



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
FACULDADE DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE MEDICINA CLÍNICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS MÉDICAS**

JULIANA CORDEIRO DE SOUSA

**FATORES REGULADORES DE INTERFERON (IRFS) EM PACIENTES COM
SÍNDROME MIELODISPLÁSICA**

FORTALEZA

2015

JULIANA CORDEIRO DE SOUSA

**FATORES REGULADORES DE INTERFERON (IRFS) EM PACIENTES COM
SÍNDROME MIELODISPLÁSICA**

Tese ou Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Ciências Médicas. Área de concentração: Doenças Crônicas.

Orientador: Prof. Dr. Ronald Feitosa Pinheiro.

Fortaleza

2015

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca Universitária

Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

S697f Sousa, Juliana Cordeiro de Sousa.
 Fatores Reguladores de Interferon (IRFs) em pacientes com Síndrome Mielodisplásica /
 Juliana Cordeiro de Sousa Sousa. – 2015.
 192 f. : il. color.

 Tese (doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina, Programa
 de Pós-Graduação em Ciências Médicas, Fortaleza, 2015.

 Orientação: Prof. Dr. Ronald Feitosa Pinheiro.

 1. Fatores Reguladores de Interferon . 2. Síndromes Mielodisplásicas . 3. Metilação de
 DNA . 4. Vigilância Imunológica . I. Título.

CDD 610

Juliana Cordeiro de Sousa

**FATORES REGULADORES DE INTERFERON (IRFS) EM PACIENTES COM
SÍNDROME MIELODISPLÁSICA**

Tese ou Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Ciências Médicas. Área de concentração: Doenças Crônicas.

Aprovada em: 20/07/2015.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Ronald Feitosa Pinheiro (Orientador)
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof(a). Dr(a). Silvia Maria Meira Magalhães
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof(a). Dr (a). Carolina Bárbara Belli
Academia Nacional de Medicina – Buenos Aires- Argentina

Prof(a). Dr (a). Lorena Lobo de Figueiredo Pontes
Faculdade de Medicina – USP – Ribeirão Preto (FMRP)

Prof(a). Dr (a). Maria de Lourdes Ferrari Chauffaille
Faculdade de Medicina da Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP)

A Deus, que me sustentou e me deu forças
para concluir esse trabalho

Aos meus pais, Lucio Rubens de Sousa e
Veralucia de Paiva Cordeiro,

A minha irmã, Ruani Cordeiro de Sousa,

Ao meu esposo, Eduardo Gomes Sá,

que são minha vida, meu sustento e nunca
mediram esforços para me apoiar e sempre
acreditar que sou capaz.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, **Prof. Dr. Ronald Feitosa Pinheiro**, por ter aceitado o desafio de me acompanhar e por ter me dado a oportunidade de desenvolver esse trabalho. Além de ter me ensinado com dedicação durante esses nove anos, por ter contribuído com valiosos ensinamentos e seu exemplo de vida em minha caminhada. O senhor é um grande exemplo de força para mim.

À **Profa. Dra. Silvia Maria Meira Magalhães** por ter me recebido com carinho em seu grupo, ter me dado a oportunidade de conhecer o Dr. Ronald Pinheiro e por ter estado presente quando precisamos de alguma ajuda. Sem a senhora, hoje, eu não estaria aqui. Meu sincero agradecimento e respeito profissional.

À **Dra. Lorena Lobo de Figueiredo Pontes** pela colaboração essencial neste trabalho. Pela paciência, disponibilidade e ajuda durante o período que estive em seu laboratório. Por toda dedicação e compromisso no desenvolvimento deste trabalho.

Ao **Dr. Daniel Onofre Vida**, por ter sido tão receptivo ao me acolher em seu grupo e por ter contribuído sobremaneira com suas valiosas sugestões. Por ter me escutado e me incentivado em muitos momentos difíceis na execução desse trabalho.

Aos alunos de iniciação científica que participaram da minha tese, ressaltando **Marilia Costa Braga**, que se dedicaram em me apoiar durante o curso desse trabalho. Por todo o aprendizado em conjunto, por sempre termos confiado uns nos outros, pelas críticas científicas e pessoais. Também pela paciência nos meus momentos difíceis do doutorado. Sem vocês, esse trabalho não teria sido realizado. Tenho grande carinho e admiração por vocês e sempre estarei à disposição em qualquer momento para ajudá-los.

Aos meus amigos e colegas do CPOM, Hospital do Câncer de Barretos. Um agradecimento especial à **Camila Martinelli** que me ensinou o passo a passo da técnica para análise de metilação. Ao **André van Lengert**, pela inspiração, conselhos e conversas científicas. À **Aline Rocha**, pela companheira e amiga que sempre foi. À **Paula Félício** e **Weder Pereira** pelos momentos de descontração e apoio que sempre me deram. Muito obrigada por tudo e sinto muitas saudades de vocês.

Ao Núcleo de Apoio ao Pesquisador, ao bioestatístico e biólogo **Anderson Scorsato** que sempre me auxiliou e foi o responsável pela análise de todos os dados. Obrigada por toda a paciência que teve comigo. À **Thais**, que me auxiliou com o banco de dados e também sempre esteve disposta a colaborar com dedicação e afinco.

Aos meus amigos e colegas da USP de Ribeirão Preto. Em especial às amigas **Amelia Gois** e **Claudia Magnani**. Amélia por ter me ensinado tudo de RNA, por nunca ter desistido das minhas amostras, e Claudia, por ter me ensinado a parte de DNA. Principalmente, agradeço por todo cuidado que tiveram comigo. Vocês foram as minhas “mães” em Ribeirão. À **Barbara Santana**, pois desde o início contribuiu significativamente me ensinando a técnica de separação de células, tão essencial para o estudo dessa doença. À **Ana Silvia Yamada**, pela ajuda e conselhos. Às minhas amigas e companheiras de diversão, **Mariana Benício** e **Melina Athayde**, que ficarão para sempre guardadas no meu coração, apesar da distância. Obrigada pelos conselhos e pelo suporte em momentos difíceis. Ao grupo da citogenética, que desde o início me recebeu com carinho e atenção, em especial à **Dra Fabiola Traina**, à **Virginia Bertini**, à **Fernanda Borges**, à **Diva Hodniki** e à amiga **Ana Alves**.

A todos do grupo de Química de proteínas do Hemocentro de Ribeirão Preto, em especial à **Dra Carolina Thomé**, por ter se dedicado e insistido de todas as maneiras para a realização do Western blotting dessa tese.

Em especial, a todos os integrantes do laboratório de Citogenômica do Câncer: **Allan**, **Howard**, **Izabelle**, **Luiz Ivando**, **Roberta**, **Danilela** e aos ex-membros pelos momentos de diversão, brigas, mas também de alegria e amizade. Vocês tiveram um grande significado na minha vida e contribuíram muito para o meu crescimento.

Em especial, à minha amiga Julia Duarte que me recebeu em sua casa e que esteve em momentos importantes nessa caminhada.

À minha amiga Jamile Fialho que foi a primeira pessoa que abriu uma perceptiva para o meu desenvolvimento científico.

