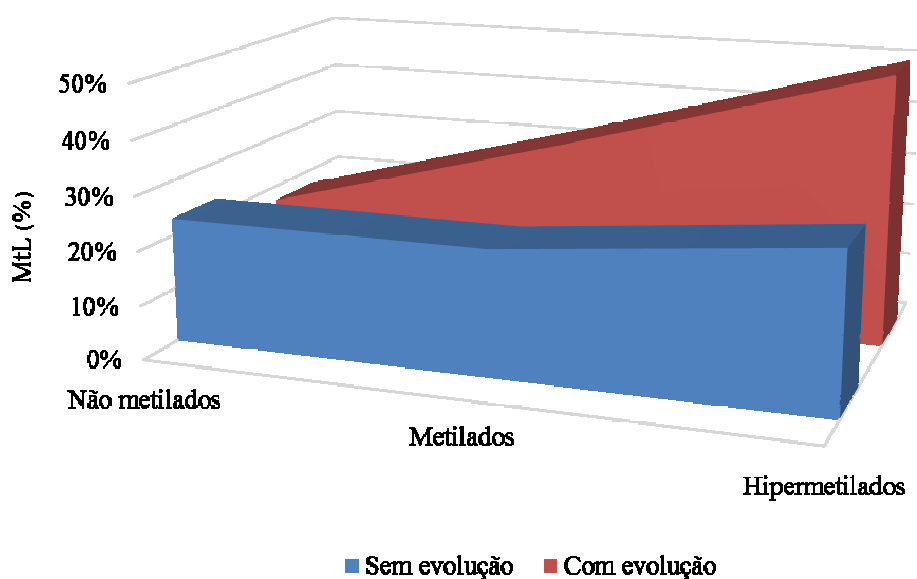


Figura 4.22: Comparação entre a evolução da SMD e o ganho de metilação anormal na região promotora do gene $p15^{INK4B}$.

Durante este estudo, foi possível analisar o perfil de metilação na região promotora do gene *p15^{INK4B}* em um paciente ao diagnóstico e durante a sua evolução para LMA. Esse paciente foi diagnosticado aos 10 anos de idade com SMD - CRI e apresentava citogeneticamente a monossomia do cromossomo 7. Através do pirosequenciamento, foi detectada hipermetilação (MtL 18,84%) na região promotora do gene *p15^{INK4B}* (Figura 4.23A). Após 5 meses, esse paciente evoluiu para AREB-t com a mesmo cariótipo inicial apresentando um aumento de metilação na região promotora deste gene (MtL 45,30%) chegando a ~4 vezes mais se compararmos os sítios CpGs individualmente (Figura 4.23B). Foi tratado com quimioterapia semelhante à utilizada para LMA e veio ao óbito um ano e sete meses após a evolução para AREB-t.

Esses resultados foram apresentados no X Congresso de Oncologia Pediátrica (2016) e foi contemplado com o Prêmio Rhomes Aur oferecido pela Sociedade Brasileira de Oncologia Pediátrica (SOBOPE) (Anexo V).

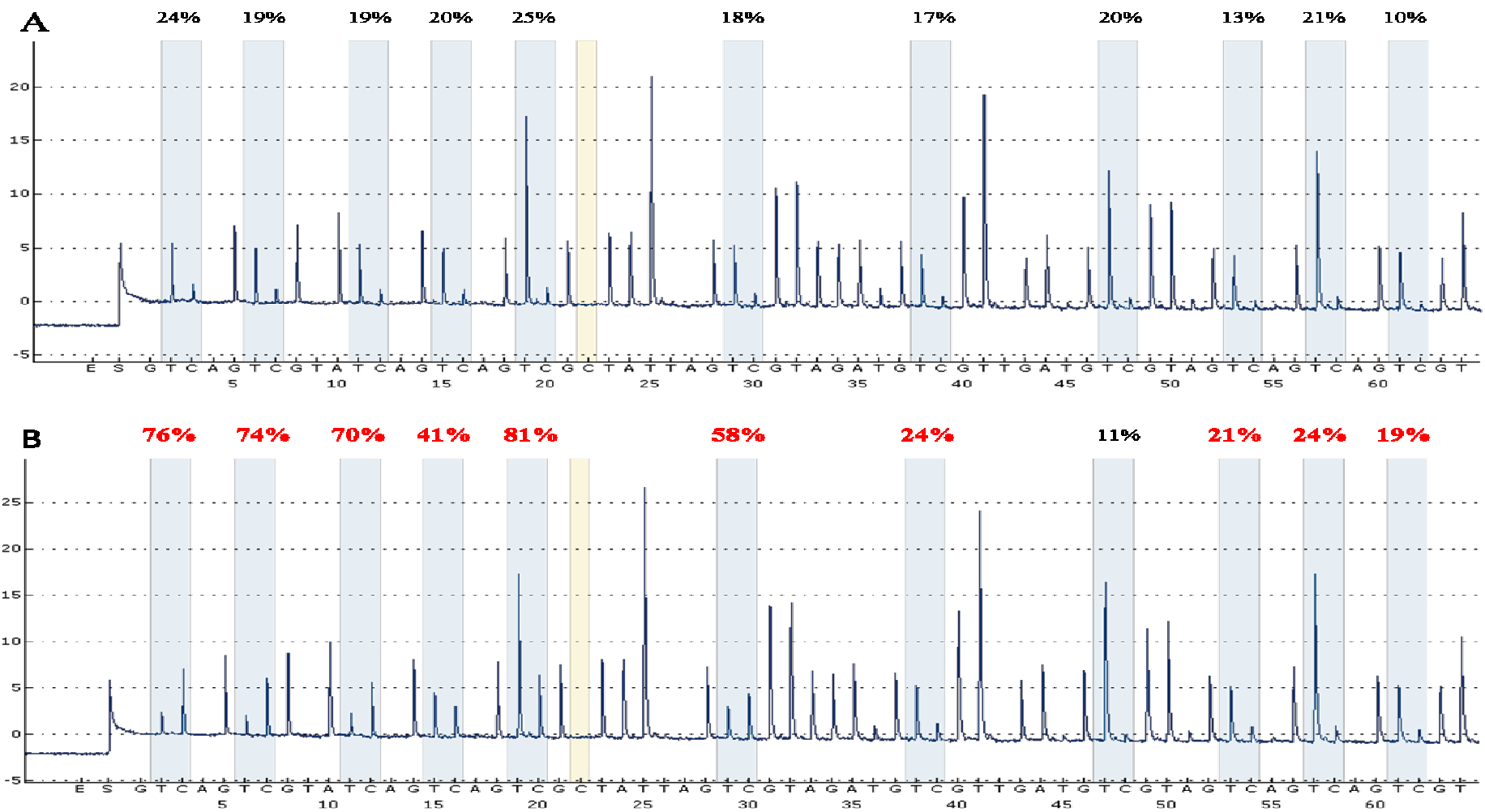


Figura 4.23: Pirosequenciamento da região promotora do gene *p15^{INK4B}* de um paciente ao diagnóstico e após evolução. (A) Quantificação de metilação do paciente ao diagnóstico (SMD-CRI). (B) Quantificação da metilação após a evolução da doença (SMD-AREB-t).

4. 10. Análise de Metilação Global em SMD Pediátrica

O estudo de metilação global em SMD pediátrica foi realizado através da quantificação da metilação de cinco sítios CpG presentes em um fragmento de 30 pares de base em LINE-1. Foram analisados 71 pacientes com idade média de 7,9 anos (5 meses- 18 anos) e como controle foram analisados 10 doadores pediátricos com idade média de 8,5 anos (4-14 anos). A análise da quantificação desses cinco sítios mostrou que os pacientes apresentam níveis de metilação global diminuídos em relação ao perfil dos doadores (Figura 4.24).

Observamos que os pacientes pediátricos com SMD apresentavam um menor nível de metilação em LINE-1 em comparação com os doadores (mediana 70,87 % MtL vs 72,63% MtL; $p=0,005$) (Figura 4.25). Ao utilizarmos como ponto de corte (“cut-off”) a média e o desvio padrão dos doadores verificamos que apenas 97% (69/71) dos pacientes apresentaram metilação abaixo do ponto de corte, confirmando o perfil dos pacientes pediátricos como hipometilados nas sequências LINE-1.

Ao compararmos o perfil de metilação entre os pacientes com idade entre ≤ 12 anos (52 crianças) e > 12 anos (19 adolescentes) verificamos que não houve diferença entre esses dois grupos (Figura 4.26). Deste modo, todas as análises subsequentes foram realizadas com o total dos pacientes.

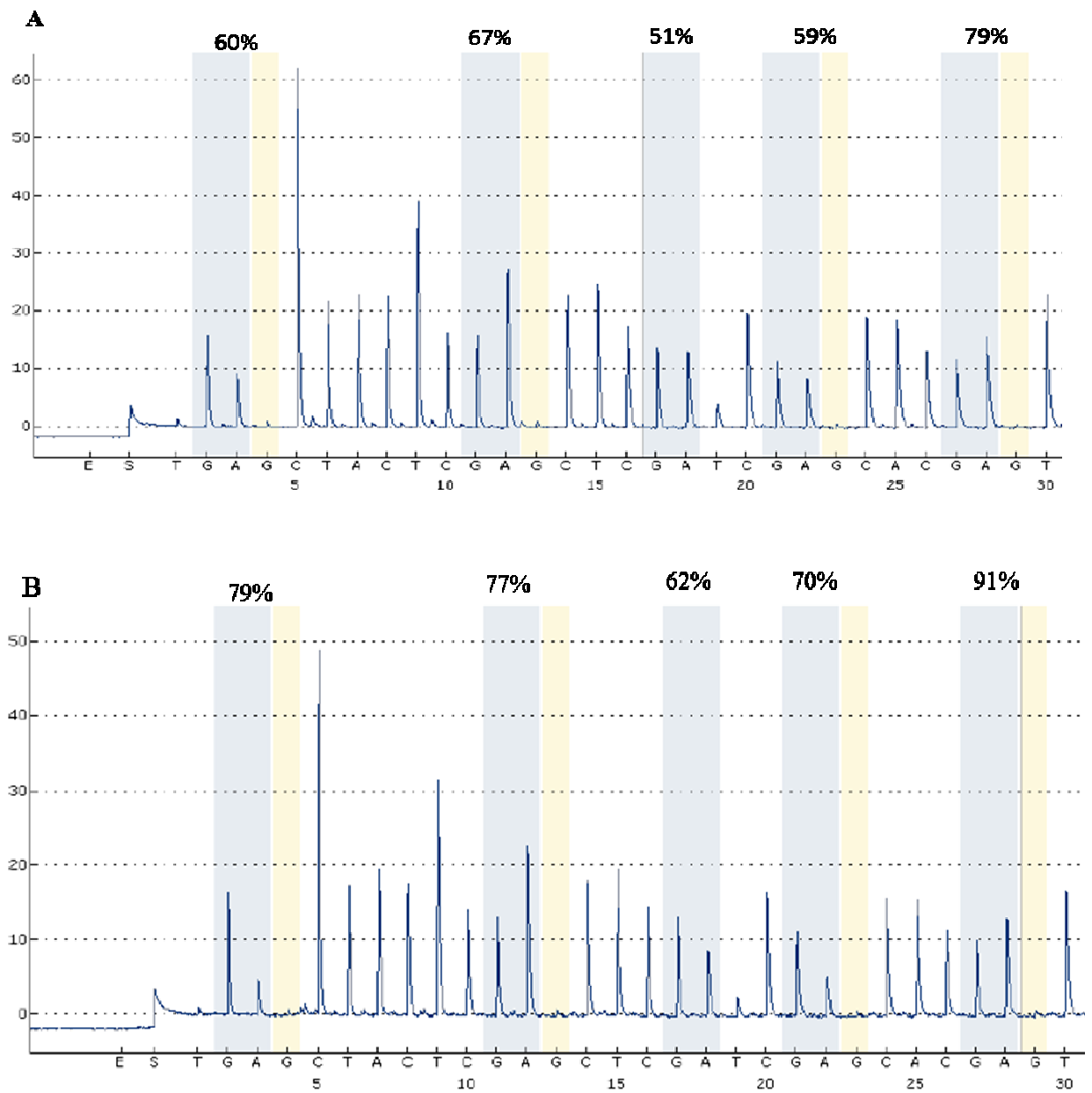


Figura 4.24: Sítios CpGs analisados em LINE-1 por pirosequenciamento. Imagem do eletroferograma com a porcentagem de metilação observada em cada sítio. Em (A) amostra de um paciente e em (B) amostra de um doador pediátrico saudável.

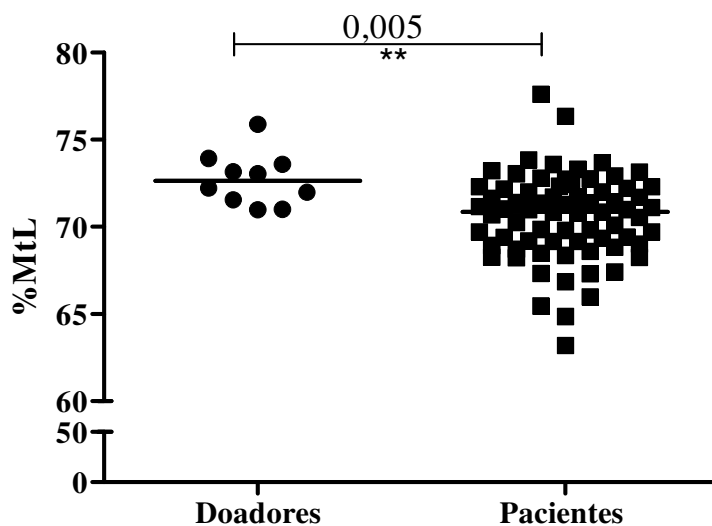


Figura 4.25: Comparação do nível de metilação global entre pacientes pediátricos com SMD primária e doadores saudáveis. Gráfico de pontos mostrando os níveis de metilação em LINE-1 observados nos doadores e nos pacientes pediátricos com SMD. ($p=0,005$).

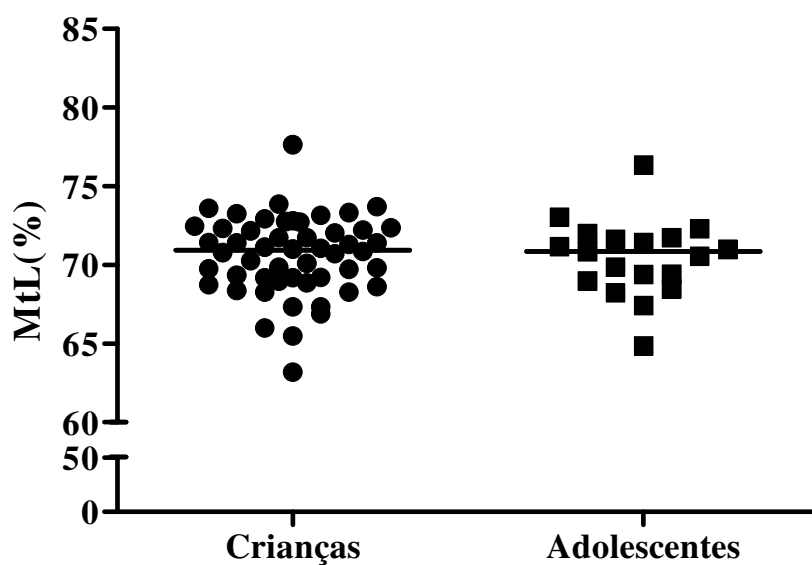


Figura 4.26: Comparação do nível de metilação global entre a faixa etária da infância e os adolescentes. Gráfico de pontos mostrando a porcentagem de metilação observada em LINE-1 nos pacientes pediátricos das duas faixas etárias (≤ 12 anos considerados crianças e > 12 anos considerados adolescentes)

4.11 Análise de Comparação entre o Nível de Metilação Global com o Subtipo, o Cariótipo e à Evolução da doença

Do total de pacientes analisados para a metilação global, 65% (46/71) foram classificados no subtipo CRI e 35% (25/71) AREB/AREB-t. O perfil de metilação em LINE-1 entre os subtipos CRI e AREB/AREB-t (mediana 70,78% MtL vs 71,00% MtL) não mostrou diferença estatística. Contudo, ambos os subtipos CRI e AREB/AREB-t estavam hipometilados em relação ao grupo controle (p= 0,01; p=0,005 respectivamente) (Figura 4.27).

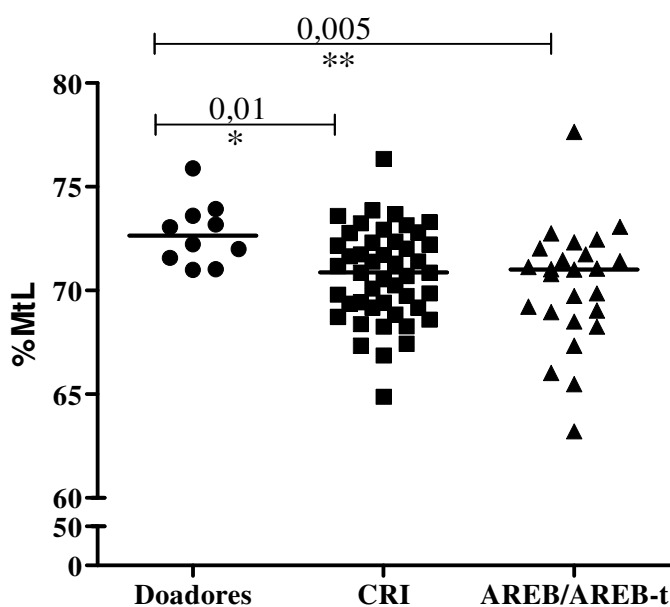


Figura 4.27: Comparação do nível de metilação global entre os subtipos da SMD pediátrica. Gráfico de pontos mostrando a porcentagem de metilação em LINE-1 para os pacientes em fase inicial da SMD (CRI) e nas fases mais avançadas (ARE/AREB-t) em relação aos doadores.

Ao analisarmos a citogenética dos pacientes e o perfil de metilação em LINE-1 verificamos que os pacientes que apresentam cariótipo normal (31/71) e os que apresentam cariótipo anormal (40/71) não apresentaram diferença estatística (mediana 71,30% MtL vs 70,75% MtL). Ao compararmos o perfil de metilação verificamos que os pacientes com cariótipo normal e anormal apresentaram menor nível de metilação em relação aos doadores (p=0,02; p=0,004 respectivamente) (Figura 4.28).

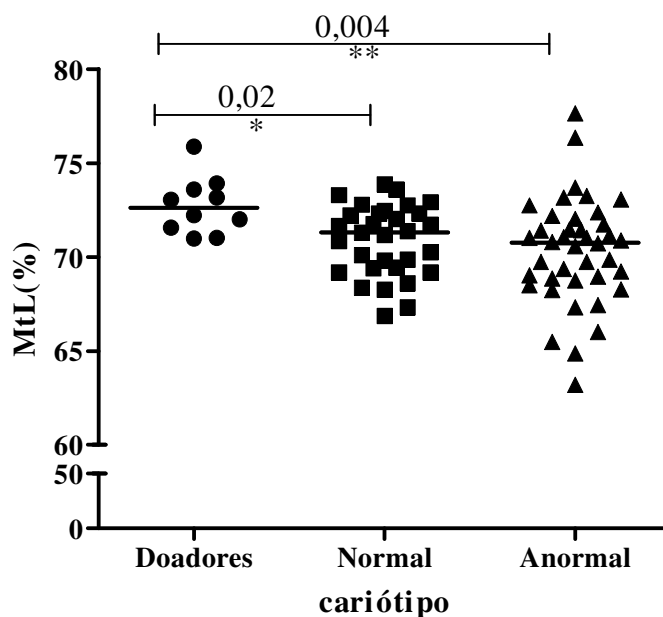


Figura 4.28: Análise comparativa do nível de metilação em LINE-1 segundo o cariótipo dos pacientes pediátricos com SMD.