À CAPES, pelo apoio financeiro com a manutenção da bolsa de auxílio.

RESUMO

A síndrome mielodisplásica (SMD) é caracterizada por citopenias periféricas, defeitos na hematopoese, aumento da apoptose intramedular e risco de transformação para LMA. Vários avanços têm sido realizados para o entendimento da patogênese da SMD e há evidências de que a falha na medula óssea que ocorre na SMD seja mediada pela ativação anormal da sinalização do sistema imune inato. Os fatores reguladores de interferon (*IRF-Interferon Regulatory Factor*) formam uma família de fatores de transcrição que possuem um papel central na regulação de respostas imunes, diferenciação e proliferação de células hematopoéticas, regulação do ciclo celular, apoptose e oncogênese. Acredita-se que os IRFs possam ter um papel importante da patogênese da SMD. Portanto, o objetivo do presente trabalho foi avaliar o perfil de metilação e expressão dos genes dos IRFs em células da medula óssea (MO) de pacientes com SMD. A partir de amostras de 119 pacientes com diagnóstico de SMD foi realizado o estudo da expressão gênica, por PCR em tempo real e da metilação por QMSP (*quantitative methylation specific PCR*) dos nove membros da família dos IRFs. A expressão dos genes *IRF2*, *IRF3*, *IRF7* e *IRF8* foram diferentes entre células de MO de pacientes com SMD e indivíduos saudáveis ($p=0,002$; $0,002$; $0,028$ e $0,016$, respectivamente). Um maior nível de expressão do *IRF1* foi associado a pacientes com medula hipocelular ($p=0,018$). Os genes *IRF3*, *IRF7* e *IRF8* foram associados a pacientes com citopenias no sangue periférico ($p=0,028$; $0,001$; $0,008$, respectivamente). Por outro lado, a metilação dos *IRF1*, *IRF2*, *IRF3*, *IRF6* e *IRF8* foi associada a características de maior risco em SMD, tais como, formas avançadas, cariótipo desfavorável, citopenias, blastos acima de 5% e com categorias de alto risco estabelecidas pelo IPSS, R-IPSS e WPSS. A análise multivariada revelou que pacientes com maior expressão do *IRF3* apresentaram maior sobrevida global ($p=0,001$), enquanto os pacientes com uma maior expressão do *IRF5* apresentaram 5,4 mais chances de evoluir para LMA ($p<0,001$ IC95%=1.098-26.829) e 9 vezes mais chance de vir a óbito ($p=0,001$; IC95%=2,39-32,69). Ambigualmente, pacientes com o *IRF5* metilado possuíam 4 vezes mais chance de vir a óbito ($p=0,041$; IC95%=1,066-20.192). Podemos concluir que a expressão e a metilação dos IRFs podem ter grande impacto prognóstico nessa doença. A expressão do *IRF3* é um marcador de prognóstico favorável, enquanto a expressão e a metilação do *IRF5* são marcadores de prognóstico desfavorável em SMD.

Palavras-chave: Síndrome Mielodisplásica, Fatores reguladores de Interferon, Metilação do DNA

ABSTRACT

Myelodysplastic Syndrome (MDS) is characterized by peripheral cytopenias, haematopoiesis ineffective, high levels of intramedullary apoptose and risk of transformation to AML. Various advances have performed for understanding the pathogenesis of MDS and various evidences that bone marrow failure occurs in MDS mediated by abnormal signalling of the innate immune system. The interferon regulatory factors (IRF-Interferon Regulatory Factor) is a family of transcription factors play a central role in regulating immune responses, differentiation and proliferation of hematopoietic cells, cell cycle regulation, apoptosis and oncogenesis. The aim of this study was to evaluate the profile of methylation and expression of IRFs gene in bone marrow cells patients with myelodysplastic syndrome. From samples of 119 patients diagnosed with MDS was evaluated of expression by real-time PCR and methylation by quantitative methylation specific PCR in real time of the nine family members of IRFs the expression of genes IRF2, IRF3, and IRF7 IRF8 were different between BM cells of MDS patients ($p = 0.002, 0.002, 0.028$ and 0.016 , respectively). A higher level of expression of IRF1 was associated in patients with hypocellular bone marrow ($p = 0.018$). The expression of *IRF2* gene associated strong association with AR subtype ($p = 0.002$). The IRF3, IRF7 and IRF8 genes have been associated with patients with cytopenia ($p = 0.028; 0.001; 0.008$, respectively). Furthermore, methylation of *IRF1, IRF2, IRF3, IRF5, IRF6* and *IRF8* was associated with higher risk characteristics in SMD, such as advanced forms, unfavorable karyotype, cytopenias, blasts above 5% and high risk categories established by the IPSS, IPSS-R and WPSS. Multivariate analysis revealed that patients with higher expression of IRF3 had higher overall survival ($p = 0.001$), whereas patients with a greater expression of *IRF5* had 5.4 more likely to progress to AML ($p < 0.001$ 95% CI 1.098- 26 829) and nine times more likely to come to death ($p = 0.001$, 95% CI 2.39 to 32.69). Ambiguously, patients with methylated *IRF5* had 4 times more than the patient's chance come to death ($p = 0.041$, 95% CI 1.066 to 20,192). In conclusion that the expression and methylation of IRFs can have great impact prognosis in this disease. The expression of *IRF3* is a favorable prognostic marker, as an expression and methylation of IRF5 are unfavorable prognostic markers in MDS.

Keywords: Myelodysplastic syndrome, interferon regulatory factors, DNA methylation

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - Distribuição dos pacientes portadores de SMD, estratificados de acordo com a classificação de grupos citogenéticos estabelecido pelo IPSS E R-IPSS.
- Figura 2 - Distribuição dos pacientes portadores de SMD, estratificados de acordo com as classes de risco estabelecido pelo IPSS, R-IPSS e WPSS.
- Figura 3 - Expressão gênica do gene *IRF1* em células de medula total entre pacientes medula hipocelular, normocelular e hiper celular de acordo com a BMO.
- Figura 4 - Perfil de expressão gênica do gene *IRF2* em células de medula total de paciente portadores de SMD.
- Figura 5 - Perfil de expressão gênica do gene *IRF2* em células de medula total de paciente portadores de SMD de acordo com a classificação OMS.
- Figura 6 - Expressão do gene *IRF4* em pacientes de acordo com a presença e ausência de sideroblastos em anel.
- Figura 7 - Perfil de expressão gênica do gene *IRF6* em células de medula total de paciente portadores de SMD de acordo com a classificação OMS.
- Figura 8 - Comparação entre a expressão gênica de *IRF6* em células de medula total de paciente portadores de SMD de acordo com as variáveis citogenéticas.
- Figura 9 - Comparação entre a expressão gênica do gene *IRF8* em células de medula total entre pacientes com cariótipo normal, cariótipo alterado sem aneuploidia e cariótipo alterado com aneuploidia.
- Figura 10 - Expressão do gene *IRF8* de acordo com o risco dos pacientes com SMD.
- Figura 11 - Expressão do gene *IRF2* em amostras de pacientes com SMD ao diagnóstico e ao seguimento.
- Figura 12 - Análise de sobrevida global de acordo com variáveis moleculares, metilação da região promotora dos *IRFs*, de células de medula total de pacientes com SMD.
- Figura 13 - Análise de sobrevida global de acordo com variáveis moleculares, expressão do

mRNA dos *IRFs* de células de medula total de pacientes com SMD

Figura Resumo- Hipótese do papel dos IRFS na patogênese da SMD.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Classificação dos subtipos de SMD de acordo com os critérios da OMS de 2008.

Tabela 2: Sistema Internacional de Escore Prognóstico (IPSS) para SMD.

Tabela 3: Sistema de classificação de acordo com o risco citogenético de acordo com os critérios do R-IPSS.

Tabela 4. IPSS-R – Classificação de risco e pontuação.

Tabela 5: Critérios da classificação do WPSS.

Tabela 6 - Protocolo de exclusão de causas não clonais que, com frequência, cursam com citopenias e/ou displasias na medula. Protocolo aplicado à pacientes que se encontram sob investigação de SMD.

Tabela 7: Lista dos genes utilizados na avaliação da expressão gênica por PCR em Tempo Real.

Tabela 8 - Iniciadores e sondas para avaliação do perfil de metilação da região promotora dos genes dos *IRFs* e gene de referência.

Tabela 9: Variáveis clínicas dos pacientes com SMD.

Tabela 10. Frequência das modalidades terapêuticas aplicadas em com paciente com SMD.

Tabela 11. Pontos de corte estabelecidos pela curva ROC ou maior valor do grupo controle para cada gene para a análise categórica da metilação.

Tabela 12. Pontos de corte estabelecidos pela curva ROC ou mediana do grupo controle de cada gene para a análise categórica da expressão gênica dos IRFs.

Tabela 13. Análise expressão do gene *IRF1* de acordo com as variáveis clínicas dos pacientes com SMD.

Tabela 14. Análise qualitativa da metilação da região promotora do gene *IRF1* de acordo com as variáveis clínicas dos pacientes com SMD.

Tabela 15. Análise expressão do gene *IRF2* de acordo com as variáveis clínicas dos pacientes com SMD.

Tabela 16. Análise qualitativa da metilação da região promotora do gene *IRF2* de acordo com as variáveis clínicas dos pacientes com SMD.

Tabela 17. Análise expressão do gene *IRF3* de acordo com as variáveis clínicas dos pacientes com SMD.

Tabela 18. Análise qualitativa da metilação da região promotora do gene *IRF3* de acordo com as variáveis clínicas dos pacientes com SMD.

Tabela 19. Análise expressão do gene *IRF4* de acordo com as variáveis clínicas dos pacientes com SMD.

- Tabela 20. Análise expressão do gene *IRF5* de acordo com as variáveis clínicas dos pacientes com SMD.
- Tabela 21. Análise qualitativa da metilação da região promotora do gene *IRF5* de acordo com as variáveis clínicas dos pacientes com SMD.
- Tabela 22. Análise expressão do gene *IRF6* de acordo com as variáveis clínicas dos pacientes com SMD.
- Tabela 23. Análise qualitativa da metilação da região promotora do gene *IRF6* de acordo com as variáveis clínicas dos pacientes com SMD.
- Tabela 24. Análise expressão do gene *IRF7* de acordo com as variáveis clínicas dos pacientes com SMD.
- Tabela 25. Análise qualitativa da metilação da região promotora do gene *IRF7* de acordo com as variáveis clínicas dos pacientes com SMD.
- Tabela 26. Análise expressão do gene *IRF8* de acordo com as variáveis clínicas dos pacientes com SMD.
- Tabela 27. Análise qualitativa da metilação da região promotora do gene *IRF8* de acordo com as variáveis clínicas dos pacientes com SMD.
- Tabela 28. Análise expressão do gene *IRF* de acordo com as variáveis clínicas dos pacientes com SMD.
- Tabela 29. Nível de expressão dos genes *IRFs* nos pacientes ao diagnóstico e ao seguimento dos pacientes com síndrome mielodisplásica.
- Tabela 30. Análise univariada das variáveis clínicas relacionada a evolução para LMA.
- Tabela 31. Análise univariada das variáveis moleculares relacionada a evolução para LMA.
- Tabela 32. Estimativas de sobrevida global em 6, 12 e 24 meses em relação a variáveis epidemiológicas e clínicas.
- Tabela 33. Estimativas de sobrevida global em 6, 12 e 24 meses em relação a variáveis moleculares, expressão gênica e metilação da região promotora dos *IRFs* de células de medula total de pacientes com SMD.
- Tabela 34. Regressão múltipla de COX para a sobrevida global.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACTB	β -actina
AR	Anemia refratária
AREB	Anemia refratária com excesso de blastos
AREB-t	AREB em transformação
ARSA	Anemia refratária com sideroblastos em anel
ARSA-T	ARSA com trombocitopenia
B2M	β 2-microglobulina
cDNA	DNA complementar
CRDM	Citopenia refratária com displasia multilinhagem
CRDM-AS	CRDM com sideroblastos em anel
CRDU	Citopenia refratária com displasia unilinhagem
Ct	Ciclo <i>threshold</i>
CTH	Células-tronco hematopoéticas
CTO	Controle
Del	Deleção
DNA	Ácido desoxirribonucléico
DNMT	<i>DNA methyltransferase</i>
dNTP	Desoxirribonucleotídeos trifosfatados
FAB	Franco-americano-britânico
GAPDH	Gliceraldeído fosfato desidrogenase
GTG	Tripsina-Giemsa
Hb	Hemoglobina
IFN- γ	<i>Interferon-gamma</i>
IL	<i>Interleukin</i>
IPSS	<i>International Prognostic Score System</i>
IRF1	<i>Interferon regulatory factor 1</i>
IRF2	<i>Interferon regulatory factor 2</i>
IRF3	<i>Interferon regulatory factor 3</i>
IRF4	<i>Interferon regulatory factor 4</i>
IRF5	<i>Interferon regulatory factor 5</i>
IRF6	<i>Interferon regulatory factor 6</i>
IRF7	<i>Interferon regulatory factor 7</i>
IRF8	<i>Interferon regulatory factor 8</i>
IRF8	<i>Interferon regulatory factor 9</i>
ISCN	<i>International system for human cytogenetic nomenclature</i>
LMA	Leucemia mielóide aguda
LMC	Leucemia mielóide crônica
mL	mililitros
mM	miliMolar
NF- κ B	<i>Nuclear factor kappa-B</i>
NR	Neutropenia refratária
OMS	Organização Mundial da Saúde
P53	<i>Protein 53</i>
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i>
RNA	Ácido ribonucleico
SMD	Síndrome mielodisplásica

SMD-U	<i>SMD unclassified</i>
SNP	<i>Single-nucleotide polymorphism</i>
TNF- α	<i>Tumor necrosis factor-alpha</i>
TP53	<i>Tumor protein 53</i>
UBC	<i>Ubiquitina C</i>

LISTA DE SÍMBOLOS

μL	microlitro
Co	graus Celsius
μL	Microlitro
Co	graus Celsius
ng	nanograma
nM	nanoMolar