Ao analisarmos o perfil de metilação global com alterações cromossômicas específicas verificamos uma heterogeneidade no perfil de metilação entre elas. Observamos que todas as alterações citogenéticas apresentavam menor nível de metilação que o cariótipo normal e que os doadores. Para as alterações com, no mínimo, três pacientes foi possível calcular a diferença entre a alteração específica e os doadores. Pacientes com alterações envolvendo o cromossomo 6 ($p=0,002$), 9 ($p=0,007$) e cariótipo complexo ($p=0,007$) apresentaram hipometilação em comparação com os doadores (Figura 4.29), enquanto o cariótipo com $del(11q)(23)$ não apresentou diferença estatística em relação aos doadores (mediana 71,38% MtL).

As alterações envolvendo o cromossomo 7 [$del(7q)$ e -7] foram as mais frequentes (12/40), mas não apresentaram diferença no nível de metilação global em relação aos doadores (mediana 71,23% MtL). Dentro desse grupo, há uma heterogeneidade na distribuição do nível de metilação global maior que nos demais grupos citogenéticos. Dois pacientes que apresentaram nível de metilação global maior que os doadores (77,64%; 76,35% MtL) possuíam -7 associada com outras alterações citogenéticas ($del X(q23)$ e $+20$). Analisando os pacientes com alteração citogenética envolvendo somente o cromossomo 7 foi possível verificar a presença de hipometilação em relação aos doadores ($p=0,02$).

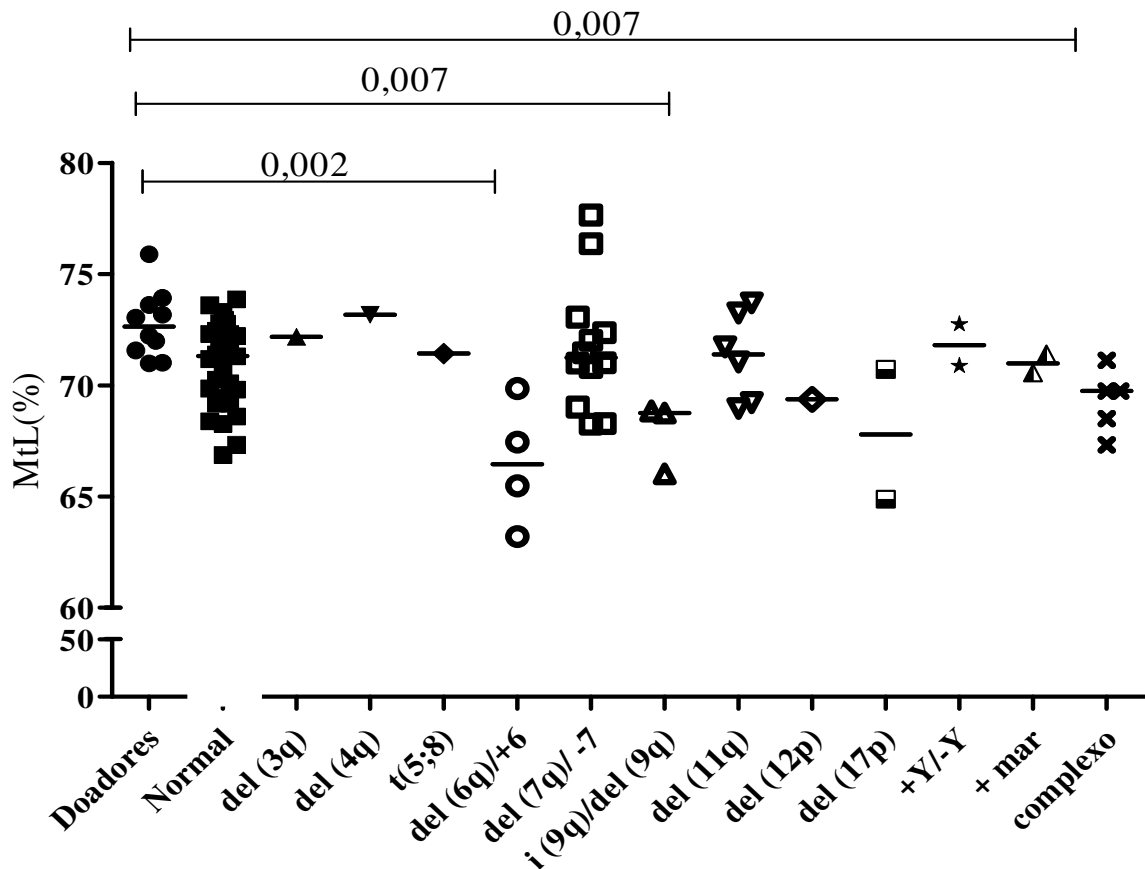


Figura 4.29: Distribuição do nível de metilação global segundo alterações cromossômicas específicas. Gráfico mostrando o perfil de metilação em LINE-1 segundo as alterações citogenéticas.

Dos 71 pacientes estudados, 35% (25/71) apresentaram evolução da SMD para LMA. Os pacientes que evoluíram na SMD apresentaram metilação em LINE-1 (mediana 70,79% MtL) semelhante aos pacientes que não evoluíram (mediana 71,01%MtL). Ao compararmos esses dois grupos com os doadores observamos que ambos apresentam uma diminuição do nível de metilação, sendo esse resultado estatisticamente significativo para aqueles que não apresentaram evolução da doença ($p=0,01$) e para aqueles que apresentaram evolução de SMD para LMA ($p=0,002$) (Figura 4.30).

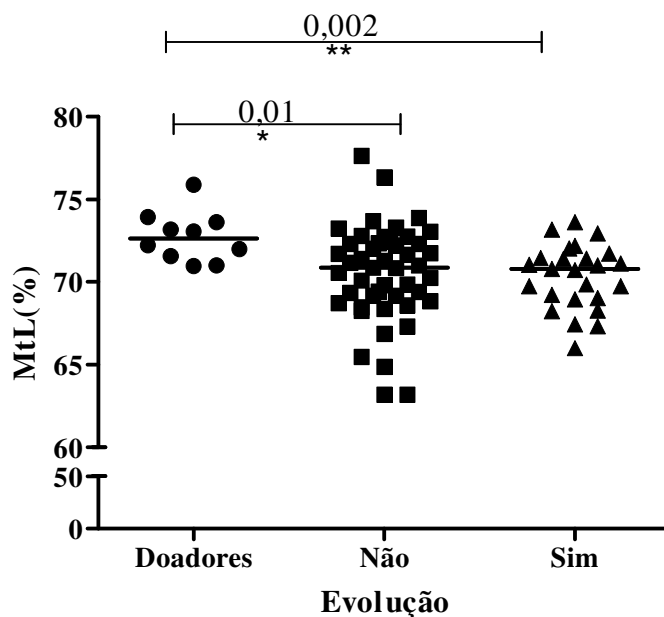


Figura 4.30: A hipometilação em LINE-1 e a evolução da SMD. Pacientes que evoluíram e que não evoluíram tiveram nível de metilação semelhante, no entanto ambos estavam hipometilados em relação aos doadores.

4.12 Análise da Metilação Global versus Prognóstico Citogenético segundo IPSS e o IPSS-R

Ao separarmos os pacientes segundo o prognóstico citogenético pelo IPSS, verificamos que os 33 pacientes que pertenciam ao grupo de bom prognóstico (mediana 71,3% MtL), 21 ao intermediário (mediana 69,85% MtL) e 17 ao ruim (mediana 71% MtL) apresentavam nível de metilação diminuído em LINE-1 em comparação com os doadores ($p=0,02$; $p=0,003$; $p=0,03$ respectivamente) (Figura 4.31).

Quando separamos os pacientes segundo o prognóstico citogenético pelo IPSS-R, verificamos que os oito pacientes pertenciam ao grupo de muito bom prognóstico (mediana 71,38% MtL), 31 ao grupo de bom prognóstico (mediana 71,30% MtL), 16 ao intermediário (mediana 69,6% MtL), 11 de prognóstico desfavorável (mediana 71,45% MtL) e cinco ao grupo de prognóstico muito desfavorável (mediana 69,73% MtL). Os grupos de bom prognóstico, intermediário e muito desfavorável apresentavam nível de metilação diminuído em LINE-1 em comparação com os doadores ($p=0,02$; $p=0,001$; $p=0,003$ respectivamente) (Figura 4.32). Já os pacientes pertencentes aos grupos de muito bom prognóstico e prognóstico desfavorável não apresentaram diferença estatística em relação aos doadores.

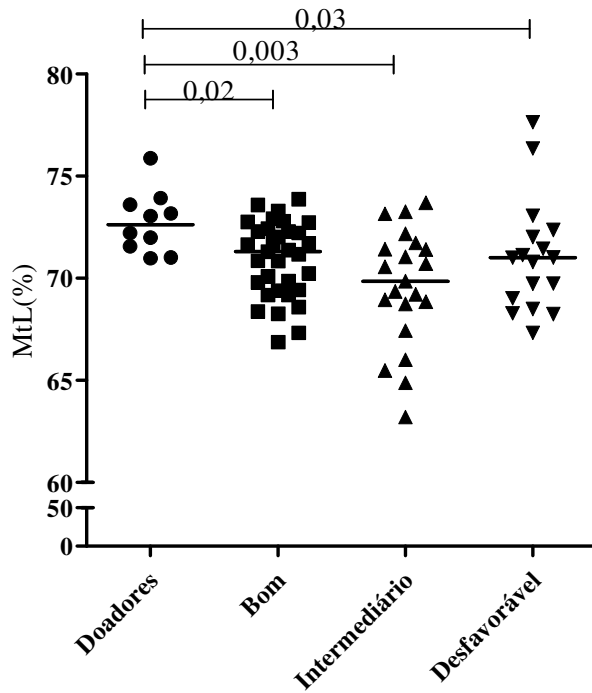


Figura 4.31: Metilação Global segundo o risco citogenético pelo IPSS. Os três grupos de risco citogenético estavam hipometilados em relação aos doadores saudáveis.

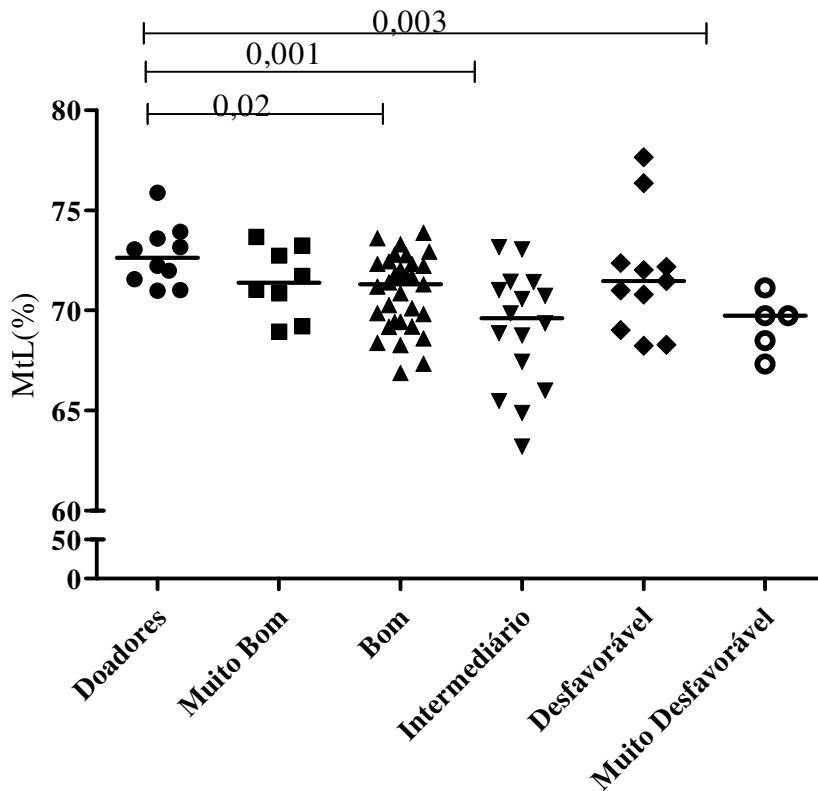


Figura 4.32: Metilação Global segundo o risco citogenético pelo IPSS-R. Os grupos de prognóstico bom, intermediário e muito desfavorável apresentaram diminuição significativa em relação aos doadores.

5. DISCUSSÃO

A síndrome mielodisplásica é uma doença clonal de origem na célula tronco hematopoética considerada rara na infância, representando menos de 5% de todas as neoplasias hematológicas na faixa etária pediátrica em contraste com alta incidência observada em indivíduos acima de 60 anos (HASLE, 2016; GALAVERNA *et al.*, 2018).

A patogênese da SMD pediátrica continua sendo pouco compreendida, principalmente os eventos que levam ao desenvolvimento e progressão da SMD pediátrica primária para LMA. No entanto, já se sabe que os pacientes pediátricos apresentam características morfológicas, citogenéticas, fatores prognósticos, alterações genéticas/ epigenéticas e resposta ao tratamento que diferem dos pacientes adultos (HASLE *et al.*, 2003; HOFMANN *et al.*, 2015; HASLE, 2016; SCHWARTZ *et al.*, 2017).

Nesse sentido, o presente estudo foi realizado somente em pacientes pediátricos com SMD primária buscando compreender as alterações citogenéticas e epigenéticas envolvidas na patogênese da SMD e a transformação leucêmica neste grupo de pacientes. A análise citogenética foi realizada em 152 pacientes com distribuição similar entre os sexos e a idade média ao diagnóstico de 8,5 anos. Houve uma predominância de pacientes da faixa etária da infância (66%) em relação a dos adolescentes.

Pastor e colaboradores em 2016, em seu estudo com 50 pacientes com SMD pediátrica primária observaram uma idade média de 9 anos e também não observaram uma predominância entre os sexos (PASTOR *et al.*, 2016). Enquanto estudos de revisão que englobam toda a SMD pediátrica vêm apontando uma idade média ao diagnóstico um pouco menor, em torno de 6,8 anos (GLAUBACH *et al.*, 2014; HOFMANN *et al.*, 2015).

O subtipo mais frequente em nosso estudo foi o CRI com 66% dos pacientes, seguido pelos subtipos AREB com 18% e AREB-t, 16%, o que foi condizente com o descrito na literatura (HASLE, 2016). Contudo, visto que o nosso grupo vem estudando a SMD pediátrica há mais de 20 anos, estamos observando uma diminuição na frequência dos subtipos mais avançados em nossa coorte. Acreditamos que este viés esteja ocorrendo devido ao uso da classificação da OMS para os pacientes pediátricos ou mesmo pela dificuldade na diferenciação dos subtipos mais avançados em relação à LMA pediátrica. Neste sentido, o retorno da discussão sobre o cuidado na classificação

da SMD pediátrica proposto por Hasle em 2016 mostrou a necessidade de se manter o subtipo AREB e AREB-t, visto que a porcentagem de blastos sozinha não é suficiente para separar uma AREB-t de uma LMA, sendo necessários a citogenética e o acompanhamento da evolução (HASLE, 2016).

A citogenética é essencial para o estabelecimento do diagnóstico e prognóstico na SMD, auxilia na indicação do tratamento ou mesmo para identificar a evolução clonal como sinal de progressão da SMD (JABBOUR *et al.*, 2013; DE SOUZA *et al.*, 2014; BACHER *et al.*, 2015). Em nosso estudo, a frequência de anormalidades cromossômicas esteve presente em 56% dos casos, estando de acordo com os estudos descritos na literatura (SASAKI *et al.*, 2001; HASLE *et al.*, 2003, HASLE, 2016).

A presença de alterações citogenéticas vem sendo correlacionada com os subtipos mais avançados da SMD (KARDOS *et al.* 2003; GALAVERNA *et al.*, 2018). Corroborando estes dados, em nosso estudo, cariótipos anormais foram observados, também em uma alta incidência nos pacientes com os subtipos AREB (71%) e AREB-t (96%) em comparação ao CRI (40%). Não identificamos uma alteração citogenética específica por subtipo da SMD, diferente do que é relatado para LMA e LLA pediátricas, em que é possível identificar um subtipo pela presença de uma alteração citogenética específica (ARBER *et al.*, 2003).

As alterações citogenéticas mais frequentes neste estudo foram as que envolveram o cromossomo 7 (-7/7q), presente em 26,5% dos pacientes com alteração citogenética; seguida pela del(11)(q23) em 13% , cariótipo complexo em 8,4% e +8 em 7,2%, corroborando com a literatura que vem relatando que para os pacientes pediátricos a perda parcial ou total cromossômica mais comum é no cromossomo 7 e o ganho mais frequente é a +8 (PANANI & ROUSSOS, 2006; BACHER *et al.*, 2015; SCHWARTZ *et al.*, 2017).

Sasaki e colaboradores (2001) observaram uma frequência 42% (14/33) de -7/7q e de 18% (6/33) da +8 nos pacientes com SMD primária pediátrica que apresentaram alteração citogenética (SASAKI, *et al.*, 2001). Schwartz e colaboradores (2017) verificaram a -7/7q em 19,41%, seguido pela +8 em 10% dos 46 pacientes pediátricos estudados. Também relatam que alterações citogenéticas como a del(5q) (5%) e a +21 (3,4%) foram achados infrequentes, assim como em nosso estudo, em que estiveram presentes em 6% e 1% dos pacientes com alterações citogenéticas, respectivamente.

A monossomia do cromossomo 7 é a anormalidade cromossômica de maior incidência nos pacientes pediátricos com SMD, ocorrendo em aproximadamente 30% dos casos (KARDOS *et al.*, 2003; HASLE *et al.*, 2007; RAU *et al.*, 2012; GLAUBACH *et al.*, 2014, HASLE, 2016). Observamos a -7 em 20% (17/83) dos pacientes com alterações citogenéticas. Desses pacientes, dez apresentaram os subtipos mais avanços da SMD ao diagnóstico e nove apresentaram evolução da SMD para LMA.

No cromossomo 7 estão localizados diversos genes com funções essenciais para o bom funcionamento do ciclo celular, sendo considerados supressores de tumor. Os genes mais importantes atuam como: modulador da atividade de *WNT* (*SFRP4*), remodelamento da cromatina (*IKZF1*), proliferação celular (*SAMD9/9L*), controle transcricional (*ETV6*), metilação de histonas (*EZH2*) (WLODARSKI *et al.*, 2018).

Tradicionalmente, a -7 confere um alto risco de progressão clonal, sendo considerada pelo IPSS e IPSS-R como de mau prognóstico. Deste modo, a presença dessa alteração é suficiente para a indicação ao TCTH nos pacientes pediátricos (GREENBERG *et al.*, 1997; GREENBERG *et al.*, 2012).

Contudo, em alguns estudos, foi relatado que a monossomia do cromossomo 7 apresenta um valor prognóstico neutro para pacientes pediátricos (HASLE & NIEMEYER, 2011). Wu e colaboradores recentemente em um estudo de meta análise verificaram que a -7 isolada não tem impacto na sobrevida global na SMD, sendo a evolução da SMD reflexo da heterogeneidade da doença (WU YC., *et al.* 2019). Entretanto, com o advento das novas técnicas de sequenciamento, alguns autores têm demonstrado que pacientes com alterações citogenéticas no cromossomo 7 possuem grandes chances de apresentarem outras mutações associadas como em *ETV6*, *GATA2*, *CEBPA*, *SAMD9/9L*, *RAS/MAPK* o que confere um pior prognóstico (HONDA *et al.*, 2015; WLODARSKI *et al.*, 2018).

A deleção do braço longo do cromossomo 11 na região q23 foi a segunda alteração mais frequente em nosso estudo, sendo observada uma alta taxa de evolução (64%) nos pacientes que apresentavam essa alteração citogenética. Na literatura, a del(11)(q23) não é descrita como uma alteração frequente na SMD pediátrica, tendo sua frequência relatada normalmente associada a outras alterações citogenéticas (SASAKI *et al.*, 2001; HASLE, 2016; SCHWARTZ *et al.*, 2017). Além disso, o valor prognóstico dessa alteração citogenética em nosso estudo diferiu do proposto pelo IPSS-R, que a considera de muito bom prognóstico (GREENBERG *et al.*, 2012). Sendo mais de

acordo com o prognóstico intermediário da classificação do IPSS (GREENBERG *et al.*, 1997).

Nesta região cromossômica está localizado o gene *KMT2A* (também conhecido como *MLL*), que codifica uma proteína envolvida no remodelamento da cromatina e regula positivamente fatores transcricionais, sendo também associada com o desenvolvimento de leucemias agudas da infância (WINTERS & BERNT, 2017; MEYER *et al.*, 2018). Geralmente, esse gene está associado com alterações cromossômicas do tipo translocação, conferindo mau prognóstico (DOU & HESS, 2008; WINTERS & BERNT, 2017; PETERSON *et al.*, 2018).

O cariótipo complexo é definido por três ou mais anormalidades cromossômicas independentes, possui um prognóstico independente, geralmente, associado com propensão à transformação leucêmica (REN *et al.*, 2018). Neste estudo, os cariótipos complexos foram o terceiro padrão citogenético mais comumente observado (8,4%). Recentemente, Moriwaki e colaboradores observaram 12% de cariótipos complexos, que estiveram presentes desde o subtipo mais inicial da SMD primária em um grupo pediátrico japonês (MORIWAKI *et al.*, 2014). Do mesmo modo, observamos a distribuição de cariótipo complexo nos três subtipos da SMD pediátrica, estando associado com a transformação leucêmica. Um estudo com crianças com SMD em estágios avançados da doença mostrou que os cariótipos complexos estão fortemente associados com um pior prognóstico e menor sobrevida (GÖHRING *et al.*, 2010).

Assim como na literatura, a trissomia do cromossomo 8 (+8) foi a alteração cromossômica de ganho numérico mais comum na SMD (MORIWAKI *et al.*, 2014; SAUMELL, *et al.*, 2015). Em nosso estudo, ocorreu de forma isolada ou acompanhada de outra alteração citogenética, mas em ambos os casos esteve associada aos subtipos mais avançados, transformação leucêmica e a um pior prognóstico. Ainda não há trabalhos mostrando o valor prognóstico da +8 isolada em pacientes pediátricos com SMD.

De acordo com o IPSS e com IPSS-R, os pacientes apresentando a +8 isolada são classificados no grupo de risco citogenético intermediário (GARCIA-MANEIRO, 2012; GREENBERG *et al.*, 2012). Contudo, mesmo para os pacientes adultos, o valor prognóstico da +8 continua contraditório visto que alguns trabalhos demonstraram que a +8 e a amplificação de *c-MYC* estão correlacionadas com a progressão da doença e a diminuição da sobrevida (MEYER & PENN, 2008; ANGELOVA *et al.*, 2015).

A análise do cariótipo normalmente mostra um clone anormal, no entanto, pode identificar clones citogeneticamente relacionados, que às vezes coexistem em uma amostra ou podem aparecer durante o curso clínico mostrando uma evolução clonal. Em casos raros, ocorre a presença de alteração cromossômica biclonal, ou seja, clones citogeneticamente não relacionados são detectados no diagnóstico ou em diferentes momentos no curso da doença (HAN *et al.*, 2006; KASAHARA *et al.*, 2016). Em nosso estudo, identificamos três pacientes com alteração biclonal ao diagnóstico, representando 3,6% dos casos de cariótipos anormais, numa frequência de 1,9% (3/152). O primeiro caso observado foi de uma alteração biclonal envolvendo os cromossomos 11 e 17 que resultou em relato de caso publicado pelo nosso grupo em 2007 (RODRIGUES *et al.*, 2007). No segundo caso, a alteração biclonal envolvia a -7 e del(7q) e o terceiro paciente apresentava um clone com +8 e o outro clone com +22.

A presença de alterações cromossômicas biclonais é um achado incomum em neoplasias hematológicas, na SMD têm sido descritos numa frequência de 4,3 a 6,5% (HAN *et al.*, 2002; HAN *et al.*, 2006). As alterações biclonais mais descritas envolvem as alterações: del(5q), +8, del(20q), del(7q), +11, +21 e -22 (HAN *et al.*, 2006). Ainda não há estudos mostrando a frequência e o valor prognóstico dessas alterações biclonais na SMD primária pediátrica. Han e colaboradores em 2006 relataram 11 pacientes de 206 com alteração biclonal na SMD, sendo que desses apenas dois eram pacientes pediátricos (HAN *et al.*, 2006).

Em nosso estudo, cariótipos com evolução citogenética foram observados em 6% dos pacientes pediátricos com SMD primária já ao diagnóstico, não apresentando uma alteração cromossômica específica. A maioria desses pacientes foram classificados com os subtipos mais avançados da SMD e apresentaram evolução para LMA. Na SMD, estudos mostraram uma incidência de 17-29% de evolução clonal em pacientes adultos, estando associada com transformação para LMA e sobrevida diminuída (BERNASCONI *et al.*, 2010; JABBOUR *et al.*, 2013).

Os pacientes com SMD apresentam um prognóstico muito heterogêneo, o que dificulta em muitos casos a escolha de tratamento. Assim, a fim de auxiliar na estratificação de grupos de risco e na escolha da melhor conduta terapêutica, foi desenvolvido o IPSS que anos mais tarde passou por uma revisão dando origem ao IPSS-R (GREENBERG *et al.*, 1997; GARCIA-MANEIRO, 2012; GREENBERG *et al.*, 2012). Ao aplicarmos o IPSS e IPSS-R nos nossos pacientes segundo o risco citogenético, verificamos que o IPSS apresentou uma distribuição mais de acordo com a

evolução da doença, pois em nosso estudo os pacientes que apresentaram a del(11)(q23) apresentaram evolução para LMA, o que fez com que a porcentagem de evolução observada no grupo de muito bom prognóstico fosse maior que o grupo de prognóstico desfavorável.

O IPSS-R, segundo alguns autores, é um dos modelos padrão-ouro para estratificação de risco e prognóstico para pacientes com SMD (GREENBERG *et al.*, 2017). No entanto, Benton e colaboradores recentemente relataram que o prognóstico de pacientes com SMD de risco intermediário pelo IPSS-R apresenta resultados variáveis e que há necessidade de modelos além do IPSS-R e que futuramente devem incluir dados genômicos (BENTON *et al.*, 2018).

Algumas alterações moleculares podem causar uma instabilidade genômica, promovendo a aquisição de lesões genéticas e citogenéticas subsequentes. A aquisição sequencial dessas alterações permite, durante a progressão da doença, o desenvolvimento de múltiplos clones geneticamente relacionados (LINDSLEY & EBERT, 2013, SPERLING *et al.*, 2016). Devido à heterogeneidade da SMD, é provável que existam diferentes mecanismos de iniciação e a progressão da doença (HASLE, 2016).

Uma elevada frequência de mutações nos pacientes adultos com SMD tem sido demonstrada nos últimos anos, e sabe-se que estes podem apresentar uma ou mais mutações dentro um número limitado de genes (PAPAEMMANUIL, *et al.*, 2013; HAFERLACH *et al.*, 2014; ARBER *et al.*, 2016). Os genes mais comumente mutados nesses pacientes são *SF3B1*, *TET2*, *SRSF2*, *ASXL1*, *DNMT3A*, *RUNX1*, *U2AF1*, *TP53* e *EZH2* (PAPAEMMANUIL, *et al.*, 2013; HAFERLACH *et al.*, 2014; ARBER *et al.*, 2016, GREENBERG, *et al.*, 2017). BEJAR e STEENSAMA observaram em seu estudo que aproximadamente 45% das mutações observadas em pacientes adultos são em genes reguladores epigenéticos (BEJAR & STEENSAMA, 2014).

A SMD é considerada um modelo ideal de estudo das alterações epigenéticas (ISSA, 2013). Contudo, o conhecimento sobre a atuação dos mecanismos epigenéticos em pacientes pediátricos ainda são escassos. Alguns estudos de análise em larga escala de mutações têm considerado mutações nos genes reguladores epigenéticos como raras (PASTOR *et al.*, 2016; SCHWARTZ *et al.*, 2017). No entanto, é possível que as alterações epigenéticas detectadas a partir da desregulação desses genes possam ser resultantes de alterações transcricionais que envolvam principalmente componentes da maquinaria de metilação e desmetilação do DNA.

Mizuno e colaboradores sugeriram que o aumento da expressão das *DNMTs*, tanto as de *novο* quanto a de manutenção, pode contribuir para o desenvolvimento de leucemia por induzir a hipermetilação aberrante de regiões importantes no genoma (MIZUNO *et al.*, 2001). Até o momento, não existem estudos que relatem o perfil de expressão das *DNMTs* na SMD pediátrica, e apenas um estudo avaliou a expressão de *TET2* em pacientes pediátricos (COUTINHO *et al.*, 2015).

Além disso, embora a família APOBEC seja um potencial componente no mecanismo de desmetilação (BRANCO *et al.*, 2012; FU *et al.*, 2015) e a *APOBEC3B* tenha sido descrita como um agente mutagênico ativo durante o desenvolvimento e progressão do câncer (BURNS *et al.*, 2013), nenhum estudo envolvendo a família APOBEC foi realizado em SMD.

Em nosso estudo, analisamos o perfil de expressão dos principais componentes da maquinaria de metilação e desmetilação do DNA em pacientes pediátricos com SMD primária. Observamos uma superexpressão para os genes *DNMT1*, *DNMT3A* e *DNMT3B* e os níveis de expressão destes genes mostraram uma correlação positiva em nossos pacientes, sugerindo que *DNMTs* são de alguma forma correguladas e contribuem para o desenvolvimento da SMD pediátrica. A superexpressão das *DNMTs* na SMD já havia sido demonstrada previamente em pacientes adultos (AOKI *et al.*, 2003; LÄNGER *et al.*, 2005). Aoki e colaboradores (2003) mostraram um aumento de expressão significativo de *DNMT1* e *DNMT3B*, enquanto Länger e colaboradores (2005) observaram a superexpressão de *DNMT1* e *DNMT3A* (AOKI *et al.*, 2003; LÄNGER *et al.*, 2005).

As *DNMTs* são expressas constitutivamente na hematopoese normal e sua atuação é essencial para este processo, bem como no processo de diferenciação de células sanguíneas (MIZUNO *et al.* 2001; HOPFER *et al.* 2009). A *DNMT1* demonstrou ser importante para a auto renovação das células tronco-hematopoéticas e alterações em *DNMT1* levam a defeitos na auto renovação, retenção de nicho de medula óssea e a capacidade de gerar linhagens de sangue apropriadas (TROWBRIDGE *et al.*, 2009; BENETATOS & VARTHOLOMATOS, 2016). Esta enzima atua principalmente na diferenciação trombopoética e eritropoética e sua superexpressão já foi associada à metilação aberrante em genes supressores de tumor (BRÖSKE *et al.*, 2009).

A *DNMT3A* controla o equilíbrio entre a auto renovação e a diferenciação na hematopoese normal (TROWBRIDGE *et al.*, 2009), e alterações nessa enzima resultam

em expansão da células tronco-hematopoéticas, prejudicando a diferenciação e parecem estar associadas aos subtipos de SMD mais avançados (HOPFER *et al.*, 2009; ZHANG & Xu 2017). Em conjunto, a *DNMT3A* e a *DNMT3B* desempenham um papel na repressão epigenética de redes de genes de células-tronco durante a diferenciação de células tronco-hematopoéticas (CHALLEN *et al.*, 2001; CHALLEN *et al.*, 2014). Durante a hematopoese normal, a *DNMT3B* apresenta menor expressão do que a *DNMT1* e a *DNMT3A*. Além disso, sua expressão é especialmente baixa nas populações de células mielóides e eritróides (MIZUNO *et al.* 2001). Recentemente, a *DNMT3B* foi descrita como um regulador central da transcrição do genoma da LMA pediátrica (LAMBA *et al.*, 2018).

A expressão aberrante da *DNMT1* foi observada durante os estágios mais iniciais da SMD nos pacientes adultos (LÄNGER *et al.*, 2005), enquanto a expressão da *DNMT3A* e *DNMT3B* foi mais pronunciada no estágio avançado (HOPFER *et al.*, 2009). Em nosso estudo, pacientes com CRI apresentaram superexpressão da *DNMT1* e esse padrão foi mantido durante a evolução da doença. Por outro lado, a superexpressão de *DNMT3A* e *DNMT3B* foi observada principalmente nos estágios mais avançados da doença. Em conjunto, esses resultados em pacientes adultos e nossos resultados em pacientes pediátricos sugerem que a expressão aberrante das *DNMTs* desempenha um papel importante no desenvolvimento e progressão da SMD.

Alterações nas *DNMTs* também causam desequilíbrios no DNA e/ou modificações nas histonas, que podem levar ao remodelamento da cromatina, instabilidade genômica e conseqüentemente alterações no padrão de expressão gênica (ZHANG & XU 2017). Na SMD pediátrica, a maioria dos pacientes com SMD apresentam cariótipos normais (HOFMANN *et al.*, 2015). No entanto, alguns desses pacientes manifestarão rápida evolução da doença, sugerindo a contribuição de alterações moleculares (BEJAR & STEENSMA 2014). De acordo com nossos resultados, pacientes com cariótipos normais mostraram superexpressão da *DNMT1* e *DNMT3B*, enquanto a expressão de *DNMT3A* foi maior em pacientes com cariótipos anormais. Também observamos a superexpressão de todas as *DNMTs* em casos que mostraram progressão da doença, sugerindo que a expressão aberrante dessas enzimas na SMD pediátrica seja determinante para o aumento da gravidade da doença.

Os níveis de expressão de *TET2* foram maiores nos pacientes com cariótipos anormais em comparação a pacientes com cariótipos normais. No entanto, a expressão

de *APOBEC3B* mostrou a tendência oposta em relação aos cariótipos. Observamos também níveis mais baixos de expressão de *TET2* em pacientes com evolução da doença, enquanto a *APOBEC3B* mostrou aumento dos níveis de expressão.

A ação das TETs é crucial para a manutenção da metilação normal do DNA durante o desenvolvimento e a tumorigênese (SCOPIM-RIBEIRO *et al.*, 2016). Foi demonstrado que *TET2* regula a diferenciação mieloide e a expansão celular clonal durante a hematopoiese (KUNIMOTO & NAKAJIMA 2017). Sua expressão diminuída foi previamente relatada em pacientes com SMD / LMA e também foi associada com prognóstico desfavorável (COUTINHO *et al.*, 2015; SCOPIM-RIBEIRO *et al.*, 2015; ZHANG *et al.*, 2015; SCOPIM-RIBEIRO *et al.*, 2016). Zhang e colaboradores (2015) mostraram aumento da expressão de *TET2* em pacientes com subtipos iniciais de SMD em comparação com os subtipos mais avançados (ZHANG *et al.*, 2015). Sendo estes resultados em pacientes adultos, semelhantes aos nossos. Por outro lado, Coutinho e colaboradores (2015) observaram uma expressão menor de *TET2* nos pacientes pediátricos ao comparar com os controles, contudo neste estudo foram avaliados apenas doze pacientes com CRI (COUTINHO *et al.*, 2015).

Além de seu potencial papel na desmetilação do DNA, a *APOBEC3B* também tem se mostrado uma importante fonte de mutações no câncer humano (BURNS *et al.*, 2013). Por meio de sua atividade de desaminação, a *APOBEC3B* pode induzir transições de C para T e de C para G, deixando marcas específicas no DNA do tumor. Embora esta assinatura mutacional mediada por *APOBEC* tenha sido relatada em vários tumores sólidos, ela ainda é pouco explorada no contexto de malignidades hematológicas (BURNS *et al.*, 2013; FU *et al.*, 2015; ZOU *et al.*, 2017). Recentemente, um estudo com pacientes pediátricos com SMD mostrou as substituições de C para T são as mutações mais frequentes (SCHWARTZ *et al.*, 2017). É interessante notar que, de acordo com nossos resultados, a *APOBEC3B* estava superexpressa em pacientes com cariótipos normais, sugerindo que a *APOBEC3B* pode contribuir para a instabilidade genômica durante a patogênese da SMD.

Nós também investigamos se a expressão das *DNMTs*, *TET2* e *APOBEC3B* estavam correlacionadas. *TET2* apresentou expressão independente em relação à *APOBEC3B* e às *DNMTs*, enquanto os níveis de *APOBEC3B*, *DNMT3A* e *DNMT3B* foram correlacionados.

Este desequilíbrio na expressão dos genes da maquinaria de metilação e desmetilação podem ter consequências como as alterações no padrão de metilação observadas na SMD e na progressão para LMA, uma vez que a metilação do DNA é essencial para o destino das células-tronco hematopoéticas (BRÖSKE *et al.*, 2009). Dentre as alterações no padrão de metilação do DNA já identificadas na SMD, principalmente a hipermetilação em regiões promotoras de genes envolvidos na regulação do ciclo celular parece estar envolvida em sua patogênese (ISSA, 2013; SANTINI *et al.*, 2013; ZHAO, *et al.*, 2014).

Nos pacientes pediátricos existem poucos estudos mostrando a presença de metilação em SMD primária (HASEGAWA *et al.*, 2005; VIDAL *et al.*, 2007, RODRIGUES *et al.*, 2010, KIM *et al.*, 2013). Um dos genes mais estudados principalmente nos pacientes adultos é o gene $p15^{INK4B}$ (*CDKN2B*) (ISSA, 2010). O gene $p15^{INK4B}$ desempenha um papel importante na regulação do comprometimento celular de células progenitoras hematopoéticas e na diferenciação de células mielóides (DE BRAEKELEER *et al.*, 2016).

O gene $p15^{INK4B}$ é um supressor tumoral, e sua perda de expressão afeta a diferenciação celular durante a hematopoese e está associada com alta taxa de proliferação celular (COTRAN *et al.*, 2000; WOLFF & BIES, 2013), demonstrando a importância de uma melhor compreensão do perfil de metilação em sua região promotora na SMD pediátrica primária.