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	15
1.1	Epidemiologia	15
1.2	Sistemas de Classificação	16
1.3	Citogenética em Síndrome Mielodisplásica	26
1.4	Patogênese da SMD	27
1.5	Diferenciação Hematopoética	32
1.6	Família de Fatores Reguladores de Interferon (IRFs)	33
1.7	Metilação do DNA e câncer	41
<i>1.7.1</i>	<i>Bloqueio Epigenético de Genes Supressores Tumorais: Um fenômeno comum em neoplasias da Célula tronco Hematopoética</i>	42
2.	OBJETIVO	45
2.1	Objetivo geral	45
2.2	Objetivos específicos	45
3.	MATERIAIS E MÉTODOS	46
3.1	Seleção de Amostras	46
3.2	Coleta das amostras	47
3.3	Citogenética clássica	48
3.4	Isolamento das células mononucleares de medula óssea	49
3.5	Separação imunomagnética das células das subpopulações de células CD133⁺/CD34⁻ e CD133⁺/CD34⁺	50
3.6	Análise da pureza das subpopulações de células CD133⁺/CD34⁻ E CD133⁺/CD34⁺	51
3.7	Análise de Expressão do Genes <i>IRFs</i>	52
3.7.1	Extração do RNA Total	52
3.7.2	Quantificação de RNA	53
3.7.3	Reação da Polimerase em Cadeia por Transcriptase Reversa (RT-PCR)	53
3.7.4	PCR Quantitativo em Tempo Real (qPCR)	53
3.8	Análise de Metilação da Região Promotora dos Genes dos IRFS	56
<i>3.8.1</i>	<i>Extração de DNA de Células da Medula Óssea</i>	56
<i>3.8.2</i>	<i>Extração do DNA de Sangue Periférico</i>	57
<i>3.8.3</i>	<i>Quantificação de DNA</i>	57
<i>3.8.4</i>	<i>Tratamento do DNA Genômico com Bissulfito de Sódio</i>	58
<i>3.8.5</i>	<i>Metilação do DNA de Leucócitos in vitro</i>	59
<i>3.8.6</i>	<i>Desenho de Iniciadores e sondas Específicos</i>	60

3.8.7	<i>Análise de PCR Quantitativa Metilação Específica em Tempo Real (QMSP)</i>	63
3.8.8	<i>Purificação do produto de PCR para sequenciamento</i>	65
3.8.9	<i>Sequenciamento</i>	66
3.9	Análise Estatística	67
4.	RESULTADOS	69
4.1	Características epidemiológicas e clínicas dos pacientes portadores de SMD	69
4.1.1	<i>Citogenética clássica</i>	70
4.1.2	<i>Estratificações de risco dos pacientes com SMD</i>	71
4.2	Critérios da análise de metilação e expressão gênica de acordo com os tipos celulares	75
4.2.1	<i>Critérios para análise de metilação dos IRFs</i>	75
4.3	Critérios para análise de expressão gênica dos IRFs	78
4.4	Análise de metilação da região promotora e expressão dos genes <i>IRFs</i> a partir de amostras de medula total	82
4.4.1	<i>Gene <i>IRF1</i></i>	82
4.4.1.1	<i>Expressão do gene <i>IRF1</i></i>	82
4.4.1.2	<i>Metilação do gene <i>IRF1</i></i>	86
4.4.2	<i>Gene <i>IRF2</i></i>	89
4.4.2.1	<i>Expressão do gene <i>IRF2</i></i>	89
4.4.2.2	<i>Metilação do gene <i>IRF2</i></i>	94
4.4.3	<i>Gene <i>IRF3</i></i>	98
4.4.3.1	<i>Expressão do gene <i>IRF3</i></i>	98
4.4.3.2	<i>Metilação do gene <i>IRF3</i></i>	101
4.4.4	<i>Gene <i>IRF4</i></i>	101
4.4.4.1	<i>Expressão do gene <i>IRF4</i></i>	104
4.4.4.2	<i>Metilação do gene <i>IRF4</i></i>	104
4.4.5	<i>Gene <i>IRF5</i></i>	108
4.4.5.1	<i>Expressão do gene <i>IRF5</i></i>	108
4.4.5.2	<i>Metilação do gene <i>IRF5</i></i>	111
4.4.6	<i>Gene <i>IRF6</i></i>	114
4.4.6.1	<i>Expressão do gene <i>IRF6</i></i>	114
4.4.6.2	<i>Metilação do gene <i>IRF6</i></i>	119
4.4.7	<i>Gene <i>IRF7</i></i>	122
4.4.7.1	<i>Expressão do gene <i>IRF7</i></i>	122
4.4.7.2	<i>Metilação do gene <i>IRF7</i></i>	125
4.4.8	<i>Gene <i>IRF8</i></i>	128
4.4.8.1	<i>Expressão do gene <i>IRF8</i></i>	128
4.4.8.2	<i>Metilação do gene <i>IRF8</i></i>	133
4.4.9	<i>Gene <i>IRF9</i></i>	136
4.4.9.1	<i>Expressão do gene <i>IRF9</i></i>	136

4.4.9.2	Metilação do gene <i>IRF9</i>	136
4.4.10	<i>Análise da expressão dos genes IRFs no seguimento de pacientes com SMD</i>	139
4.4.11	<i>Regressão logística para risco de transformação para LMA</i>	141
4.4.12	<i>Análise de sobrevida em relação as características clínicas, perfil de metilação e expressão dos genes IRFs</i>	146
4.4.13	<i>Regressão múltipla de COX para análise de sobrevida global</i>	154
4.5	Níveis de metilação e expressão em célula CD34+ e medula total de pacientes com SMD	157
5.	DISCUSSÃO	158
6.	CONSIDERAÇÕES FINAIS	173
7.	CONCLUSÕES	176
8.	REFERÊNCIAS	177

1 INTRODUÇÃO

A síndrome mielodisplásica (SMD) compreende um grupo heterogêneo de doenças clonais da medula óssea (MO) caracterizadas por vários graus de citopenias periféricas associada a defeitos na hematopoese, displasias mieloides e risco de transformação para LMA (Swerdlow et al. 2008). Uma característica marcante da SMD é o aumento de apoptose na medula óssea associada a medula hiperploriferativa (hiperplasmática), embora em alguns casos ela possa ser normocelular e hipocelular.

O desenvolvimento da SMD ocorre através de múltiplos estágios e o curso clínico é dividido em várias fases distintas dependendo do número de linhagens displásicas envolvidas e a percentagem de blastos na medula óssea. A heterogeneidade de apresentações hematológicas, biologia da doença e prognóstico tornou a SMD uma das doenças mais desafiantes da hematologia (List et al., 2010).