A maioria dos estudos em SMD pediátrica que analisou o perfil de metilação em SMD pediátrica primária o fez em um número limitado de pacientes e, normalmente, essa análise foi realizada por reação em cadeia da polimerase específica de metilação (MSP) (HASEGAWA *et al.*, 2005; VIDAL *et al.*, 2007; RODRIGUES *et al.*, 2010). Com o desenvolvimento de novas técnicas de análise quantitativa de metilação, a aplicação de análises utilizando o MSP vêm sendo substituída devido à baixa sensibilidade da técnica e aos falsos positivos.

Hoje já se sabe que indivíduos saudáveis apresentam metilação em promotores gênicos associados ao câncer e que o desequilíbrio nessa metilação seja pela hipermetilação ou hipometilação, é que está associada ao desenvolvimento de doenças (JIN & LIU, 2018). Além disso, o nível de metilação para algumas regiões genômicas varia dependendo da idade, já tendo sido sugerido que as alterações epigenéticas, assim como o encurtamento dos telômeros, sejam um relógio para o envelhecimento

(HORVATH, 2013). Mesmo dentro de uma mesma doença, diferentes faixas etárias poderiam implicar em perfis diferentes de metilação (JUHL-CHRISTENSEN *et al.*, 2012; KIM *et al.*, 2013).

Assim, em nosso estudo verificamos o nível de metilação na região promotora do gene $p15^{INK4B}$ em 43 pacientes pediátricos com SMD primária pela técnica de pirosequenciamento. Esses pacientes apresentaram o nível de metilação (MtL) maior que os doadores. A metilação aberrante, ou seja, a hipermetilação em $p15^{INK4B}$ foi observada em 34% dos pacientes, sendo mais frequente nos subtipos mais avançados AREB e AREB-t (30% e 60%, respectivamente). Em estudo com a distribuição nos subtipos mais similar ao nosso, ou seja, maior número de pacientes com CRI, a frequência de hipermetilação foi de 28% e também associada aos subtipos mais avançados (KIM *et al.*, 2013).

Outros estudos relatam uma frequência de metilação aberrante em $p15^{INK4B}$ maior, como Vidal e colaboradores que observaram uma frequência de 50% (6/12) de metilação, sendo todos esses pacientes classificados dentro dos subtipos AREB e AREB-t (VIDAL *et al.*, 2007). Já Hasegawa e colaboradores (2005) descreveram que 78% dos pacientes com SMD pediátrica apresentam metilação anormal em $p15^{INK4B}$. Contudo, essa diferença pode estar associada ao perfil dos pacientes analisados, pois incluíram dois pacientes com LMMC e quatro pacientes com diagnóstico duvidoso, os quais os autores denominaram de AREB/M6 (HASEGAWA *et al.*, 2005).

Pacientes pediátricos com cariótipos anormais apresentaram MtL de $p15^{INK4B}$, significativamente maior que os doadores e que os pacientes com cariótipo normal ($p=0,03$ e $p=0,006$, respectivamente). Nossos resultados estão de acordo com o observado por Kim e colaboradores (KIM *et al.*, 2013). Além disso, verificamos uma forte associação entre a hipermetilação em $p15^{INK4B}$ e as alterações citogenéticas principalmente as que envolviam o cromossomo 7 (-7/7q-) ($p=0,003$). Em um estudo anterior do nosso grupo, também foi verificada a associação da presença de metilação no $p15^{INK4B}$ (por MSP) com alterações citogenéticas envolvendo o cromossomo 7 (RODRIGUES, 2014). Já na SMD secundária em pacientes adultos, Au e colaboradores (2003) também verificaram uma forte associação entre metilação do gene $p15^{INK4b}$ e alterações cromossômicas envolvendo o cromossomo 7 (-7/7q-) (AU *et al.*, 2003).

Durante este estudo, acompanhamos o aumento progressivo da MtL em $p15^{INK4B}$ em um paciente durante a evolução da SMD. Ao diagnóstico, esse paciente apresentava

hipermetilação (18,84% MtL), a -7 e menos de 5% de blastos, sendo classificado com CRI. Com a progressão da doença para AREB-t, houve o aumento de blastos e o aumento do MtL para 45,3%. Desta forma, acreditamos que, assim como na literatura, a metilação aberrante da região promotora $p15^{INK4B}$ e o seu silenciamento possui um papel importante na patogênese da SMD pediátrica (HASEGAWA *et al.*, 2005; VIDAL *et al.*, 2007; RODRIGUES *et al.*, 2010; KIM *et al.*, 2013). E que esteja mais associado à hipermetilação do que somente a presença de metilação como proposto na literatura (UCHIDA *et al.*, 1997; QUESNEL *et al.*, 1998; HASEGAWA *et al.*, 2005; VIDAL *et al.*, 2007; RODRIGUES *et al.*, 2010), mas sim o aumento dessa hipermetilação é que estaria associada à evolução e a um pior prognóstico da SMD (KIM *et al.*, 2013).

Acreditamos que devido à heterogeneidade da SMD, a hipermetilação pode estar presente cedo durante o desenvolvimento da doença em alguns pacientes de alto risco como observado em nosso relato de caso e por TIEN e colaboradores (TIEN *et al.*, 2001). Alguns autores até sugerem que o nível de metilação pode contribuir para a heterogeneidade da SMD (KIM *et al.*, 2010).

Alguns estudos têm sugerido que a hipermetilação em regiões promotoras de genes supressores de tumor possuem uma influência menor no desenvolvimento do câncer do que a hipometilação global (WOLFF *et al.*, 2010; HUR *et al.*, 2014). Uma boa maneira de se verificar o perfil de metilação global é através da análise de sequências repetitivas do DNA como LINE-1 (MIOUSSE & KOTURBASH, 2015).

LINE-1 em indivíduos saudáveis encontra-se fortemente metilada e durante a transformação neoplásica torna-se hipometilada em alguns tipos de câncer tanto em pacientes adultos como em pacientes pediátricos, sendo descrito como um bom marcador preditivo de prognóstico (SHIGAKI *et al.*, 2013; HUR *et al.*, 2014; BURNS, 2017; DE SÁ PEREIRA *et al.* 2017; YAMAMURA *et al.*, 2017; BABA *et al.*, 2018).

Deste modo, descrevemos pela primeira vez o perfil de metilação global em SMD pediátrica primária, através da quantificação de metilação presente em LINE-1 em 71 pacientes. Observamos uma diminuição significativa em relação aos doadores ($p=0,005$). A hipometilação em LINE-1 permite a retro-transposição, o que pode resultar na expressão gênica aberrante e na instabilidade genômica (MIOUSSE & KOTURBASH, 2015).

Em pacientes adultos com SMD, os resultados são controversos. Römermann e colaboradores (2008) verificaram um aumento na metilação em LINE-1 nos pacientes em relação aos controles. Este aumento foi verificado desde os subtipos mais iniciais da

SMD com cariótipo de bom prognóstico (RÖMERMANN *et al.*, 2008). Outros dois estudos posteriores determinaram a hipermetilação global como fator prognóstico desfavorável na SMD (POLINI *et al.*, 2013; CLAVO *et al.*, 2014). Em contraste com esses, mais recentemente Kim e colaboradores encontraram hipometilação em LINE-1 em células estromais e células hematopoéticas de pacientes com SMD e LMA (KIM *et al.*, 2015).

Nos pacientes pediátricos, observamos uma diminuição da metilação em LINE-1 mesmo em pacientes com estágio inicial (CRI), com cariótipo normal e que não apresentam evolução. Contudo, essa diminuição foi mais expressiva em relação aos doadores quando comparamos os pacientes com AREB/AREB-t, cariótipo alterado e os pacientes que apresentaram evolução para LMA. Sendo o oposto observado na maioria dos estudos em pacientes adultos com SMD (RÖMERMANN *et al.*, 2008; POLINI *et al.*, 2013; CLAVO *et al.*, 2014). Alguns autores têm sugerido que as alterações epigenéticas são mais permissivas nos pacientes pediátricos (SCHWARTZ *et al.*, 2017).

Essa aparente discrepância pode ter ocorrido devido à diferença na faixa etária dos pacientes. Estudos têm descrito um menor nível de metilação nos pacientes pediátricos em relação aos adultos (KIM *et al.*, 2013). Esse menor nível de metilação em relação à idade pode ser observado até mesmo em indivíduos saudáveis. Como demonstrado por Polini e colaboradores ao comparar o nível de metilação em uma região repetitiva do genoma chamada SAT2 em dois grupos controles; um com idade média de 17 anos e o outro com idade média de 79 anos (POLINI *et al.*, 2014).

A hipometilação global possui um papel crucial na instabilidade genômica/cromossômica, levando ao desenvolvimento e progressão de vários tipos de câncer (BAYLIN *et al.*, 2001). Em nosso estudo, observamos uma maior hipometilação em relação aos doadores nos pacientes com cariótipo anormal ($p=0,004$). Além disso, verificamos que a hipometilação em LINE-1 apresenta uma correlação significativa com IPSS e IPSS-R segundo o risco citogenético, tendo associação significativa para algumas alterações envolvendo cromossomos específicos, como 6 ($p=0,002$), 9 ($p=0,007$) e cariótipo complexo ($0,007$).

Dois pacientes em nosso estudo apresentando alteração envolvendo o cromossomo -7 e outra alteração citogenética apresentaram maiores níveis de metilação em LINE-1 que os doadores e os demais pacientes. Os outros 10 pacientes com -7/del(7q) estavam hipometilados em relação aos controles ($p=0,002$). Este resultado nos

mostra a heterogeneidade da SMD mesmo dentro de um grupo de prognóstico comum, mostrando a necessidade de mais estudos.

A patogênese da SMD é conhecida como um processo de múltiplas etapas, sendo um sistema biológico ideal para estudo por ser possível determinar as alterações que deram origem à doença e os mecanismos neoplásicos que levam à transformação leucêmica (GANGULY & KANDAM, 2016; CHEN *et al.*, 2019). Os modelos propostos, até o momento, se baseiam principalmente nas mutações gênicas observadas nos pacientes adultos (LINDSLEY & EBERT, 2013, SPERLING *et al.*, 2016; CHEN *et al.*, 2019), sendo sugerido que mutações afetariam uma célula progenitora hematopoética pluripotente levando ao surgimento de clones e subclones aberrantes. Assim, aquisições sequenciais dessas alterações também conhecido como modelo de evolução linear, permitem durante o curso da progressão da doença o desenvolvimento de múltiplos clones geneticamente relacionados (LINDSLEY & EBERT, 2013, SPERLING *et al.*, 2016).

Recentemente, Chen e colaboradores (2019) propuseram um modelo não linear denominado de modelo de evolução clonal paralela. Neste, a célula-tronco hematopoética adquire mutações diferentes paralelas durante o desenvolvimento e, ao longo da evolução para LMA um desses clones se torna majoritário. Os autores verificaram uma complexidade significativamente maior de mutações subclonais no estágio inicial da SMD em comparação com blastos presentes nas fases mais avançadas e na LMA secundária a SMD. Ainda revelaram o papel crucial de um conjunto diversificado de mutações que dão origem a subclones distintos ao nível de células-tronco hematopoéticas, e esses diferentes subclones contribuem para a geração de blastos na SMD e sua progressão para LMA (CHEN *et al.*, 2019).

No entanto, todo esse conhecimento foi gerado com base nas mutações observadas nos pacientes adultos e estão relacionadas principalmente com o envelhecimento (CHEN *et al.*, 2019). Estudos vêm mostrando que as mutações mais frequentes nos pacientes pediátricos são distintas daquelas observadas nos pacientes adultos (SCHWARTZ *et al.*, 2017).

Ainda não é conhecida a sequência de eventos que culminam com o desenvolvimento e evolução da SMD pediátrica. Assim, finalizamos nosso estudo sugerindo um modelo de desenvolvimento e evolução da SMD pediátrica primária com base nas alterações citogenéticas e epigenéticas observadas em nossos resultados (Figura 5.1).

A heterogeneidade dos fenótipos apresentados pelos pacientes pediátricos com SMD primária neste estudo pode ser resultante da diversidade de alterações epigenéticas e citogenéticas observadas nesses pacientes. Essas alterações podem ocorrer e atuar em várias combinações cooperantes ou não, e sugerimos, assim, como Chen e colaboradores em 2019, um modelo não linear.

Em nosso estudo, observamos um aumento de expressão de *DNMT1* e *DNMT3B* numa fase inicial, ou seja, em pacientes com CRI, menos de 5% de blastos e cariótipo normal. Alguns desses pacientes com cariótipo normal apresentam um aumento de expressão de *APOBEC3B* que é coordenado com a expressão de *DNMT3A* e *DNMT3B*. Conforme a doença vai progredindo, há também o aumento de expressão de *DNMT3A* e o aumento de *DNMT3B* se tornando significativo, estando associado aos pacientes com alterações citogenéticas e os subtipos AREB/AREB-t. Além disso, as *DNMTs* estão expressas coordenadamente e associadas à evolução.

A expressão de *TET2* não se mostrou alterada nos pacientes na fase inicial ou avançada, mas foi menor naqueles pacientes que evoluíram e sua expressão foi independente das *DNMTs* e *APOBEC3B*, sugerindo uma via independente de evolução.

Alterações no padrão de metilação como hipermetilação e hipometilação são eventos frequentes na SMD pediátrica, segundo nossos resultados. A hipermetilação na região promotora de *p15^{INK4B}* parece ser um evento mais tardio em pacientes pediátricos, pois há uma frequência maior de pacientes hipermetilados com os subtipos mais avançados (AREB/AREB-t). Além disso, essa hipermetilação em *p15^{INK4B}* está fortemente associada às alterações cromossômicas, principalmente que envolvem o cromossomo 7, sugerindo uma via de evolução alternativa.

A hipometilação global (LINE-1) ocorre desde o início da SMD, sendo progressiva essa perda de metilação em LINE-1 com a evolução da SMD. Pacientes com alterações citogenéticas, AREB/AREB-t e que evoluíram apresentaram uma hipometilação global mais expressiva que os demais pacientes em relação aos doadores. Alterações citogenéticas são eventos secundários resultantes de uma instabilidade genômica, que pode ter como uma das causas a hipometilação em LINE-1. Pacientes com cariótipo normal já apresentam hipometilação em LINE-1 em relação aos doadores, mas essa diferença se torna mais expressiva nos pacientes que apresentam alterações citogenéticas.

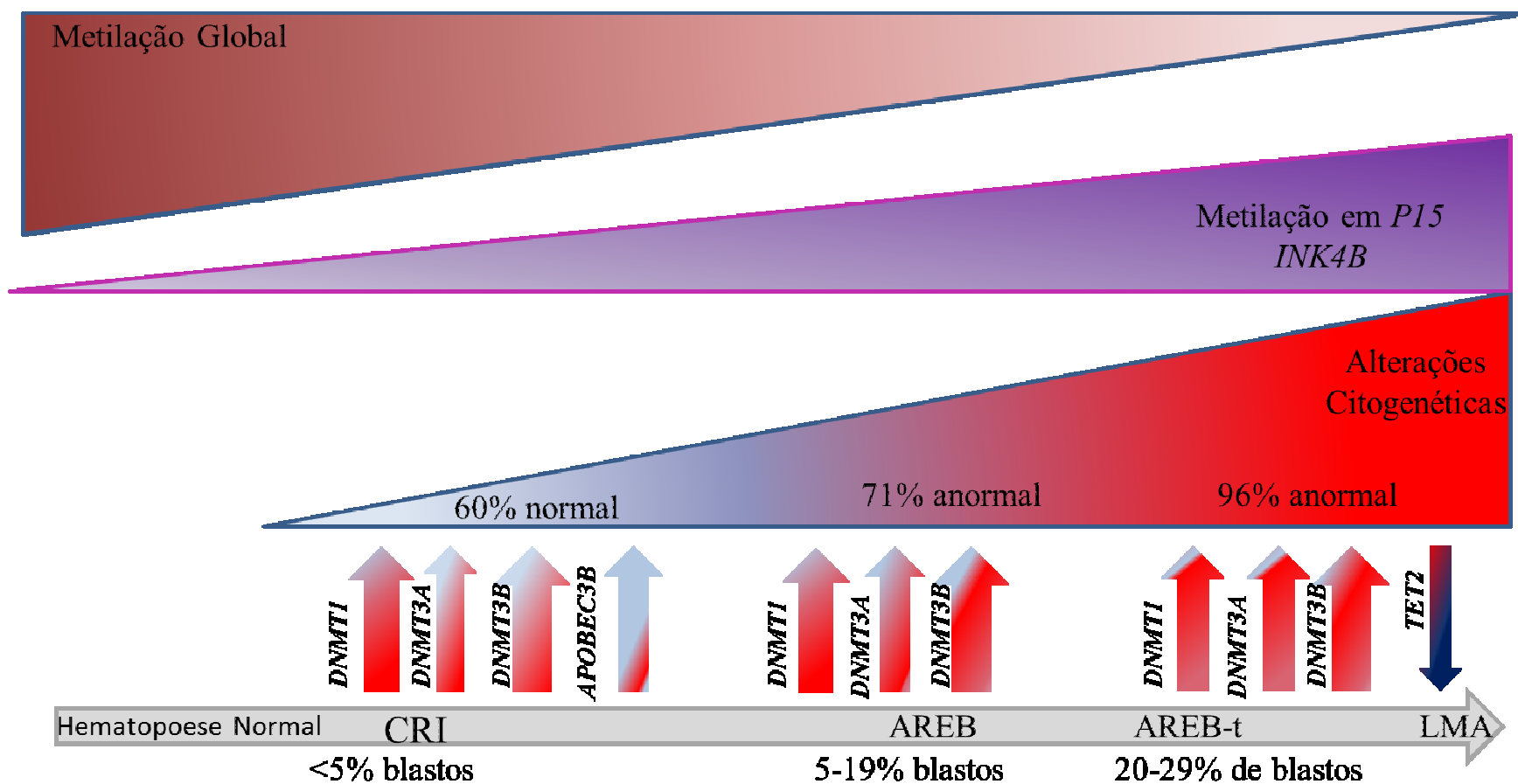


Figura 5.1: Modelo de desenvolvimento de SMD pediátrica e sua evolução para LMA. Durante o desenvolvimento da SMD pediátrica há o ganho de alterações citogenéticas e epigenéticas conforme ocorre a progressão para LMA. A super expressão das *DNMTs* é observada na CRI e associada à evolução. Enquanto, *APOBEC3B* esteve aumentada em pacientes sem alteração citogenética e *TET2* apresenta uma leve diminuição na expressão em pacientes que apresentaram evolução para LMA. O ganho de alterações citogenéticas e hipermetilação em *p15^{INK4b}* é progressivo com o avançar do curso da SMD. Já a hipometilação em LINE-1 pode ser observada na fase inicial da SMD, mas a diferença em relação aos doadores é mais significativa para aqueles pacientes em estágios mais avançados e que apresentaram evolução.