1.1 Epidemiologia

A SMD acomete habitualmente idosos com idade, ao diagnóstico, entre 60 e 75 anos. A incidência em pacientes acima de 70 anos é maior que 40 casos por 100.000 pessoas/ano, sendo, portanto, uma doença incidente e trazendo sérias complicações para esta faixa etária (Mufti et al, 2004). Não há dados relativos à incidência e prevalência no Brasil. Porém, acredita-se que o número de casos seja bastante considerável devido a mediana de sobrevida do brasileiro ser de 72 anos e 4 meses conforme dados do Instituto Brasileiro de Estatística e Geografia (IBGE). O maior levantamento de casos do Brasil foi realizado por Magalhães et al., entre 2003 e 2007. Neste estudo, os pesquisadores avaliaram 476 casos de SMD de 12 instituições brasileiras e detectaram

uma mediana de idade de 68 anos, predomínio de pacientes de origem urbana e a grande maioria foi caracterizada como de baixo risco pelo IPSS.

A SMD pode ser caracterizada como primária ou secundária à terapêutica. A SMD primária tem aumentado sua incidência e prevalência principalmente devido ao envelhecimento da população mundial (aí incluindo-se a brasileira). A SMD secundária tem sido incidente devido ao aumento do índice de cura dos tumores sólidos tratados com esquemas combinados de quimioterapia e radioterapia (Solé et al, 2005).

1.2 Sistemas de Classificação

A heterogeneidade clínica da SMD levou o desenvolvimento de vários esquemas de classificação para identificar grupos de pacientes com característica similares, padrões de progressão e possíveis respostas comuns a terapias (Bejar et al, 2013). Estes modelos dependem de critérios clínicos (por exemplo, a dependência de transfusão) e laboratoriais (por exemplo, contagens de células no sangue periférico, os níveis de hemoglobina, porcentagem de blastos na medula óssea, citogenética e outros) para separar os pacientes em diversos grupos de prognóstico com diferentes sobrevidas e probabilidades de progressão leucêmica.

FAB

Em 1982, o grupo cooperativo Francês-Americano-Britânico (FAB) propôs a primeira categorização da SMD, levando em conta alguns parâmetros considerados de importância prognóstica como a porcentagem de blastos no sangue periférico e/ou Medula Óssea (MO), a presença de sideroblastos em anel, de bastões de Auer e o

percentual de monócitos (Bennett et al., 1982). A classificação FAB estabelece cinco subtipos para SMD: anemia refratária (AR), AR com sideroblasto em anel (ARSA), AR com excesso de blastos (AREB), AREB em transformação (AREB-t) e Leucemia Mielomonocítica crônica (LMMC) (Bennett et al., 1982). A classificação FAB foi dominante até o ano 2000, mas continua sendo usada até hoje para alguns propósitos como elegibilidade para ensaios clínicos, apresentação e indicação de drogas (Steensma et al, 2009).

OMS

O comitê da Organização Mundial de Saúde (OMS) propôs, em 2001, uma modificação na classificação FAB, incorporando características morfológicas e biológicas, como o grau da displasia da MO e citogenética, estratificando melhor a classificação entre a SMD e LMA (Jaffe et al. 2001; Senent et al.; 2012).

Na classificação da OMS, a porcentagem de blastos na medula óssea utilizada para o diagnóstico de LMA foi mudada de 30 para 20% (30% de blastos, referente a classificação da FAB). Foram excluídos os subtipos AREB-t e LMMC, este último foi enquadrado no grupo intermediário entre SMD e doenças mieloproliferativas crônicas. Foi criado o grupo citopenia refratária com displasias em múltiplas linhagens (CRDM), com maior grau de insuficiência medular e curso mais agressivo. A síndrome 5q- foi definida como um novo subtipo e a AREB foi dividida em 1 e 2, de acordo com a porcentagem de blastos na MO (Vassalo et al.; 2008).

Em 2008 a Organização Mundial de Saúde (OMS) publicou uma edição revisada e atualizada da classificação OMS (Swerdlow et al. 2008). A **Tabela 1** explica quais são os critérios de classificação dos subtipos de SMD de acordo com esta 4ª edição da classificação OMS.

Tabela 1. Classificação dos subtipos de SMD de acordo com os critérios da OMS de 2008.

Subtipo de SMD	Achados no sangue	Achados na MO
Citopenia refratária com displásica de única linhagem (CRDU): - Anemia refratária (AR) - Neutropenia refratária (NR) - Trombocitopenia refratária (TR)	- Unicitopenia ou bicitopenia; - <1% de blastos	- Displasia de uma única linhagem; - < 5% de blastos; - < 15% de sideroblastos em anel
Anemia refratária com sideroblastos em anel (ARSA)	- Anemia - Ausência de blastos	- Apenas displasia eritróide; - < 5% de blastos - ≥15% de sideroblastos em anel
Citopenia refratária com displasia de múltiplas linhagens (CRDM)	- Citopenia (s) - <1% de blastos - Ausência de bastonetes de Auer	- Displasia em duas ou mais linhagens - 5% de blastos - Ausência de bastonetes de Auer
Anemia refratária com excesso de blastos – 1 (AREB 1)	- Citopenia (s) - 5% de blastos - Ausência de bastonetes de Auer	- Displasia em duas ou mais linhagens - 5 a 9% de blastos - Ausência de bastonetes de Auer
Anemia refratária com excesso de blastos – 2 (AREB 2)	- Citopenia (s) - 5 a 19% de blastos - Pode haver presença de bastonetes de Auer	- Displasia em duas ou mais linhagens - 10 a 19% de blastos - Pode haver presença de bastonetes de Auer
Síndrome mielodisplásica inclassificável (SMD-i)	- Citopenia (s) - <1% de blastos	- Displasias - < 5% de blastos - Se não houver displasia, cariótipo associado a SMD.
SMD com del(5q) isolada	- Anemia - Contagem de plaquetas normal ou aumentada - <1% de blastos	- Aumento de megacariócito - < 5% de blastos - deleção 5q isolada - Ausência de bastonetes de Auer

Fonte: Adaptado de Swerdlow et al. 2008

Sistema de escore prognóstico

IPSS

Em 1997, Greenberg et al. criaram o Índice Internacional de Escore Prognóstico (IPSS) para SMD, o qual permite prever o risco de transformação leucêmica assim como a mediana de sobrevida esperada para cada caso. O sistema permite gerar uma pontuação que corresponde a um valor prognóstico. Para somatória de pontos é considerado porcentagem de blastos na medula óssea, número de citopenias periféricas e alteração no cariótipo. Como resultado, os pacientes são estratificados em grupos de risco: baixo (pontuação 0), Intermediário-I (pontuação 0,5-1), Intermediário-II (pontuação 1,5-2) e alto risco (pontuação > 2). Os quatro grupos mostram diferenças significativas na sobrevida global e risco de evolução para LMA. A sobrevida média varia de 5,7 anos para pacientes de baixo risco a 0,4 anos para pacientes de risco elevado (Greenberg et al.; 1997) (**Tabela 2**).

Greenberg et al (1997) demonstraram a importância das alterações citogenéticas na evolução dos pacientes ao dividirem essas alterações em grupos. Os casos com cariótipo indicativo de bom prognóstico (del (20q), del (5q), -Y e normal), de cariótipo desfavorável (alterações no cromossomo 7 e cariótipo complexo) e de cariótipo intermediário (outras alterações) possuem sobrevida média de 3.8, 0.8 e 2.4 anos, respectivamente. O IPSS inclui apenas um número limitado de alterações citogenéticas, incluindo apenas as cinco mais associadas a SMD.

O sistema de classificação IPSS é o mais utilizado, porém possui algumas limitações (Kasner et al.; 2009). É considerado um sistema simples de classificação por não levar em conta o grau de citopenias, aplicar apenas um terço das alterações citogenéticas e não ser preditivo para resultados referentes a SMD secundária (Komrokji et al.; 2013).

Tabela 2: Sistema Internacional de Escore Prognóstico (IPSS) para SMD.

		Escore		
Variáveis prognóstico	0	0,5	1	1,5
Número de citopenias	0-1	1-2	-	-
Cariótipo	Favorável	Intermediário	Desfavorável	-
Porcentagem de blastos na M.O.	<5	5-10	-	11-20
Escore total	Grupo de risco	Média de sobrevivência (anos)		
0	Baixo	5,7		
0,5-1,0	Intermediário I	3,5		
1,5-2,0	Intermediário II	1,2		
≥2,5	Alto	0,4		

Legenda: Citopenias nível de hemoglobina <10,0g/L, contagens de plaquetas <100X10⁹ e contagem absoluta de neutrófilos <1,8x10⁹/L. cariótipo: Favorável-normal, anomalias isoladas: - Y, del (5q), del (20q); Intermediário – outras alterações, Desfavorável- complexo ou anomalias no cromossômicas 7.

Fonte: (adaptado de JÄDERSTEN E HELLSTRÖM-LINDBERG, 2008)

R- IPSS

O IPSS tem sido bastante relevante na avaliação de prognóstico de pacientes adultos com SMD primária. Em 2012, a partir de uma nova base de dados, o *International Working Group for Prognostic in Myelodysplasia (IWG-PM)* publicaram as reformulações do IPSS com o objetivo de refinar o escore prognóstico, determinando o impacto clínico e incorporando um número maior e mais diferenciado de grupos da citogenética (Greenberg et al.; 2012) (**Tabela 4**).

O Sistema de Escore Prognóstico Internacional Revisado (IPSS-R) avaliou um número total de 7012 pacientes de múltiplas instituições. A média de idade dos pacientes em estudo foi de 71 anos, com taxa do masculino sobre feminino de 1,5:1 e seguimento de 3,9 anos. Os pacientes foram classificados pela FAB (n=7000, 99,8%) e adicionalmente pela OMS (Greenberg et al.; 2012).

As mudanças na estratificação prognóstica dos pacientes com SMD foram: 5 em vez de 3 subgrupos citogenéticos de prognóstico com classificações específicas, importância da idade do paciente ao diagnóstico, quantificação de ferritina sérica, lactato desidrogenase, B2-microglobulina e performance como importantes características para a sobrevivência, mas não para a transformação leucêmica (Greenberg et al.; 2012).

Também houve mudanças nas variáveis clínicas, como a percentagem de blastos, em que houve modificação na classe menos de 5% de blastos medular, onde foi subdividida entre 0-2, maior que 2 e menor que 5% e a variável referente ao número de citopenias, em que passou a ser avaliado o grau das citopenias e não mais só a quantidade das mesmas (Greenberg et al.; 2012).

Em relação aos subgrupos da citogenética, que se encontram na **Tabela 3**, de forma resumida, o IPSS-R acrescentou novas alterações citogenéticas específicas em diferentes grupos, incluindo: inversão do cromossomo 3, translocação do 3q, deleção do 3q, deleção 11q, deleção 12p, inversão do 17q, duas alterações incluindo a deleção 5q, duas alterações incluindo deleção 7q ou monossomia do 7 (Greenberg et al.; 2012).

Tabela 3: Sistema de classificação de acordo com o risco citogenético de acordo com os critérios do R-IPSS.

Grupos prognóstico % pacientes	Alteração citogenéticas	Sobrevida (anos)	Evolução LMA
Muito bom (4%/3%)	-Y, del (11q)	5,4	NR
Bom (72%/66%)	Normal, del(5q), del(12p), del(20q), duas alterações incluindo del(5q)	4,8	9,4
Intermediário (13%/19%)	del(7q),+8,+19, i(17q), any other single or double independent clones	2,7	2,5
Ruim (4%/5%)	-7, inv(3)/t(3q)/del(3q), duas alterações incluindo 7/del(7q), presença de cariótipo complexo: 3 anormalidades	1,5	1,7
Muito ruim (7%/7%)	Presença de cariótipo complexo: > 3 anormalidades	0,7	0,7

Legenda: NR- Não alcançado ; **Fonte:** (Adaptado de: GREENBERG et al.; 2012).

Tabela 4. IPSS-R – Classificação de risco e pontuação.

Escore							
Variáveis Prognósticas	0	0,5	1	1,5	2	3	4
Cariótipo	Muito bom	-	Bom	-	Intermediário	Ruim	Muito bom
Blastos (%)	≤ 2	-	> 2 a < 5	-	5 a 10	> 10	
Hb (g/dL)	≥ 10	-	8 a < 10	< 8	-	-	
Neutrófilos (cél/mm ³)	≥ 800	< 800					
Plaquetas (cél/mm ³)	≥ 100.000	50.000 < 100.000	< 50.000 0				

Fonte: (Adaptado de: GREENBERG et al.; 2012).

WPSS

Na última década, a evolução da classificação da SMD progrediu rapidamente através de tecnologias melhores para entender a biologia da doença. Novos modelos prognósticos foram introduzidos, como o sistema de prognóstico da OMS conhecido como WPSS (WPSS – *WHO Prognostic Scoring System*). O sistema WPSS é um sistema dinâmico que pode ser usado em qualquer momento no decorrer da doença. No WPSS se utiliza a classificação OMS no lugar do percentual de blastos, uso de transfusão no lugar do número de citopenias e manteve a estratificação de risco citogenético igual ao do IPSS (Malcovati et al., 2005, Malcolavati et al., 2011). De acordo com este sistema, a **Tabela 5** descreve os fatores de prognóstico e apresenta os grupos de risco.

Recentemente, o WPSS foi validado e comparado com os critérios do R-IPSS. Foram analisados 5326 pacientes não tratados e confirmaram-se os achados de classificação da OMS e a anemia grave como de grande valor prognóstico para SMD. Foi encontrada uma correlação significativa entre as classificações de risco WPSS e IPSS-R. (Porta et al., 2015).

Tabela 5: Critérios da classificação do WPSS.

Variáveis	Escore			
	0	1	2	3
Classificação OMS	AR, ARSA, 5q-	CRDM, CRDM-SA	AREB-1	AREB-2
Cariótipo	Normal, del(5q) ou del(20q ou -Y	Outras alterações	≥3 alterações ou alterações envolvendo o cromossomo 7	
Hemoglobina (<9g/dl para homens ou <8g/dL para mulheres)	Ausente	Presnete	-	-
Escore total	Grupo de Risco			
0	Muito baixo			
1	Baixo			
2	Intemediário			
3-4	Alto			
5-6	Muito alto			

Legenda: AR = anemia refratária; ARSA = anemia refratária com sideroblastos em anel; 5q- = síndrome mielodisplásica com deleção 5q isolada; CRMD, citopenia refratária com displasia multilinhagem; AREB-1 = anemia refratária com excesso de blastos-1; AREB-2= anemia refratária com excesso de blastos-2.