6. CONCLUSÃO

- As alterações cromossômicas de maior frequência neste estudo envolveram o cromossomo 7 (-7/ 7q), del(11)(q23) e cariótipos complexos;
- Pacientes com del(11)(q23) apresentaram evolução para LMA, estando associada com prognóstico desfavorável;
- Alterações biclonais estiveram presentes em 3,6% dos cariótipos anormais, sendo associadas aos subtipos mais avançados da SMD pediátrica primária e com a evolução para LMA;
- A super-expressão das *DNMTs* está envolvida na patogênese da SMD pediátrica primária tendo um papel importante no desenvolvimento e progressão da SMD;
- A expressão de *TET2* não está alterada significativamente na SMD pediátrica primária, mas apresenta-se diminuída nos pacientes que apresentaram evolução para LMA;
- Pacientes com cariótipo normal apresentam aumento da expressão de *APOBEC3B*, e esta possui expressão coordenada com *DNMT3A* e *DNMT3B*;
- A hipermetilação da região promotora do gene *p15^{INK4b}* é um evento frequente em subtipos mais avançados da SMD pediátrica primária;
- A hipermetilação na região promotora no gene *p15^{INK4b}* mostrou uma forte associação com as alterações citogenéticas;
- As alterações cromossômicas envolvendo o cromossomo -7/7q- estão associadas à hipermetilação na região promotora no gene *p15^{INKB}* e apresentam um prognóstico desfavorável, sugerindo uma provável via de evolução da doença;
- Pacientes com SMD pediátrica primária apresentam hipometilação global (LINE-1) progressiva com o desenvolvimento e evolução para LMA;
- A hipometilação global (LINE-1) mostrou uma forte associação com as alterações citogenéticas principalmente as que envolvem os cromossomos 6, 9 e os cariótipos complexos.
- Sugerimos, pela primeira vez, um modelo de desenvolvimento da SMD pediátrica e evolução para LMA, baseado no compilado das alterações citogenéticas e epigenéticas deste estudo.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADÈS L., ITZYKSON R., FENAUX P. **Myelodysplastic syndromes.** Lancet 2014; 383:2239–2252.

AGGERHOLM, A., HOLM, MS., GULDBERG, P., OLESEN, LH., HOKLAND, P. **Promoter hypermethylation of p15^{INK4B}, HIC1, CDH1, and ER is frequent in myelodysplastic syndrome and predicts poor prognosis in early-stage patients.** Eur J Haematol. 2006; 76:23-32.

ALLIS CD., JENUWEIN, T. **The molecular hallmarks of epigenetic control.** Nature Reviews – Genetics 2016; 17:487-500.

ANGELOVA S., SPASSOVA B., NIKOLOVAA V., *et al.* **Is Amplification of cMYC, MLL and RUNX1 Genes in AML and MDS Patients with Trisomy 8, 11 and 21 a Factor for a Clonal Evolution in the Karyotype?** Cytology and Genetics 2015; 49(3):165–172.

AOKI E., OHASHI H., UCHIDA T. *et al.* **Expression levels of DNA methyltransferase genes do not correlate with p15^{INK4B} gene methylation in myelodysplastic syndromes.** Leukemia 2003;17: 1903-1904.

ARBER DA., STEIN AS., CARTER NH., *et al.* **Prognostic impact of acute myeloid leukemia classification. Importance of detection of recurring cytogenetic abnormalities and multilineage dysplasia on survival.** Am J Clin Pathol. 2003; 119:672– 680.

ARBER DA., ORAZI A., HASSERJIA R., *et al.* **The 2016 revision to the World Health Organization (WHO) classification of myeloid neoplasms and acute leukemia.** Blood 2016;19;127(20):2391-405.

AU WY., FUNG A., MAN C., *et al.* **Aberrant p15 gene promoter methylation in therapy-related myelodysplastic syndrome and acute myeloid leukaemia: clinicopathological and karyotypic associations.** Br. J. Haematol. 2003;120:1062-1065.

BABA, Y., YAGI, T., SAWAYAMA, H., *et al.* **Long Interspersed Element-1 Methylation Level as a Prognostic Biomarker in Gastrointestinal Cancers.** Digestion. 2018; 97(1), 26–30.

BABUSHOK DV., BESSLER M., OLSON TS. **Genetic predisposition to Myelodysplastic syndrome and acute myeloid leukemia in children and young adults.** Leuk Lymphoma. 2016;57(3):520-36.

BACHER U., HAFERLACH T., KERN W., *et al.* **The impact of cytomorphology, cytogenetics, molecular genetics and immunophenotyping in a comprehensive diagnostic workup of myelodysplastic syndromes.** Cancer 2009; 1;115(19):4524-4532.

BACHER U., SCHANZ J., BRAULKE F., HAASE D. **Rare Cytogenetic Abnormalities in Myelodysplastic Syndromes.** Mediterr J Hematol Infect Dis 2015; 7(1): e2015034

BAIN BJ. **Di Guglielmo and his syndromes.** Br J Haematol 2003;120:939–943.

BANNON SA. AND DINARDO CD. **Hereditary Predispositions to Myelodysplastic Syndrome.** International Journal of Molecular Sciences 2016; 17, 838.

BAYLIN SB, ESTELLER M, ROUNTREE MR, BACHMAN KE, SCHUEBEL K, HERMAN JG. **Aberrant patterns of DNA methylation, chromatin formation and gene expression in cancer.** Hum Mol Genet 2001; 10:687-92.

BAYLIN SB., AND JONES PA. **A decade of exploring the cancer epigenome — biological and translational implications.** Nat Rev Cancer 2011; 11(10): 726–734.

BEJAR R. **Myelodysplastic Syndromes Diagnosis: What Is the Role of Molecular Testing?** Curr Hematol Malig Rep 2015; 10:282–291.

BEJAR R., AND GREENBERG PL. **The Impact of Somatic and Germline Mutations in Myelodysplastic Syndromes and Related Disorders.** Journal of the National Comprehensive Cancer Network. 2016;15(1), 131–135.

BEJAR R., AND STEENSMA DP. **Recent developments in myelodysplastic syndromes.** Blood 2014; 124(18):2793-2803.

BENETATOS, L.; VARTHOLOMATOS, G. **On the potential role of DNMT1 in acute myeloid leukemia and myelodysplastic syndromes: not another mutated epigenetic driver.** Ann Hematol 2016; 95: 1571-82.

BENNETT JM. **A Comparative Review of Classification Systems in Myelodysplastic Syndromes (MDS).** Semin Oncol 2005; 32(4 Suppl 5):S3-10.

BENNETT JM., CATOVSKY D., DANIEL MT., *et al.* **Proposals for the classification of the myelodysplastic syndromes.** Br J Haematol 1982; 51: 189-199.

BENTON CB., KHAN M., SALLMAN D., NAZHA A., *et al.* **Prognosis of patients with intermediate risk IPSS-R myelodysplastic syndrome indicates variable outcomes and need for models beyond IPSS-R.** American Journal of Hematology. 2018; 93(10):1245-1253.

BERNASCONI P., KLERSY C., BONI M., *et al.* **Does cytogenetic evolution have any prognostic relevance in myelodysplastic syndromes? A study on 153 patients from a single institution.** Ann Hematol. 2010;89: (6):545-551.

BERNSTEIN BE., MEISSNER A., LANDER ES. **The mammalian epigenome.** Cell 2007; 128:669-681.

BRANCO MR., FICZ G AND REIK W. **Uncovering the role of hydroxymethylcytosine in the epigenome.** Nature Reviews Genetics. 2012; 13:7-13

BRÖSKE AM., VOCKENTANZ L., KHARAZI S., *et al.* **DNA methylation protects hematopoietic stem cell multipotency from myeloerythroid restriction.** Nat Genet. 2009; 41(11):1207-1215.

BURNS MB. TEMIZ, NA. AND HARRIS, RS. **Evidence for APOBEC3B mutagenesis in multiple human cancers.** Nat Genet. 2013; 45(9): 977–983.

BURNS, K. H. **Transposable elements in cancer.** Nature Reviews Cancer, 2017;17(7): 415–424.

CALVO X., NOMDEDEU M., NAVARRO A., *et al.* **High levels of global DNA methylation are an independent adverse prognostic factor in a series of 90 patients with de novo myelodysplastic syndrome.** Leukemia Research. 2014;38:(8):874–881.

CANCER GENOME ATLAS RESEARCH NETWORK. **Genomic and epigenomic landscapes of adult de novo acute myeloid leukemia.** N Engl J Med 2003; 368:2059–2074.

CHALLEN GA., SUN, D., MAYLE A., *et al.* **Dnmt3a and Dnmt3b have overlapping and distinct functions in hematopoietic stem cells.** Cell stem cell 2014; 15: 350–364.

CHALLEN GA.; SUN, D., JEONG M., *et al.* **Dnmt3a is essential for hematopoietic stem cell differentiation.** Nature Genetics 2011; 44, 23–31.

CHANG KL., O'DONNELL MR., SLOVAK ML. *et al.* **Primary myelodysplasia occurring in adults under 50 years old: a clinicopathologic study of 52 patients.** Leukemia 2002; 16(4):623-631.

CHATTERJEE T., AND CHOUDHRY VP. **Childhood Myelodysplastic Syndrome.** Indian J Pediatr 2013; 80(9):764–771.

CHEN G., ZENG W., MIYAZATO A., *et al.* **Young . Distinctive gene expression profiles of CD34 cells from patients with myelodysplastic syndrome characterized by specific chromosomal abnormalities.** Blood 2004;104 (13): 4210-4218.

CHIM, CS., LIANG, R. TAM, CYY. AND KWONG, YL..**Methylation of *p15* and *p16* Genes in Acute Promyelocytic Leukemia: Potential Diagnostic and Prognostic Significance** Journal of Clinical Oncology 2001;19: 7: 2033-2040.

COGLE CR. **Incidence and Burden of the Myelodysplastic Syndromes.** Curr Hematol Malig Rep. 2015; 10(3);272-281.

COTRAN RS., KUMAR V., COLLINS T. **Neoplasias. In: Robbins, Patologia Estrutural e Funcional.** Guanabara Koogan. 2000 6^a ed., p. 253-254.

COUTINHO DF, MONTE-MÓR BCR, VIANNA DT, ROUXINOL ST, BATALHA ABW, BUENO APS, *et al.* **TET2 expression level and 5-hydroxymethylcytosine are decreased in refractory cytopenia of childhood.** Leuk Res. 2015; 39:1103-1108.

CSEH AM., NIEMEYER CM., YOSHIMI A., *et al.* **Therapy with low-dose azacitidine for MDS in children and young adults: a retrospective analysis of the EWOG-MDS study group.** British Journal of Haematology, 2016; 172(6): 930–936.

DAVIDSSON, J., PUSCHMANN, A., TEDGÅRD, U., BRYDER, D., NILSSON, L., AND CAMMENGA, J. **SAMD9 and SAMD9L in inherited predisposition to ataxia, pancytopenia, and myeloid malignancies.** Leukemia. 2018;32(5):1106–1115.

DAWSON MA., KOUZARIDES T., HUNTLY BJ. **Targeting epigenetic readers in cancer.** The New England journal of medicine 2012; 367(7):647-657.

DE BRAEKELEER M., DOUET-GUILBERT N., DE BRAEKELEER E. **Prognostic impact of p15 gene aberrations in acute leukemia,** Leukemia & Lymphoma 2017; 58(2):257-265.

DE SÁ PEREIRA BM., MONTALVÃO-DE-AZEVEDO R., FARIA P. A., *et al.* **Association between long interspersed nuclear element-1 methylation levels and relapse in Wilms tumors.** Clinical epigenetics. 2017; 9:128.

DE SOUZA DC., FERNANDEZ CS., CAMARGO A., *et al.* **Cytogenetic as an Important Tool for Diagnosis and Prognosis for Patients with Hypocellular Primary Myelodysplastic Syndrome.** BioMed Research International. 2014; 2014: 1-10.

DELFORGE M. **Understanding the pathogenesis of myelodysplastic syndromes.** The Hematology Journal. 2003;4:303-309.

DELLA PORTA MG., ALESSANDRINO EP., BACIGALUPO A., VAN LINT MT., *et al.* **Predictive factors for the outcome of allogeneic transplantation in patients with MDS stratified according to the revised IPSS-R.** Blood 2014; 123(15):2333-2342.

DOU Y., HESS JL. **Mechanisms of transcriptional regulation by MLL and its disruption in acute leukemia.** Int J Hematol. 2008;87:10e8.

FEIL R., AND FRAGA MF. **Epigenetics and the environment: emerging patterns and implications.** Nature Reviews Genetics. 2012;13: 97-109.

FERNANDEZ TS., ABDELHAY E., DE SOUZA FT, *et al.* **Chromosomal alterations associated with evolution from myelodysplastic syndrome to acute myeloid leukemia.** Leuk Res. 2000;24: 839-848.

FU Y, ITO F, ZHANG G, FERNANDEZ B, YANG H, CHEN XS. **DNA cytosine and methylcytosine deamination by APOBEC3B: enhancing methylcytosine deamination by engineering APOBEC3B.** Biochem. J. 2015; 471: 25-35.

GALAVERNA F., RUGGERI A., AND LOCATELLI F. **Myelodysplastic syndromes in children.** Current Opinion in Oncology. 2018; (30):6:402-409.

GANGULY BB., AND KADAM NN. **Mutations of myelodysplastic syndromes (MDS): An update up-to-date.** Mutation Research. 2016;769: 47-62.

GARCIA-MANERO G. **Myelodysplastic syndromes: 2015 Update on diagnosis, risk-stratification and management.** Am J Hematol. 2015; 90(9):831-841.

GARCIA-MANERO G. **Myelodysplastic syndromes: 2012 update on diagnosis, risk-stratification, and management.** Am J Hematol 2012; 87(7):692-701.

GERMING U., STRUPP C., KUENDGEN A, *et al.* **Prospective validation of the WHO proposals for the classification of myelodysplastic syndromes.** Haematologica. 2006; 91:1596-1604.

GLAUBACH T., ROBINSON LJ., COREY SJ. **Pediatric myelodysplastic syndromes: they do exist!** J Pediatr Hematol Oncol. 2014; 36:1-7.

GÖHRING G., MICHALOVA K., BEVERLOO HB., *et al.* **Complex karyotype newly defined: the strongest prognostic factor in advanced childhood myelodysplastic syndrome.** Blood. 2010; 116(19):3766-3769.

GREAVES MF., AND WIEMELS J. **Origins of Chromosome Translocations in Childhood Leukaemia.** Nature Reviews. 2003; 3:1-11

GREENBERG PL., STONE RM., AL-KALI A., *et al.* **Myelodysplastic Syndromes, Version 2.2017.** Journal of the National Comprehensive Cancer Network 2017; (15):1:60-87.

GREENBERG PL., TUECHLER H., SCHANZ J., *et al.* **Revised International Prognostic Scoring System for Myelodysplastic Syndromes.** *Blood* 2012 20;120: (12): 2454-2465.

GREENBERG, P.; COX, C.; LEBEAU, M.M.; *et al.* **International scoring system for evaluating prognosis in myelodysplastic syndromes.** *Blood.* 1997;89:2079-2088.

HAFERLACH T., NAGATA Y., GROSSMANN V., *et al.* **Landscape of genetic lesions in 944 patients with myelodysplastic syndromes.** *Leukemia* 2014; 28(2):241-247.

HAN JY., KIM, KH., KWON HC., *et al.* **Unrelated clonal chromosome abnormalities in myelodysplastic syndromes and acute myeloid leukemias.** *Cancer Genetics and Cytogenetics.* 2002;132:156–158.

HAN JY., THEIL KS., HOELTGE G. **Frequencies and characterization of cytogenetically unrelated clones in various hematologic malignancies: seven years of experiences in a single institution.** *Cancer Genet. Cytogenet.* 2006;164:128-132.

HASEGAWA D. **The current perspective of low grade myelodysplastic syndrome in children.** *Int J Hematol* 2016; 103:360–364.

HASLE H, WADSWORTH LD, MASSING BG, *et al.* **A population-based study of childhood myelodysplastic syndrome in British Columbia, Canada.** *Br J Haematol* 1999;106(4):1027-1032.

HASLE H. **Myelodysplastic and myeloproliferative disorders in children.** *Curr Opin Pediatr.* 2007; (19):1:1-8.

HASLE H. **Myelodysplastic and myeloproliferative disorders of childhood.** *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2016; 2;2016(1):598-604.

HASLE H., NIEMEYER CM., CHESSELLS JM., *et al.* **A pediatric approach to the WHO classification of myelodysplastic and myeloproliferative diseases.** *Leukemia* 2003; 17: 277–282.

HIRABAYASHI S., FLOTHO C., MOETTER J., *et al.* **Spliceosomal gene aberrations are rare, coexist with oncogenic mutations, and are unlikely to exert a driver effect in childhood MDS and JMML.** *Blood* 2012; 119: e96-e99.

HOFMANN I. **Pediatric myelodysplastic syndromes.** J Hematopathol. 2015; 8:127–141.

HOLLIDAY R. **The inheritance of epigenetic defects.** Science 1987; 238:163-70.

HONDA H., NAGAMACHI A. AND INABA I. **-7/7q- syndrome in myeloid-lineage.** Oncogene. 2015;7:34: 2413-25.

HOPFER O., KOMOR M., KOEHLER IS., *et al.* **Aberrant promotor methylation in MDS hematopoietic cells during in vitro lineage specific differentiation is differently associated with DNMT isoforms.** Leuk Res. 2009; 33: 434-42.

HORVATH S. **DNA methylation age of human tissues and cell types.** Genome Biology. 2013;14: 3115.

HUR K., CEJAS P., FELIU J., MORENO-RUBIO J., BURGOS E., BOLAND CR., AND GOEL A. **Hypomethylation of long interspersed nuclear element-1 (LINE-1) leads to activation of proto-oncogenes in human colorectal cancer metastasis.** Gut. 2014; 63(4): 635–646.

ISSA JP. **Epigenetic Change in the Myelodysplastic Syndrome.** Hematol Oncol Clin N Am. 2010; 24(2): 317–330.

ISSA JP. **The myelodysplastic syndrome as a prototypical epigenetic disease.** Blood 2013; 121(19): 3811–3817.

ITO F, FU Y, KAO SA, YANG H, AND CHEN XS. **Family-Wide Comparative Analysis of Cytidine and Methylcytidine Deamination by Eleven Human APOBEC Proteins.** J Mol Biol. 2017; 429(12): 1787–1799.

JABBOUR E., TAKAHASHI K., WANG X., *et al.* **Acquisition of cytogenetic abnormalities in patients with IPSS defined lower-risk myelodysplastic syndrome is associated with poor prognosis and transformation to acute myelogenous leukemia.** American journal of hematology. 2013; 88(10): 831-837.

JAISWAL S., FONTANILHAS P., FLANNICK J., *et al.* **Age-related clonal hemotopoiesis associated with adverse outcome.** N Engl J Med. 2014; 371(26): 2488-2498.

JIN Z., LIU Y. **DNA methylation in human diseases.** Genes & Diseases. 2018; 5:1e8.

JUHL-CHRISTENSEN C., OMMEN, HB., AGGERHOLM A., *et al.* **Genetic and Epigenetic Similarities and Differences Between Childhood and Adult AML.** *Pediatr Blood Cancer.* 2012;58:525–531.

KARDOS G., BAUMANN I., PASSMORE SJ., *et al.* **Refractory anemia in childhood:Retrospective analysis of 67 patients with particular reference to monosomy 7.** *Blood.* 2003 15;102(6): 1997-2003.

KASAHARA K., ONOZAWA M., MIYASHITA N., *et al.* **Cytogenetically Unrelated Clones in Acute Myeloid Leukemia Showing Different Responses to Chemotherapy.** *Case Reports in Hematology,* 2016; 2016: 1–5.

KIM M, OH B., KIM S., PARK HK. *et al.* . ***p15INK4b* methylation correlates with thrombocytopenia, blast percentage, and survival in myelodysplastic syndromes in a dose dependent manner: Quantitation using pyrosequencing study .** *Leukemia Research.* 2010; 34: 6: 718–722.