Fonte: (Adaptado de: MALCOVATTI et al.; 2008.)

1.3 Citogenética em Síndrome Mielodisplásica

O estudo dos cromossomos em SMD é importante para o diagnóstico, seguimento, decisão terapêutica e prognóstico dos pacientes portadores dessa doença (Mufti et al, 2004). A presença de alteração citogenética caracteriza um clone e ajuda na definição de SMD em oposição a outros quadros de displasias medulares não clonais.

Solé et al (2005) criaram (após avaliação de uma série de marcadores prognósticos em 968 pacientes com SMD) o Sistema de Escore do Grupo Cooperativo Espanhol de Citogenética Humana (Escore CGECGH). Uma das grandes contribuições do sistema de escore CGECGH foi o refinamento da divisão de grupos citogenéticos propostos pelo IPSS (Greenberg et al, 1997). Foram adicionadas a del(11q) e del(12p) às alterações consideradas de bom prognóstico e o grupo intermediário passou a ser composto por pacientes com +8, rearranjos envolvendo a região 3q21q26, t(11q) e del(17p). No grupo de cariótipo desfavorável foi incluído o i(17q), o que costuma apresentar características de mieloproliferação com eosinofilia, basofilia e rápida transformação para LMA.

As anormalidades cromossômicas são observadas em 15% a 60% dos casos de SMD primária (Romeo et al, 2002; Chen et al, 2005; Bernasconi et al, 2008; Solé et al, 2005, Pinheiro et al., 2006). As alterações numéricas são as mais frequentes e os cromossomos 5, 7 e 8 são envolvidos em 50% dos casos anormais.

Romeo et al (2002) demonstraram cariótipo alterado em 35% de 40 pacientes brasileiros com SMD, sendo os cromossomos 5 e 7 os mais envolvidos.

Bernasconi et al (2005) avaliaram 331 pacientes com SMD primária (de uma instituição italiana), sendo detectadas anormalidades citogenéticas em 62% dos casos. Deleção 5q, +8 e del(20q) foram as anormalidades mais observadas nos casos de baixo

risco e alterações do cromossomo 7, cariótipo complexo e rearranjo envolvendo 3q, nos casos de alto risco.

A incidência de alterações citogenéticas em pacientes orientais com SMD também apresenta variações. Chen et al (2005) detectaram anormalidades citogenéticas em 37% de 367 chineses com SMD primária. A trissomia do 8 foi o achado mais freqüente, seguida de del(20q), alterações no cromossomo 5 (del(5q)/-5) e monossomia do cromossomo 21. Matsuda et al (2005) compararam as características clínicas de 131 pacientes japoneses com 597 pacientes alemães. Dentre os japoneses, foi encontrado cariótipo alterado em 28% dos casos enquanto dentre os alemães, 51%.

Fica evidente que a incidência de anormalidades cromossômicas em pacientes com SMD é variável a depender do grupo de indivíduos sob estudo (alto risco x baixo risco), possivelmente com influência da etnia e distribuição geográfica.

Pelo estudo da citogenética podemos detectar translocações e deleções cromossômicas importantes para o entendimento dos mecanismos envolvidos no desenvolvimento da SMD, como a inativação de genes supressores tumorais ocasionados por tais rearranjos genéticos (Pinheiro et al., 2009). O acúmulo gradual de lesões genômicas nas células tronco mieloides da medula óssea determina a patogênese e a progressão da SMD (Huntly e Gilliland, 2005; Majeti et al., 2009; Pinheiro et al., 2009).

1.4 Patogênese da SMD

Vários avanços têm sido realizados nas últimas décadas para o entendimento da fisiopatologia da SMD, como por exemplo, a identificação de alterações genéticas e

epigenéticas. Porém o definitivo mecanismo patogênico da SMD ainda não é totalmente compreendido.

A fisiopatologia da SMD é complexa e envolve alterações na regulação da proliferação celular, maturação e sobrevivência. Além disso, respostas alteradas com relação às citocinas, sistema imune e estroma da MO também contribuem para o fenótipo da doença (Tormo et al., 2010).

Apesar das células tronco clonais da MO na SMD manterem a capacidade de se diferenciar nos estágios maduros, elas fazem isso de maneira ineficaz resultando numa diferença de número, função e morfologia. Ao longo do tempo, estas células podem gradualmente perder sua capacidade de diferenciação e finalmente se transformam em um perfil leucemogênico característica da leucemia aguda. Entretanto, muitos pacientes morrem antes que isto ocorra, devido a complicações secundárias a citopenias (Tormo et al., 2010).

Alguns trabalhos têm evidenciado que a lesão inicial da célula tronco hematopoética (CTH) na SMD pode estar relacionada a mutações somáticas em genes relacionados a regulação epigenética (Papemmanuil et al., 2013). A lesão inicial na CTH desenvolve uma vantagem de crescimento sobre as outras e leva a expansão clonal e a eventual hematopoese clonal. Estudos detalhados da cinética do ciclo celular revelam que a MO dos pacientes com SMD está com uma atividade proliferativa maior que o normal. A ocorrência da redução das populações celulares no sangue periférico (citopenias) em uma MO com proliferação ativa foi difícil de explicar inicialmente. Porém, a proliferação excessiva é equiparada com um aumento de apoptose prematura na MO dos pacientes com SMD. O aumento de apoptose foi observado em todos os subtipos da SMD embora com intensidades diferentes (Raza et al., 2010).

A apoptose é predominante na fase de pancitopênica inicial, porém a transformação para leucemia representaria um escape do processo de morte celular programada. Os casos iniciais de SMD (AR, ARSA e CRDM) são caracterizados por aumento da apoptose na MO. Em contraste, na SMD avançada (AREBs), ocorre um aumento da proliferação de blastos junto com uma redução da apoptose e aumento da instabilidade genômica (Greenberg et al., 2002, Pellagatti et al., 2010). Este padrão sugere que conforme a doença progride, as células clonais podem adquirir a capacidade de escapar dos sinais pró-apoptóticos. Estes achados sugerem o conceito de que apoptose é um componente central da fisiopatologia da SMD (Kerbaui e Deeg, 2007; Tormo et al., 2010). Ainda não está claro se a apoptose está relacionada com alterações no programa genético ou é um resultado de um ataque imune (Sloand e Barret, 2010).

Diversas alterações relacionadas ao DNA que estão associadas à SMD e ocorrem em todos os subtipos da doença: dissomia uniparental, mutações pontuais em genes (como por exemplo, *TET2*, *Ras* e *AML1*) alterações cromossômicas e fenômenos epigenéticos (Epling-Burnette e List, 2009; Raza et al., 2010). Muitos estudos têm demonstrado que alteração na metilação de DNA e acetilação de histonas podem alterar a transcrição gênica. Metilação anormal de sítios promotores é universal em pacientes com SMD e o número de *loci* envolvidos está aumentado em pacientes com doenças de alto risco e leucemias secundárias (Tormo et al., 2010). O papel das modificações epigenéticas na SMD foi destacado pela eficiência clínica de agentes hipometilantes (Bejar e Ebert, 2010).