KIM M., KOOK H., PARK HJ., AHN HS., *et al.* **Quantitative Comparison of *CDKN2B* Methylation in Pediatric and Adult Myelodysplastic Syndromes.** *Acta Haematol.* 2013; 130: 115-121.

KIM, Y., JEKARL, D. W., KIM, J., KWON, A., CHOI, H., LEE, S., KIM Y., KIM Y., OH I., KIM, M. **Genetic and epigenetic alterations of bone marrow stromal cells in myelodysplastic syndrome and acute myeloid leukemia patients.** *Stem Cell Research.* 2015; 14 (2): 177–184.

KIRÁLY, A. P., KÁLLAY, K., GÁNGÓ, A. *et al.* **Familial Acute Myeloid Leukemia and Myelodysplasia in Hungary.** *Pathology & Oncology Research.* 2017;24 (1): 83–88

KNISBACHER BA., GERBER D., AND LEVANON EY. **DNA Editing by APOBECs: A Genomic Preserver and Transformer.** *Trends in Genetics* 2016: 32 (1): 16–28.

KOEFFLER HP., AND LEONG G . **Preleukemia: one name, many meanings.** *Leukemia* 2017; 31: 534–542.

KUNIMOTO H., AND NAKAJIMA H. **Epigenetic dysregulation of hematopoietic stem cells and preleukemic state.** *Int J Hematol* 2017; 106 (1): 34-44.

LAMBA JK., CAO X., RAIMONDI SC., *et al.* **Integrated epigenetic and genetic analysis identifies markers of prognostic significance in pediatric acute myeloid leukemia.** *Oncotarget*, 2018; 9: 26711- 26723.

LÄNGER F., DINGEMANN F., KREIPE, H., LEHMANN U. **Up-regulation of DNA methyltransferases DNMT1, 3A, and 3 B in myelodysplastic syndrome.** *Leukemia Research* 2005; 29: 325-329.

LASKY J., SAKAMOTO KM. **Topics in pediatric leukemia melodysplastic and myeloproliferative disorders of childhood.** *MedGenMed* 2005; 14; 7 (1): 21.

LI KK., LUO LF., SHEN Y., XU J., CHEN Z., CHEN SJ. **DNA Methyltransferases in Hematologic Malignancies.** *Semin Hematol* 2013; 50 (1): 48-60.

LINDSLEY RC., AND EBERT BL. **The biology and clinical impact of genetic lesions in myeloid malignancies.** *Blood* 2013; 122 (23): 3741-8.

LIVAK KJ., AND SCHMITTGEN TD. **Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT Method.** *Methods*. 2001; 25 (4), 402-408.

LOCATELLI, F., AND STRAHM, B. **How I treat myelodysplastic syndromes of childhood.** *Blood*, 2018; 131 (13): 1406-1414.

LOVATEL VL., DE SOUZA DC., ALVARENGA TF., *et al.* **An uncommon t(9;11)(p24;q22) with monoallelic loss of ATM and KMT2A genes in a child with myelodysplastic syndrome/ acute myeloid leukemia who evolved from Fanconi anemia.** *Molecular Cytogenetics* 2018; 11: 40: 1-6.

MAHER OM., SILVA JG., WU J., *et al.* **Outcomes of children, adolescents, and young adults following allogeneic stem cell transplantation for secondary acute myeloid leukemia and myelodysplastic syndromes—The MD Anderson Cancer Center experience.** *Pediatric Transplantation*. 2017; 21: e12890.

MALCOVATI L, HELLSTRÖM-LINDBERG E, BOWEN D, *et al.* **Diagnosis and treatment of primary myelodysplastic syndromes in adults: recommendations from the European LeukemiaNet.** Blood 2013; 122 (17): 2943-2964.

MAYLE A., CHALLEN GA., SUN D., *et al.* **Dnmt3b Is Dispensable for Hematopoietic Stem Cell Differentiation, but Acts Synergistically with Dnmt3a to Control the Balance Between Self-Renewal and Differentiation.** Blood 2012; 120: 848.

MELDI KM., FIGUEROA ME. **Epigenetic deregulation in myeloid malignancies.** Translatinal Research 2015; 165 (1): 102-104

MEYER C., BURMEISTER T., GRÖGER D., *et al.* **The MLL recombinome of acute leukemias in 2017.** Leukemia. 2018; 32: 273–284.

MEYER N., AND PENN LZ. **Reflecting on 25 years with MYC.** Nat Rev Cancer. Dec 2008; 8 (12): 976-990.

MIOUSSE IR. AND KOTURBASH I. **The Fine LINE: Methylation Drawing the Cancer Landscape.** Hindawi Publishing Corporation. BioMed Research International 2015; 2015:131547.

MIZUNO S., CHIJIWA T., OKAMURA T., *et al.* **Expression of DNA methyltransferases DNMT1, 3A, and 3B in normal hematopoiesis and in acute and chronic myelogenous leukemia.** Blood 2001; 97:(5):1172-1179.

MORIWAKI K., MANABE A., TAKETANI T., *et al.* **Cytogenetics and clinical features of pediatric myelodysplastic syndrome in Japan.** International Journal of Hematology. 2014;100: 478–484.

NIEMEYER CM. AND MECUCCI C. **Practical considerations for diagnosis and management of patients and carries.** Seminars in Hematology 2017; (54): 69-74.

NIEMEYER CM., KRATZ CP. **Pediatric myelodysplastic syndromes and juvenile myelomonocytic leukaemia: molecular classification and treatment options.** Br J Haematol 2008; 140: 610-624.

NIMER SD. **Myelodysplastic syndromes.** Blood 2008; 15; 111(10): 4841.

NISHINO HT., CHANG C. **Myelodysplastic Syndromes: Clinicopathologic Features, Pathobiology, and Molecular Pathogenesis.** Archives of Pathology & Laboratory Medicine 2005; 129(10): 1299-1310.

NYBAKKEN GE., AND BAGG A. **The Genetic Basis and Expanding Role of Molecular Analysis in the Diagnosis, Prognosis, and Therapeutic Design for Myelodysplastic Syndromes.** The Journal of Molecular Diagnostics 2014; 16(2):145-58.

OBENAUER JC., KAVELAARS FG., SANDERS MA., *et al.* **Lack of splice factor and cohesin complex mutations in pediatric myelodysplastic syndrome.** Haematologica 2016; 101(12):e479-e481.

OLNEY H J., LE BEAU MM. **The cytogenetics of myelodysplastic syndromes.** Best Practice & Research Clinical Haematology 2001; 14(3): 479-495.

OWEN C., BARNETT M. AND FITZGIBBON. **Familial myelodysplasia and acute myeloid leukemia- a review.** British Journal of Haematology 2008; (140): 123-132.

PANANI AD., ROUSSOS C. **Cytogenetic aspects of adult primary myelodysplastic syndromes: Clinical implications.** Cancer Letters 2006; 28; 235(2): 177-190.

PAPAEMMANUIL E., GERSTUNG M., MALCOVATI L., *et al.* **Clinical and biological implications of driver mutations in myelodysplastic syndromes.** Blood 2013; 122(22): 3616-3627.

PARKER JE., MUFTI GJ., RASOOL F., *et al.* **The role of apoptosis, proliferation, and the Bcl-2-related proteins in the myelodysplastic syndromes and acute myeloid leukemia secondary to MDS.** Blood. 2000; 96: 3932-3938.

PASTOR VB., HIRABAYASHI S., KAROW A., *et al.* **Mutational landscape in children with myelodysplastic syndromes is distinct from adults: Specific somatic drivers and novel germline variants.** Leukemia. 2017; 31 (3): 759-762.

PETERSON JF., BAUGHN LB., PEARCE KE., *et al.* **KMT2A (MLL) rearrangements observed in pediatric/young adult T-lymphoblastic leukemia/lymphoma: A 10-year**

review from a single cytogenetic laboratory. *Genes, Chromosomes and Cancer* 2018; 57 (11): 541-546.

PLASS C., PFISTER SM., LINDROTH AM., *et al.* **Mutations in regulators of the epigenome and their connections to global chromatin patterns in cancer.** *Nat Rev Genet.* 2013;14(11):765-780.

POLONI A., GOTERI G., ZIZZI A., *et al.* **Prognostic role of immunohistochemical analysis of 5 mc in myelodysplastic syndromes.** *European Journal of Haematology.* 2013; 91: (3): 219–227.

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

RAU AT., SHREEDHARA AK., KUMAR S. **Myelodysplastic syndromes in children: where are we today?** *Ochsner J.* 2012; 12: 216-220.

REN Y., MEI C., YE L., *et al.* **Analysis of clinical and molecular features of MDS patients with complex karyotype in China.** *Blood Cells Mol Dis.* 2018; 75: 13-19.

RODRIGUES EF. **Caracterização das alterações cromossômicas e moleculares em síndrome mielodisplásica primária na infância no Estado do Rio de Janeiro.** Rio de Janeiro, FCM-UERJ, 2014.

RODRIGUES EF., SANTOS-REBOUÇAS CB., GONÇALVES PIMENTEL MM., *et al.* **Epigenetic alterations of p15(INK4B) and p16(INK4A) genes in pediatric primary myelodysplastic syndrome.** *Leuk Lymphoma* 2010; 51:1887-1894.

RODRIGUES, E.F.; DE SOUZA, D.C.; CAMARGO, A.; *et al.* **Cytogenetic biclonality in a child with hypocellular primary myelodysplastic syndrome.** *Cancer Genet Cytogenet.* 2007; 178: (1):70-72.

RÖMERMANN, D., HASEMEIER, B., METZIG, K., GÖHRING, G., SCHLEGELBERGER, B., LÄNGER, F., KREIPE H AND LEHMANN, U. **Global increase in DNA methylation in patients with myelodysplastic syndrome.** *Leukemia,* 2008; 22 (10), 1954–1956.

SANTINI V., MELNICK A., MACIEJEWSKI JP. *et al.* **Epigenetics in focus: pathogenesis of myelodysplastic syndromes and role of hypomethylating agents.** *Oncology Hematology* 2013; 88: 231-245.

SAUMELL S., SOLÉ F., ARENILLAS L., *et al.* **Trisomy 8, a Cytogenetic Abnormality in Myelodysplastic Syndromes, Is Constitutional or Not?** *PLoS ONE* 2015; 10(6): e0129375.

SCHWARTZ JR., MA J, LAMPRECHT T, *et al.* NICHOLS K E, MULLIGHAN CG, RIBEIRO RC AND KLCO JM. **The genomic landscape of pediatric myelodysplastic syndromes.** *Nature Communications* 2017; 8 (1557): 1-10.

SCOPIM-RIBEIRO R, MACHADO-NETO JA, DE MELO CAMPOS P, *et al.* **Low Ten-eleven-translocation 2 (TET2) transcript level is independent of TET2 mutation in patients with myeloid neoplasms.** *Diagn Pathol.* 2016; (16) 11: 28.

SHIGAKI H., BABA Y., WATANABE M., MURATA A., IWAGAMI S., MIYAKE K., ISHIMOTO T., IWATSUKI M., BABA H. **LINE-1 hypomethylation in gastric cancer, detected by bisulfite pyrosequencing, is associated with poor prognosis.** *Gastric Cancer* 2013; 16: 480–487.

SINGAL R., AND GINDER GD. **DNA Methylation.** *Blood* 1999; 93 (15): 4059-4070.

SPERLING ADAM S., GIBSON CJ., EBERT BL. **The genetics of myelodysplastic syndrome: from clonal haematopoiesis to secondary leukaemia.** *Nat Rev Cancer.* 2016; 17(1): 5-19.

STAHL M., KOHRMAN N., GORE SD., *et al.* **Epigenetics in Cancer: A Hematological Perspective.** *PLoS Genet* 2016 ;12(10): e1006193.

STEENSMA DP. **Dysplasia Has A Differential Diagnosis: Distinguishing Genuine Myelodysplastic Syndromes (MDS) From Mimics, Imitators, Copycats and Impostors.** *Curr Hematol Malig Rep.* 2012; 7 (4): 310-320.

SWERDLOW SH., CAMPO E., HARRIS NL. *et al.* **World Health Organization Classification of Tumours of Hematopoietic and Lymphoid Tissues.** 4th Edition. Lyon: IARC Press 2008: 86-103.

TESTA JR, MISAWA S, OGUMA N *et al.* **Chromosomal alterations in acute leukemia patients studied with improved culture methods.** *Cancer Res* 1985; 45: 430-434.

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.

TROWBRIDGE JJ., SNOW JW., KIM J. *et al.* **DNA Methyltransferase 1 is essential for and uniquely regulates hematopoietic stem and progenitor cells** *Cell Stem. Cell.* 2009; 5: 442–449.

UCHIDA T, KINOSHITA T, NAGAI H, NAKAHARA Y, SAITO H, HOTTA T, MURATE T. **Hypermethylation of the p15INK4B gene in myelodysplastic syndromes.** *Blood.* 1997; 15;90(4):1403-1409

VARDIMAN JW. **The classification of MDS: From FAB to WHO and beyond.** *Leukemia Research* 2012; 36: 1453–1458.

VARDIMAN JW., HARRIS NL., AND BRUNNING RD. **The World Health Organization (WHO) classification of the myeloid neoplasms.** *Bood* 2002; 100: 2292-2302.

VARDIMAN JW., THIELE J., ARBER DA., *et al.* **The 2008 revision of the World Health Organization (WHO) classification of myeloid neoplasms and acute leukemia: rationale and important changes.** *Blood* 2008; 30; 114 (5): 937-951.

VASEKOVA P., PLANK L. **The Differences in Adult and Pediatric Myelodysplastic Syndrome: a review.** *Acta Medica Martiniana* 2016; 16 (2): 16-22.

VASILATO D., PAPAGEORGIOU SG., DIMITRIADIS GP. **Epigenetic alterations and microRNAs: new players in the pathogenesis of myelodysplastic syndromes.** *Epigenetics* 2013; 8 (6): 561-570.

VASSALLO J., MAGALHÃES SMM. **Síndromes mielodisplásicas e mielodisplásicas/mieloproliferativas.** Rev. Bras. Hematol. Hemoter 2009; 31 (4): 267-272.

VIDAL, DO., PAIXÃO, VA. BRAIT, M, SOUTO, EX., CABALLERO, OL., LOPES, LF, VETTORE, AL.. **Aberrant methylation in pediatric myelodysplastic syndrome.** *Leukemia Research.* 2007; 31: 175–181.

XIE M., JIANG Q., XIE Y. **Comparison Between Decitabine and Azacitidine for the Treatment of Myelodysplastic Syndrome: A Meta-Analysis With 1392 participants.** *Clinical Lymphoma Myeloma and Leukemia.* 2015;1:22-28.

WAESPE, N., VAN DEN AKKER, M., KLAASSEN, RJ., *et al.* **Response to treatment with azacitidine in children with advanced myelodysplastic syndrome prior to hematopoietic stem cell transplantation.** *Haematologica,* 2016;101(12), 1508-1515.

WALTER MJ., DING L., SHEN D., *et al.* **Recurrent DNMT3A mutations in patients with myelodysplastic syndromes.** *Leukemia* 2011; 25; 1153-1158.

WINTERS AC., BERNT KM. **MLL-Rearranged Leukemias—An Update on Science and Clinical Approaches.** *Frontiers in Pediatrics.* 2017; 5: 4.

WLODARSKI MW., SAHOO SS., AND NIEMEYER CM. **Monosomy 7 in Pediatric Myelodysplastic Syndromes.** *Hematology/Oncology Clinics of North America* 2018; 32(4): 729–743.

WLODARSKI MW, HIRABAYASHI S, PASTOR V. *et al.* **Prevalence, clinical characteristics, and prognosis of GATA2-related myelodysplastic syndromes in children and adolescents.** *Blood* 2016; 17;127 (11): 1387-97.

WOLFF EM, BYUN HM, HAN HF, *et al.* **Hypomethylation of a LINE-1 promoter activates an alternate transcript of the MET oncogene in bladders with cancer.** *PLoS Genet.* 2010; 6: e1000917.

WOLFF L., AND BIES J. **p15Ink4b Functions in determining hematopoietic cell fates: Implications for its role as a tumor suppressor.** *Blood Cells, Molecules and Diseases* 2013; 50: 227–231.

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; 20:434–440.

WOUTERS BJ., DELWEL R. **Epigenetics and approaches to targeted epigenetic therapy in acute myeloid leukemia.** Blood 2016; 7(1):42-52.

WU YC., ZHANG XM., ZHU YD., WU W. **Prognostic significance of monosomal karyotype in myelodysplastic syndrome: a meta-analysis.** Hematology 2019; 1: 60-69.

YAKUB JC. **Is Myelodysplastic Syndrome a Rarity in Childhood? Or are We Failing to Diagnose?** Bangladesh J Child Health 2012; 36 (3): 111-114

YAMAMURA, K., KOSUMI, K., BABA, Y. *et al.* **LINE-1 methylation level and prognosis in pancreas cancer: pyrosequencing technology and literature review.** Surg Today. 2017; 47: 1450.

YAO CY., HOU HA., LIN TY., *et al.* **Distinct mutation profile and prognostic relevance in patients with hypoplastic myelodysplastic syndromes (h-MDS).** Oncotarget 2016; 27; 7(39): 63177-63188.

YOSHIMI A, BAUMANN I, FUHRER M, *et al.* **Immunosuppressive therapy with antithymocyte globulin and cyclosporine A in selected children with hypoplastic refractory cytopenia.** Haematologica 2007; 92: 397–400.

ZHANG W, XU J. **DNA methyltransferases and their roles in tumorigenesis.** Biomarker research, 2017; 5: 1.

ZHAO X., YANG F., LI S., *et al.* **CpG island methylator phenotype of myelodysplastic syndrome identified through genome-wide profiling of DNA methylation and gene expression.** British Journal of Haematology 2014; 165: 649–658.

ZOU, J., WANG, C., MA, X., WANG, E., AND PENG, G. **“APOBEC3B, a Molecular Driver of Mutagenesis in Human Cancers.”** Cell & Bioscience 2017; 7: 29.

ANEXO I

Tabela : Dados Clínicos dos Pacientes Pediátricos com SMD Primária

nº	Sexo	Idade (anos)	Subtipo da SMD	Evolução	nº	Sexo	Idade (anos)	Subtipo da SMD	Evolução
1	M	12	CRI	não	41	M	13	CRI	não
2	M	7	CRI	não	42	M	2	CRI	não
3	F	8	CRI	não	43	F	5 meses	CRI	não
4	F	18	CRI	sim	44	F	9	CRI	não
5	M	7	CRI	não	45	F	4	CRI	não
6	F	15	CRI	não	46	M	8	CRI	não
7	F	16	CRI	não	47	F	3 meses	CRI	não
8	F	7	CRI	não	48	M	9	CRI	sim
9	F	6	CRI	não	49	M	16	CRI	não
10	M	14	CRI	não	50	F	2	CRI	sim
11	F	8	CRI	não	51	M	13	CRI	não
12	M	13	CRI	não	52	M	14	CRI	não
13	M	9	CRI	sim	53	M	5	CRI	não
14	M	1	CRI	não	54	M	17	CRI	não
15	M	3	CRI	sim	55	M	11	CRI	não
16	F	11	CRI	não	56	F	11	CRI	não
17	M	14	CRI	não	57	M	11	CRI	não
18	F	7	CRI	não	58	M	7	CRI	não
19	M	2	CRI	não	59	F	9	CRI	não
20	F	15	CRI	não	60	F	16	CRI	não
21	F	7	CRI	não	61	M	14	CRI	não
22	F	2	CRI	sim	62	M	12	CRI	não
23	M	4	CRI	não	63	F	11	CRI	não
24	M	2	CRI	sim	64	M	5	CRI	não
25	M	6 meses	CRI	não	65	F	12	CRI	não
26	F	2	CRI	não	66	F	17	CRI	não
27	F	5	CRI	não	67	M	7	CRI	não
28	F	12	CRI	não	68	M	15	CRI	não
29	F	2	CRI	não	69	M	16	CRI	não
30	M	18	CRI	não	70	M	18	CRI	não
31	M	11	CRI	sim	71	M	9	CRI	não
32	M	7	CRI	Não	72	F	10	CRI	não
33	M	6	CRI	não	73	M	10	CRI	sim
34	M	6 meses	CRI	não	74	M	13	CRI	sim
35	F	11	CRI	não	75	M	13	CRI	não
36	M	9 meses	CRI	não	76	F	6	CRI	não
37	M	9 meses	CRI	não	77	F	2	CRI	não
38	F	4	CRI	não	78	M	15	CRI	não
3	M	3	CRI	não	79	M	13	CRI	não
40	F	17	CRI	não	80	M	12	CRI	não

n°	Sexo	Idade (anos)	Subtipo da SMD	Evolução	n°	Sexo	Idade (anos)	Subtipo da SMD	Evolução
81	F	10	CRI	não	131	M	12	AREB-t	sim
82	M	1	CRI	não	132	M	5	AREB-t	sim
83	F	2	CRI	não	133	M	1	AREB-t	sim
84	F	2	CRI	não	134	F	2	AREB-t	sim
85	M	1	CRI	não	135	F	4	AREB-t	sim
86	M	2	CRI	não	136	M	1	AREB-t	sim
87	F	6	CRI	não	137	M	12	AREB-t	sim
88	M	16	CRI	não	138	F	13	AREB-t	sim
89	M	4	CRI	não	139	M	15	AREB-t	sim
90	F	18	CRI	não	140	M	1	AREB-t	sim
91	F	18	CRI	não	141	F	17	AREB-t	sim
92	M	7	CRI	não	142	M	13	AREB-t	sim
93	M	4	CRI	não	143	M	12	AREB-t	sim
94	F	18	CRI	não	144	M	17	AREB-t	sim
95	M	14	CRI	não	145	F	9	AREB-t	sim
96	M	9	CRI	não	146	F	11	AREB-t	não
97	F	2	CRI	não	147	M	5	AREB-t	não
98	F	9 meses	CRI	não	148	M	12	AREB-t	sim
99	F	9	CRI	não	149	F	8	AREB-t	sim
100	F	10	CRI	não	150	M	2	AREB-t	sim
101	F	10	AREB	sim	151	M	1	AREB-t	não
102	F	1	AREB	sim	152	M	9	AREB-t	não
103	F	7	AREB	não					
104	F	2	AREB	sim					
105	M	16	AREB	sim					
106	F	7	AREB	sim					
107	F	14	AREB	sim					
108	F	13	AREB	não					
109	M	12	AREB	sim					
110	F	6	AREB	sim					
111	M	14	AREB	sim					
112	F	9	AREB	não					
113	M	9 meses	AREB	não					
114	M	2	AREB	não					
115	M	4	AREB	não					
116	M	2	AREB	sim					
117	M	3 meses	AREB	não					
118	M	4	AREB	não					
119	M	11	AREB	não					
120	M	15	AREB	não					
121	F	18	AREB	não					
122	F	8	AREB	não					
123	F	10	AREB	sim					
124	M	3	AREB	sim					
125	F	17	AREB	sim					
126	M	17	AREB	não					
127	M	6	AREB	sim					
128	F	5	AREB	sim					
129	M	4	AREB-t	sim					
130	M	1	AREB-t	sim					

ANEXO II



A(o): Dra. Teresa de Souza Fernandez Seixas
Pesquisador(a) Principal

Rio de Janeiro, 3 de maio de 2011.

Registro CEP nº 62/10 (Este nº. deve ser citado nas correspondências referentes a este estudo)

Título do Estudo: Estudo das Alterações Citogenéticas e Moleculares em Pacientes Adultos e Pediátricos com Síndrome Mielodisplásica Primária no Estado do Rio de Janeiro: Investigação de Biomarcadores de Diagnóstico e de Prognóstico

Prezado(a) Pesquisador(a),

Informo a composição do Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto Nacional de Câncer que analisou e aprovou o estudo acima especificado.

<i>Adriana Scheliga</i>	<i>Médica Oncologista Clínica HC I – Coordenadora</i>
<i>Alessandra Oliveira Marins</i>	<i>Enfermeira do Serv. de Pesq. Clínica - CGTC</i>
<i>Ana Lúcia Amaral Eisenberg</i>	<i>Médica Patologista – DIPAT</i>
<i>Ana Valéria Paranhos Miceli</i>	<i>Psicóloga do Serviço de Psicologia - HC I</i>
<i>André Marcelo Machado Soares</i>	<i>Teólogo / Filósofo Extra INCA</i>
<i>Carlos Henrique D Silva</i>	<i>Médico HC IV – Coordenador Substituto</i>
<i>Célia Helena Fernandes Costa</i>	<i>Enfermeira da Oncologia – HC I</i>
<i>Cláudio Gustavo Stefanoff</i>	<i>Coordenador do Laboratório do BNT - CGTC</i>
<i>Cristiano Guedes Duque</i>	<i>Médico Oncologista - HCI</i>
<i>Danielle Nogueira Ramos</i>	<i>Doutora em Epidemiologia e Bioestatística - CONPREV</i>
<i>Eliana Teixeira Maranhão</i>	<i>Fisioterapeuta do Serviço de Fisioterapia – HC I</i>
<i>Héilton Spindola Antunes</i>	<i>Dentista do Serviço de Pesquisa Clínica - CGTC</i>
<i>Ivan da Costa Marques</i>	<i>Matemático Extra INCA</i>
<i>Maria de Fátima Batalha de Menezes</i>	<i>Enfermeira da Divisão de Enfermagem – HC I</i>
<i>Michele Quarti</i>	<i>Enfermeira - Extra INCA</i>
<i>Paulo Alexandre Mora</i>	<i>Médico Oncologista - HCII</i>
<i>Rosane Vianna Jorge</i>	<i>Doutora em Química Biológica da Divisão de Farmacologia - CGTC</i>
<i>Urquilei dos Santos Pinheiro</i>	<i>Representante de Usuários – CES/RJ</i>
<i>Walter Esteves Piñeiro</i>	<i>Advogado Extra INCA</i>
<i>Wilza Barbosa Felipe</i>	<i>Enfermeira da Comissão de Infecção Hospitalar - HC III</i>

Atenciosamente,


Dr. Carlos Henrique D. Silva
Coordenador Substituto do Comitê de Ética em Pesquisa
CEP-INCA

ANEXO III

CASE REPORT

Open Access



An uncommon t(9;11)(p24;q22) with monoallelic loss of *ATM* and *KMT2A* genes in a child with myelodysplastic syndrome/acute myeloid leukemia who evolved from Fanconi anemia

Viviane Lamim Lovatel^{1,5}, Daiane Corrêa de Souza¹, Tatiana Fonseca Alvarenga², Roberto R. Capela de Matos^{1,5}, Claudia Diniz¹, Marcia Trindade Schramm³, Juan Clinton Llerena Júnior⁴, Maria Luiza Macedo Silva^{1,5}, Eliana Abdelhay^{1,5} and Teresa de Souza Fernandez^{1,5*}

Abstract

Background: Myelodysplastic syndrome (MDS) is rare in the pediatric age group and it may be associated with inheritable bone marrow failure (BMF) such as Fanconi anemia (FA). FA is a rare multi-system genetic disorder, characterized by congenital malformations and progressive BMF. Patients with FA usually present chromosomal aberrations when evolving to MDS or acute myeloid leukemia (AML). Thus, the cytogenetic studies in the bone marrow (BM) of these patients have an important role in the therapeutic decision, mainly in the indication for hematopoietic stem cell transplantation (HSCT). The most frequent chromosomal alterations in the BM of FA patients are gains of the chromosomal regions 1q and 3q, and partial or complete loss of chromosome 7. However, the significance and the predictive value of such clonal alterations, with respect to malignant progress, are not fully understood and data from molecular cytogenetic studies are very limited.

Case presentation: A five-year-old boy presented recurrent infections and persistent anemia. The BM biopsy revealed hypocellularity. G-banding was performed on BM cells and showed a normal karyotype. The physical examination showed to be characteristic of FA, being the diagnosis confirmed by DEB test. Five years later, even with supportive treatment, the patient presented severe hypocellularity and BM evolution revealing megakaryocyte dysplasia, intense dyserythropoiesis, and 11% myeloblasts. G-banded analysis showed an abnormal karyotype involving a der(9)t(9;11)(p24;q?22). The FISH analysis showed the monoallelic loss of *ATM* and *KMT2A* genes. At this moment the diagnosis was MDS, refractory anemia with excess of blasts (RAEB). Allogeneic HSCT was indicated early in the diagnosis, but no donor was found. Decitabine treatment was initiated and well tolerated, although progression to AML occurred 3 months later. Chemotherapy induction was initiated, but there was no response. The patient died due to disease progression and infection complications.

(Continued on next page)

* Correspondence: teresafernandez@inca.gov.br

¹Bone Marrow Transplantation Center (CEMO), National Cancer Institute (INCA), Rio de Janeiro, Brazil

²Post-Graduate Program in Oncology, National Cancer Institute José de Alencar Gomes da Silva (INCA), Rio de Janeiro, Brazil

Full list of author information is available at the end of the article



© The Author(s). 2018 **Open Access** This article is distributed under the terms of the Creative Commons Attribution 4.0 International License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The Creative Commons Public Domain Dedication waiver (<http://creativecommons.org/publicdomain/zero/1.0/>) applies to the data made available in this article, unless otherwise stated.

(Continued from previous page)

Conclusions: Molecular cytogenetic analysis showed a yet unreported $\text{der}(9)\text{t}(9;11)(\text{p}24;\text{q}22),\text{der}(11)\text{t}(9;11)(\text{p}24;\text{q}22)$ during the evolution from FA to MDS/AML. The FISH technique was important allowing the identification at the molecular level of the monoallelic deletion involving the *KMT2A* and *ATM* genes. Our results suggest that this chromosomal alteration conferred a poor prognosis, being associated with a rapid leukemic transformation and a poor treatment response.

Keywords: Myelodysplastic syndrome, Acute myeloid leukemia, Fanconi anemia, Classical cytogenetics, FISH, $\text{T}(9;11)$, *ATM*, *KMT2A*

Background

Myelodysplastic syndrome (MDS) comprises a heterogeneous group of clonal neoplastic blood diseases characterized by ineffective hematopoiesis, peripheral cytopenias, bone marrow dysplasias and an increased risk of acute myeloid leukemia (AML) [1]. Pediatric MDS is an uncommon disorder accounting for 4–9% of hematologic malignancies [2, 3] and it may be associated with inherited bone marrow failure (BMF) disorders such as Fanconi Anemia (FA) [4].

First described in 1920 by the pediatrician Guido Fanconi [5], nowadays, it is known that FA is a cancer-prone chromosomal instability disorder with diverse clinical symptoms. The congenital anomalies may include skeletal defects, classically abnormal thumb or radius, short stature, café-au-lait spots and endocrinopathies. FA is a rare autosomal and X-linked genetic disease, with a wide variety of symptoms, characterized by congenital abnormalities, progressive BMF and increased cancer risk, which can be difficult to diagnose [5–7].

At the molecular level, 21 FA-related genes that constitute FA-BRCA pathway were identified [6]. Proteins encoded by FA-related genes play important roles in various cellular functions, including DNA repair, detoxification of reactive oxygen species and aldehydes, energy metabolism and both pro-inflammatory and myelosuppressive cytokine homeostasis [8].

Since the first clinical report of FA, important laboratory and clinical advances were incorporated in the diagnosis and treatment, such as the DEB test and the application of HSCT, with a low dosage chemotherapy regimen for children with FA [9–11].

Supportive care using hematopoietic growth factors such as EPO, G-CSF or androgens such as oxymetholone to boost blood cell production, provides transient benefit in some patients. Although, the allogeneic HSCT remains the main treatment approach to advanced marrow failure in FA patients [11, 12]. In this context, some preclinical studies using gene therapy in an attempt to improve the life quality and survival of patients with FA have been performed [12].

Cytogenetic studies in the bone marrow have an important role in the therapeutic decision, mainly in the

indication for HSCT. A better understanding of the clinical relevance and biological implications of clonal chromosomal alterations in FA patients was achieved over the last decade by the incorporation of molecular cytogenetic technologies in addition to classical karyotyping [11, 13]. This has led to the identification of some specific chromosomal alterations in FA patients, their prognostic value and association with the risk of evolution to MDS and/or AML. The most frequent chromosomal alterations in bone marrow of patients with FA are gains of the chromosomal regions 1q and 3q, and partial or complete loss of chromosome 7. Besides, monosomy 7 and $\text{del}(7\text{q})$ have been associated with poor prognosis and progression to leukemia. A few reports also suggested that gains of 3q are associated with progression to MDS/AML and overall presenting poor prognosis [13, 14].

Alterations involving $\text{del}(11\text{q})$ are uncommon in FA and MDS, so the prognostic value of this alteration remains uncertain [13, 15]. In this region, there are genes such as Ataxia Telangiectasia Mutated gene [*ATM* (11q22)] and lysine methyltransferase 2A [*KMT2A* (11q23)] that have been described as having an important role in the pathogenesis of MDS. The *ATM* gene acts on the regulation of the cell cycle after a DNA damage is recognized [15, 16]. On the other hand, the *KMT2A* gene encodes a protein that is involved in chromatin remodeling and positively regulates multiple homeobox transcription factors, also it is highly associated with the development of AML [17].

Given the high incidence of hematological complications of FA patients, BM surveillance for morphological and cytogenetic changes provides an important contribution to the clinical decision [11]. However, there are only a few studies in patients with FA showing the bone marrow chromosomal alterations analyzed by classical and molecular cytogenetics associated with evolution to MDS and AML [13, 14, 17–19]. Here, we describe an uncommon yet unreported $\text{t}(9;11)(\text{p}24;\text{q}22)$ with monoallelic loss of *ATM* and *KMT2A* genes, defined by classical cytogenetic and FISH analysis, in a child with MDS/AML who evolved from FA associated with poor clinical outcome.

Case presentation

A five-year-old male patient with recurrent infections and persistent anemia was admitted at the National Cancer Institute, Rio de Janeiro, Brazil. Physical examination showed a small stature (<P2); hyperpigmentation around the eyes; enophthalmia; multiple cafe-au-lait spots; hypoplasia of the thenar eminence accompanies left thumb hypoplasia. Laboratory findings: Hb 9.1 g/dl (age-adjusted 13.5–18.0 g/dl), platelet count $40 \times 10^9/l$ ($150\text{--}400 \times 10^9/l$) and white blood cell count $7.6 \times 10^9/l$ (age-adjusted range $4\text{--}10 \times 10^9/l$). BM findings: hypocellularity and normal karyotype by G-banding, according to the International System form Human Cytogenomic Nomenclature (ISCN 2016) [20]. Clinical genetic exams were done at Medical Genetic Department, Fernandes Figueira National Institute, Oswaldo Cruz Foundation, Rio de Janeiro, Brazil. Chromosome breakage test cytogenetic analysis was performed in peripheral lymphocytes during 72 h of cultures exposed to DEB (0.1 $\mu\text{g/ml}$), according to Auerbach [9]. This analysis demonstrated spontaneous chromosome breakage - 0.16 breaks per cell (reference 0.00–0.08) and DEB-induced chromosome breakage - 2.32 breaks per cell (reference 0.00–0.08), confirming the FA diagnosis. He was hospitalized due to the persistent anemia and progressive neutropenia. Oxymetholone (50 mg/day) was the initial treatment. A partial hematological response was achieved, even with oxymetholone dose reductions due to liver toxicity. However, the hematological parameters worsened and erythropoietin (EPO) and granulocyte-colony stimulating factor (G-CSF) were associated, as well as danazol 200 mg/day was introduced. He also received multiple blood transfusions during the treatment but no satisfactory response was achieved. At this time, BM evaluation revealed dysplastic megakaryocytes, intense dyserythropoiesis and 11% of myeloblasts. Immunophenotypic analysis of BM cells also revealed 11% of myeloblasts expressing CD34/CD13/CD11b (54.25%), HLA-DR/CD33/CD7 (31.54%), dysplastic erythropoiesis (CD36/CD71/CD235a), dysgranulopoiesis (CD13/CD16/CD11b/Cd33/CD64/CD15,CD45) and monocytic lineage expressing CD14/CD64/CD36/HLA-DR,CD45. Cytogenetic analysis with G-band technique in bone marrow cells showed an abnormal karyotype: 46,XY,der(9)t(9;11)(p24;q?22)[9]/46,XY[12] (Fig. 1a). The diagnosis was MDS, refractory anemia with excess of blasts (RAEB). Fluorescence in situ hybridization (FISH) was performed to analyze some genes that may be altered during chromosomal rearrangement. So, we investigated the *CDKN2A* gene (located in 9p) and the *ATM* and *KMT2A* genes (located in 11q22 and 11q23, respectively), due to the important role they play during leukemogenesis. The FISH analysis for the *CDKN2A* gene showed two normal signals (Fig. 1b). It was observed a monoallelic loss of *KMT2A* and *ATM* genes

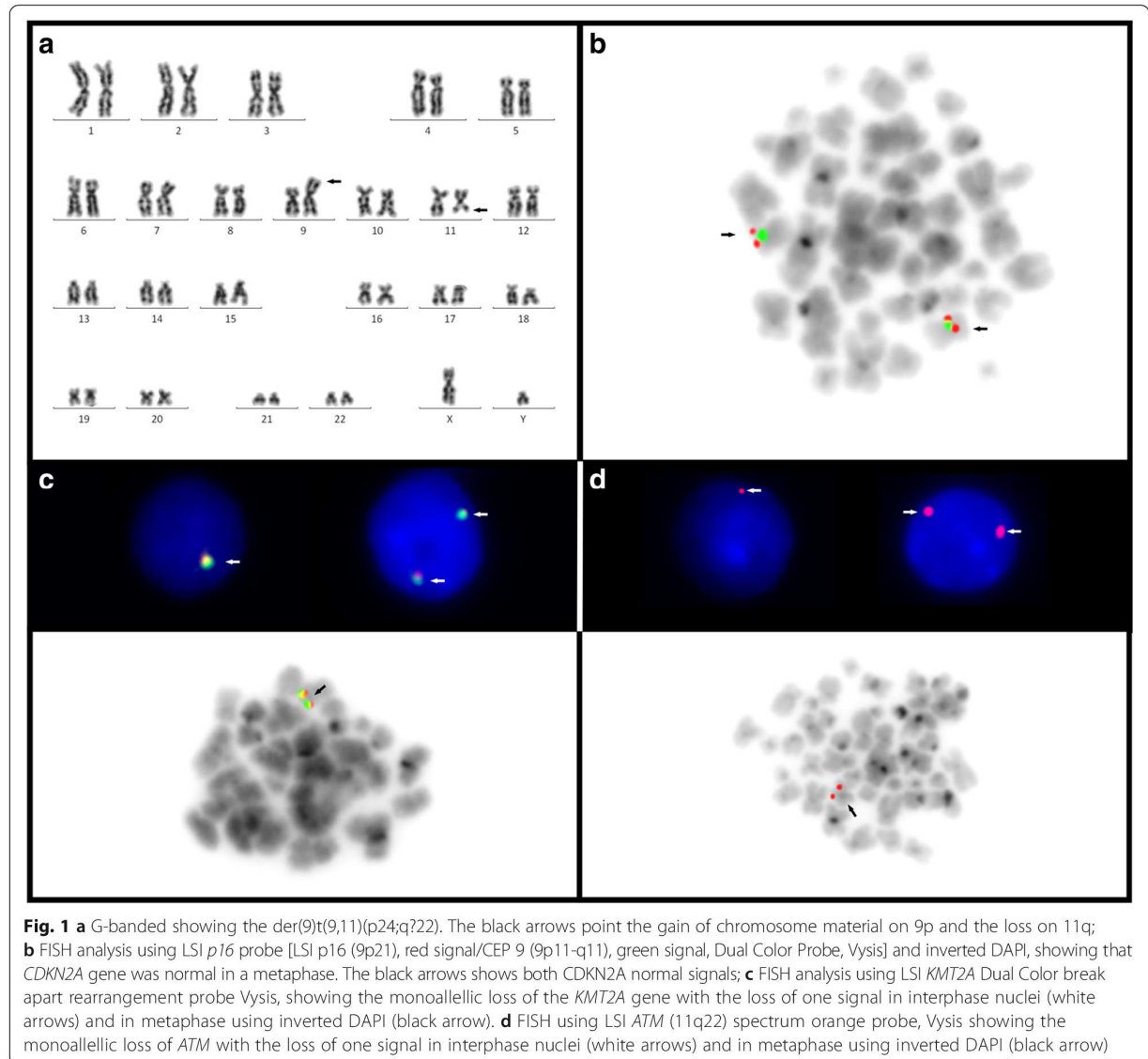
(Fig. 1c and d, respectively). The final karyotype with G-banded and FISH analysis, according to the ISCN 2016 [20], was: 46,XY,der(9)t(9;11)(p24;q?22),der(11)t(9;11)(p24;q?22)[9].ish del(11)(q22.3q23)(ATM-)(KMT2A-)[7]. Treatment with decitabine was initiated and well tolerated, although progression to AML occurred 3 months later. He had no remission with systemic chemotherapy. The patient died 8 months after the diagnosis of RAEB-t, due to disease progression and infectious complications. Allogeneic HSCT was indicated early in the diagnosis, but non-consanguineous parents were available and no donor was found.

Discussion and conclusions

Bone marrow failure occurs with a median age of 8 years and remains the primary cause of morbidity and mortality in FA [12]. The FA cells have a reduced fidelity in processing DNA double-strand breaks. This specific intrinsic susceptibility might, together with extrinsic factors, influence the course of the disease, resulting in the outgrowth of clones with chromosomal aberrations in the bone marrow cells [6]. Nevertheless, there is a cytogenetic clonal fluctuation in patients with FA, since clones often can disappear, reappear, evolve or be replaced by entirely new clones [10]. Therefore, the significance and the predictive value of such clonal alterations with respect to malignant progress are not fully understood [6].

Rochowski et al., (2012) hypothesized that unique bone marrow cytogenetic clones may distinguish patients with FA and AML from patients with de novo AML. Some chromosomal abnormalities as the gain of 1q, 3q, 13q and partial loss of 7q, 20q, 11q or complete loss of chromosome 7 are more frequent in patients with FA who showed progression to AML. While others like trisomy 8, t(8;21), t(9;11), t(6;9) and inv.(16) have been described exclusively in patients with de novo AML [21]. In this study, the t(9;11) was described in MDS/AML secondary from FA. Nevertheless, it is important to note that the breakpoints involved in this chromosomal translocation were not yet reported [22, 23]. In literature, the recurrent breakpoints involved in the t(9;11) in de novo AML patients were: t(9;11)(q34;q23) with *FNBP1/KMT2A* gene rearrangement [24]; t(9;11)(q34;p15) with *NUP98/PRRX2* [25]; t(9;11)(q34;q23) with *AF9q34/MLL* [26] t(9;11)(p22;p15) with *NUP98/PSIP1* [27]; and t(9;11)(p21;q23) with *MLLT3/KMT2A* [28]; t(9;11)(q34;q23) with *DAB2IP/KMT2A* [29].

In our study, the patient with FA showed the acquisition of a der(9)t(9;11)(p24;q?22), der(11)t(9;11)(p24;q?22) associated with evolution from MDS to AML. In FISH analysis, it was detected the monoallelic loss of *ATM* gene. The *ATM* gene is located at 11q22 region. This gene encodes a serine/threonine protein kinase, a critical enzyme in the regulation of the stress response to DNA damage, especially double-strand DNA breaks and it is



also involved in cell cycle control. The *ATM* gene appears to act as a “caretaker” of the genome [16]. The loss of *ATM* has been described as having contributed to the increased need for transfusion in patients with MDS associated with del(11q) [15]. Currently, it has been demonstrated the joint and reciprocal action of *ATM* and FA proteins in the DNA repair pathway during replication [30, 31].

In our study, the FISH analysis also showed the monoallelic loss of the *KMT2A* gene. The *KMT2A* locus is involved in more than 60 different chromosomal translocations in pediatric acute leukemias [17]. In AML, the t(9;11) usually results from *KMT2A* gene translocation, being the (p22;q23) the breakpoint frequently described [11]. Interestingly, it was detected the monoallelic deletion of *KMT2A* gene in our study.

Wang et al. showed that deletions of chromosome 11q lack cryptic *KMT2A* rearrangements in patients with MDS and suggested that loss of tumor suppressor genes located in 11q through deletions and secondary allelic loss of heterozygosity is likely more important in pathogenesis and disease progression [15]. The detection of all possible types of *KMT2A* cyto-molecular abnormalities is of key importance for the identification of biological subgroups, which may differ in clinical outcome [30].

In the literature, data on FISH studies in FA are quite limited [14]. In our study, the analysis by the FISH technique was essential allowing the identification at the molecular level of the monoallelic deletion involving the *KMT2A* and *ATM* genes. With the FISH results it was

possible to note that this chromosomal abnormality was not a simple reciprocal translocation involving the regions of chromosomes 9p24 and 11q22, but an unbalanced chromosomal alteration due to the monoallelic loss of *ATM* and *KMT2A* genes. FISH continues to be considered an important technique for molecular investigation of small or hidden chromosomal abnormalities [32].

Taken together, the monoallelic deletions of the genes *KMT2A* and *ATM*, probably, contributed to the defects in the genomic instability of the chromatin remodeling, conferring a poor prognosis, being associated to a rapid leukemic transformation and a poor response to treatment. Furthermore, with our results we contribute to the literature showing an yet unreported *der(9)t(9;11)(p24;q?22)*, *der(11)t(9;11)(p24;q?22)* with monoallelic loss of *ATM* and *KMT2A* genes.

Abbreviations

AA: Aplastic anemia; AML: Acute myeloid leukemia; *ATM*: Ataxia Telangiectasia Mutated gene; BM: Bone marrow; BMF: Bone marrow failure; *CDKN2*: Cyclin-dependent kinase inhibitor 2A; *DAB2IP* DAB2: Interacting protein; DEB: Diepoxybutane; EPO: Erythropoietin; FA: Fanconi anemia; FA-BCRA DNA: Repair associated; FANCD: Fanconi anemia complementation; FISH: Fluorescence in situ hybridization; *FNBP1*: Formin binding protein 1; G-CSF: Granulocyte-colony stimulating factor; HSCT: Hematopoietic stem cell transplantation; ICLs DNA: Interstrand cross-links; *JAK*: Janus kinase 2; *KMT2A*: Lysine methyltransferase 2A; MDS: Myelodysplastic syndrome; *MLL3*: Super elongation complex subunit; MMC: Mitomycin C; *NUP98*: Nucleoporin 98; *PRRX2*: Paired related homeobox 2; *PSIP1*: PC4 and SFRS1 interacting protein 1; RAEB: Refractory anemia with excess of blast

Acknowledgments

This study was supported by the Brazilian Ministry of Health (National Institute of Cancer/INCA, Brazil) and CNPq.

Funding

Funding information is not applicable/No funding was received.

Availability of data and materials

Please contact author for data requests.

Authors' contributions

VLL participated in the design of the study and in manuscript writing. DCS conducted the conventional cytogenetic analyses and performed the FISH; TFA provided the revision of the myelogram and participated in manuscript writing. RRCM participated in manuscript writing. CD performed the immunophenotyping studies. The clinical history of the patient with MDS and AML was reviewed by MS. JCLr performed the clinical history of the patient with FA and DEB analysis. MLMS, EA and TSF revised the manuscript critically for important intellectual content. The authors alone are responsible for the content and writing of the paper. All authors read and approved the final manuscript.

Ethics approval and consent to participate

This study was approved by the Ethics Committee of the Brazilian National Cancer Institute (CEP #088/07). Written institutional informed consent for the participation of the patient in this study was obtained from the patient's mother.

Consent for publication

The patient's mother has given their institutional informed written consent for publication of the present case report.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Publisher's Note

Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Author details

¹Bone Marrow Transplantation Center (CEMO), National Cancer Institute (INCA), Rio de Janeiro, Brazil. ²Pathology Department of National Cancer Institute (INCA) and Post-Graduation Program in Medical Sciences, Rio de Janeiro State University, Rio de Janeiro, Brazil. ³Hematology Department, National Cancer Institute (INCA), Rio de Janeiro, Brazil. ⁴Medical Genetic Department, Fernandes Figueira National Institute, Oswaldo Cruz Foundation, Rio de Janeiro, RJ, Brazil. ⁵Post-Graduate Program in Oncology, National Cancer Institute José de Alencar Gomes da Silva (INCA), Rio de Janeiro, Brazil.

Received: 11 May 2018 Accepted: 28 June 2018

Published online: 11 July 2018

References

- Bannon SA, DiNardo CD. Hereditary predispositions to myelodysplastic syndrome. *Int J Mol Sci*. 2016;17:838.
- Niemeyer CM, Baumann I. Myelodysplastic syndrome in children and adolescents. *Semin Hematol*. 2008;45:60–70.
- Xavier AC, Kutny M, Costa LJ. Incidence and outcomes of paediatric myelodysplastic syndrome in the United States. *Br J Haematol*. 2018;180:898–901.
- Hasle H, Niemeyer CM. Advances in the prognostication and management of advanced MDS in children. *Br J Haematol*. 2011;154:185–95.
- Lobitz S, Velleuer E. Guido Fanconi (1892-1979): a jack of all trades. *Nat Rev Cancer*. 2006;6:893–8.
- Mamrak N, Shimamura A, Howlett NG. Recent discoveries in the molecular pathogenesis of the inherited bone marrow failure syndrome Fanconi anemia. *Blood Rev*. 2017;31:93–9.
- Ostra AB, Nieuwint AWM, Joenje H, Winter JP. Diagnosis of Fanconi Anemia: chromosomal breakage analysis. *Anemia* 2012; ID. 238731:1–9.
- Savage SA, Dufour C. Classical inherited bone marrow failure syndromes with high risk for MDS and AML. *Semin Hematol*. 2017;4:105–14.
- Auerbach AD. Diagnosis of Fanconi anemia by diepoxybutane analysis. *Curr Protoc Human Genet*. 2016;85:1–17.
- Alter BP. Inherited bone marrow failure syndromes: considerations pre post transplant. *Blood*. 2017;130:2257–64.
- Dufour C. How I manage patients with Fanconi anemia. *Br J Haematol*. 2017;178:32–47.
- Müller LU, Williams DA. Finding the needle in the haystack: hematopoietic stem cells in Fanconi anemia. *Mutat Res*. 2009;31:141–9.
- Meyer S, Neitzel H, Tonnies H. Chromosomal aberrations associated with clonal evolution and leukemic transformation in Fanconi anemia: clinical and biological implications. *Anemia*. 2012;ID349837:1–6.
- Mehta PA, Harris RE, Davies KMO, Mueller R, Lampkin B, et al. Numerical chromosomal changes and risk of development of myelodysplastic syndrome – acute myeloid leukemia in patients with Fanconi anemia. *Cancer Genetics*. 2010;203:180–6.
- Wang SA, Abruzzo LV, Hasserjian RP, Zhang L, Hu Y, Zhang Y, et al. Myelodysplastic syndromes with deletions of chromosome 11q lack cryptic MLL rearrangement and exhibit characteristic clinicopathologic features. *Leuk Res*. 2011;35(3):351–7.
- Khanna KK. Cancer risk and the ATM gene: a continuing debate. *J Natl Cancer Inst*. 2000;92:795–802.
- Borges MLR, Matos RRC, et al. Molecular cytogenetic approach to characterize novel and cryptic chromosome abnormalities in childhood myeloid malignances of Fanconi anemia. *J Pediatr Hematol Oncol*. 2017;39:e85–91.
- Quentin S, Cucchini W, Ceccaldi R, Nibourel O, Pondarre C, Pagès MP, et al. Myelodysplasia and leukemia of Fanconi anemia are associated with a specific pattern of genomic abnormalities that includes cryptic RUNX1/AML1 lesions. *Blood*. 2011;117:e161–70.
- Cioc AM, Wagner JE, Mac Millian ML, DeFor T, Hirsch B. Diagnosis of myelodysplastic syndrome among a cohort of 119 patients with Fanconi anemia: morphologic and cytogenetic characteristics. *Am J Clin Pathol*. 2010;133:92–100.

20. McGowan-Jordan J, Simons A, Schmid M, editors. ISCN 2016: an international system for human cytogenetic nomenclature. Basel: Karger; 2016.
21. Rochowski A, Olson SB, Alonzo TA, Gerbing RB, Lange BJ, Alter BP. Patients with Fanconi Anemia and AML have different cytogenetic clones than *de novo* cases of AML. *Pediatr Blood Cancer*. 2012;59(5):922–4.
22. Huret JL, Ahmad M, Arsaban M, Bernheim A, Cigna J, Desangles F, et al. Atlas of genetics and cytogenetics in oncology and Hematology 2013. *Nucleic Acids Res*. 2013 (Database issue):D920-4PMID:23161685.
23. Meyer C, Burmeister T, Gröger D, Tsaour D, Fechina L, et al. The MLL recombinome of acute leukemias in 2017. *Leukemia*. 2018;32:273–84.
24. Fuchs U, Borkhardt A. t(9;11)(q34;q23) FBP17/MLL. *Atlas of Genetics and Cytogenetics in Oncology and Hematology*. 2001;5(3):200–201.
25. Huret, JL. t(9;11)(q34;p15). *Atlas of Genetics and Cytogenetics in Oncology and Hematology*. 2005;9(1):32–33.
26. von Bergh ARM. t(9;11)(q34;q23)AF9q34/MLL. *Atlas of Genetics and Cytogenetics in Oncology and Hematology*. 2006;10(1):22–23.
27. Morerio C, Panarello C. t(9;11)(p22;p15). *Atlas of Genetics and Cytogenetics in Oncology and Hematology*. 2007;11(4):322–323.
28. Knijnenburg J, Beverloo HB. t(9;11)(p21;q23) KMT2A/MLLT3. *Atlas of Genetics and Cytogenetics in Oncology and Hematology*. in press.
29. Kühn MWM, Bullinger L, Gröschel S, Krönke J, Edelmann J, Rucker FG, et al. Genome-wide genotyping of acute myeloid leukemia with translocation t(9;11)(p22;q23) reveals novel recurrent genomic alterations. *Haematologica*. 2014;99:e133–5.
30. Taniguchi T, Garcia-Higuera I, Xu B, Andreassen PR, Gregory RC, Kim S, et al. Convergence of the Fanconi Anemia and Ataxia telangiectasia signaling pathways. *Cell*. 2002;109:459–72.
31. Nepal M, Che R, Zhang J, Ma C, Fei P. Fanconi Anemia Signaling and Cancer. *Trends Cancer*. 2017;3:840–56.
32. Song Q, Peng M, Chu Y, Huang S. Techniques for detecting chromosomal aberrations in myelodysplastic syndromes. *Oncotarget*. 2017;8:62716–29.

Ready to submit your research? Choose BMC and benefit from:

- fast, convenient online submission
- thorough peer review by experienced researchers in your field
- rapid publication on acceptance
- support for research data, including large and complex data types
- gold Open Access which fosters wider collaboration and increased citations
- maximum visibility for your research: over 100M website views per year

At BMC, research is always in progress.

Learn more biomedcentral.com/submissions



ANEXO IV

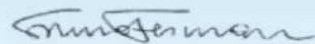


Certificamos que o trabalho

SÍNDROME MIELODISPLÁSICA PEDIÁTRICA: UM MODELO DE ESTUDO DAS VIAS DE TRANSFORMAÇÃO LEUCÊMICA ATRAVÉS DA BUSCA DE BIOMARCADORES DE DIAGNÓSTICO E DE PROGNÓSTICO.

dos autores VIVIANE LAMIM LOVATEL, ELIANE FERREIRA RODRIGUES, RITA DE CÁSSIA TAVARES, ALEXANDRE GUSTAVO APA, ELAINE SOBRAL DA COSTA, CECÍLIA DE SOUZA FERNANDEZ, ELIANA ABDELHAY, SHEILA COELHO SOARES LIMA, TERESA DE SOUZA FERNANDEZ foi contemplado com o prêmio RHOMES AUR no **XV Congresso Brasileiro de Oncologia Pediátrica**, realizado de 15 a 19 de novembro, no centro de convenções do Hotel Windsor Barra, Rio de Janeiro/RJ.

Rio de Janeiro, 19 de novembro de 2016



Dra. Sima Ferman

Presidente do XV Congresso Brasileiro de Oncologia Pediátrica



Dra. Teresa Cristina Cardoso Fonseca

Presidente da Sociedade Brasileira de Oncologia Pediátrica



ANEXO V



Ribeirão Preto, 26 de setembro de 2017.

Informamos que o trabalho científico abaixo foi selecionado como o **Melhor Trabalho em Hematologia Pediátrica** no **Congresso Brasileiro de Hematologia, Hemoterapia e Terapia Celular – HEMO 2017**, a ser realizado no período de 8 a 11 de novembro de 2017 no Expotrade Convention Center em Curitiba/PR.

- **Título:** ESTUDO DAS ALTERAÇÕES EPIGENÉTICAS EM PACIENTES PEDIÁTRICOS COM SÍNDROME MIELODISPLÁSICA E SUA ASSOCIAÇÃO COM O CARIÓTIPO E AS CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS
- **Autores:** Lovatel VL, Rodrigues EF, Fernandez CS, Tavares RC, Apa AG, Costa ES, Abdelhay E, Lima SCS, Fernandez TS

A handwritten signature in black ink, reading "Renata Medina Lima", is written over a dashed horizontal line.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE HEMATOLOGIA, HEMOTERAPIA E TERAPIA CELULAR

Rua Tenente Catão Roxo, 2501 – Campus USP

14051-140 – Ribeirão Preto – SP - Brasil

CNPJ: 11.422.382/0002-49

Inscrição Estadual – Isenta