Tem sido demonstrado que nos estágios mais tardios da SMD aquisições de mutações pontuais somáticas e deleções de genes críticos estão associadas com progressão de SMD para LMA. Genes controlando fatores celulares chaves como

diferenciação, sobrevivência e proliferação estão frequentemente mutados na SMD (Epling-Burnette e List, 2009).

Além da questão da apoptose, tem sido demonstrado que o microambiente do estroma tem capacidade reduzida de suportar a hematopoese (Epling-Burnette e List, 2009). Existe evidência de supressão de MO mediada por autoimunidade em alguns pacientes e fatores no microambiente da medula, como neoangiogênese, sinalização de citocinas e outros componentes (Kerbaui e Deeg, 2007). Considera-se que a falha da MO em SMD possa ser mediada por mecanismos imunológicos. Entretanto, como o sistema imunológico poderia estar atuando na patogênese desta doença ainda é desconhecido (Young, 2000; Hanaoka et al., 2009).

Desregulação da sinalização imune inata e inflamatória em SMD

Atualmente, está aumentando o número de evidências de que a falha na medula óssea que ocorre na SMD seja mediada pela ativação anormal da sinalização do sistema imune inato e associados a mecanismos inflamatórios. Porém, o papel exato da desregulação do sistema imunológico na fisiopatologia da SMD ainda não está claro (Voulgarelis et al., 2004). Uma variedade de alterações imunológicas foi descrita nas SMD tanto no nível celular quanto humoral (Baumann et al., 2002; Starczynowski e Karsan, 2010; Baldrige et al., 2011; Ganna-Gómez et al., 2015; Kim et al., 2015).

Níveis alterados de citocinas e fatores de crescimento estão presentes no sangue periférico e medula óssea de pacientes com SMD (Ganna-Gómez et al., 2015). A desregulação da sinalização das vias inflamatórias, diferenciação mielóide e sistema imune em SMD tem sido evidenciada, de uma forma geral, pelo aumento dos níveis de fator de necrose tumoral (TNF α), interferon gamma (IFN γ), fator de transformação de

crescimento beta (TGF- β), interleucina (IL) 6, IL-8 e fatores de estimuladores de crescimento mieloide, granulócítico e de monócitos, dentre outros (Ganna-Gómez et al., 2015).

O excesso de expressão desses reguladores da hematopoese tem um papel relevante na desregulação da apoptose e falha da hematopoese na SMD (Ganna-Gómez et al., 2015). A apoptose na SMD é mediada por fatores parácrinos assim como autócrinos implicando tanto as células tronco hematopoéticas como o estroma da MO na doença (Raza et al., 2010). Citocinas pró-inflamatórias no ambiente da MO foram considerados os principais fatores parácrinos da apoptose, pois foi observado um aumento de TNF α , TGF- β e IL1 β .

O aumento das taxas de apoptose intramedular é considerado a principal causa das citopenias no sangue periférico características da SMD. A princípio, a apoptose pode ser iniciada pelo receptor de morte Fas e o seu ligante específico (Fas-L), que estão superexpressos e correlacionado com a alta taxa de apoptose em SMD. Progenitores hematopoéticos CD34+ não expressam Fas em condições fisiológicas, porem eles podem fazê-lo depois de exposição a citocinas, tais como, TNF- α ou IFN- γ (Sério et al., 2014). Portanto, altos níveis de TNF- α estão diretamente associados com altas taxas de apoptose em células de medula óssea de pacientes com SMD.

Outro mecanismo relacionada a desregulação apoptose em SMD é a desregulação da sinalização de receptores toll-like (TLR). A família dos TLR compreende alguns dos mais importantes tipos de receptores de reconhecimento padrão associados a células de mamíferos que têm um papel importante na imunidade inata. A ativação de TLR por seus ligantes específicos leva à ativação de fatores de transcrição, como os fatores de reguladores de interferon (IRFs), que regulam a expressão de IFN e citocinas pró-inflamatórias e quimiocinas (Ganna-Gómez et al., 2015).

1.5 Diferenciação Hematopoiética

O avanço no isolamento *in vitro* dos precursores mielóides e sua caracterização fenotípica proporcionou recentes descobertas dos eventos genéticos e moleculares que determinam o desenvolvimento das células-tronco mielóides normais (Rosenbauer e Tenen, 2007) e de células-tronco neoplásicas como, por exemplo, células tronco hematopoéticas (CTH) isoladas de pacientes com doenças mieloproliferativas, Síndrome Mielodisplásica (SMD) e Leucemia Mielóide Aguda (LMA) (Qian et al., 2002; Rosenbauer e Tenen, 2007; Majeti et al., 2009).

O desenvolvimento do sistema mielóide é coordenado por uma intrínseca rede regulatória de genes que mantém o equilíbrio entre a proliferação, maturação e apoptose das células progenitoras hematopoéticas. O “centro” de tais rede regulatórias são as vias sinalizadas por citocinas e os fatores de transcrição (Watowich et al., 1996; Miranda e Johnson et al., 2007; Zon, 2008).

Os fatores de transcrição são reconhecidos como os “componentes chave” dos eventos moleculares que dirigem o processo de diferenciação, proliferação e apoptose da célula tronco mielóide (Tenen, 1997; Takaoka et al., 2008; Zon, 2008). Cada uma destas proteínas nucleares direciona à expressão de um determinado grupo de genes alvo instruindo a célula tronco à um programa de diferenciação (Orkin, 2000, Friedman, 2007). A desregulação dos fatores de transcrição possui um importante papel no desenvolvimento das leucemias e na SMD, implicando que estes são potenciais alvos para intervenção terapêutica nas neoplasias mielóides e em outras neoplasias (Tenen, 2003; Majeti et al., 2009).

Os passos relacionados ao fenômeno de transformação neoplásica da CTH ainda são desconhecidos, entretanto a teoria mais aceita preconiza que são necessários pelo menos dois tipos de mutação: uma associada à vantagem proliferativa e outra

associada ao bloqueio de diferenciação (Gilliland, 2001; Gilliland *et al.*, 2002). A SMD está associada ao bloqueio de diferenciação da CTH, entretanto a aquisição de ao menos uma mutação que gere vantagem proliferativa na célula-tronco é necessária para que a SMD evolua para LMA. Demonstramos este fato em caso de paciente com SMD que apresentou t(8;21) após seis meses de diagnóstico, porém a transformação em LMA somente ocorreu após a aquisição da mutação em tandem do gene FLT3 (associado à vantagem proliferativa) (Pinheiro *et al.*, 2007).

Dentre os fatores de transcrição relacionados ao fenômeno da diferenciação e proliferação da célula tronco hematopoética, os fatores reguladores de interferon têm sido alvos de diversos estudos nos últimos anos (Taniguchi, 2001; Hunda e Taniguchi *et al.*, 2006 Ozato *et al.*, 2007; Konieczna *et al.*, 2008).

1.6 Família de Fatores Reguladores de Interferon (IRFs)

Os Fatores Reguladores de Interferon (*IRF-Interferon Regulatory Factor*) formam uma família de fatores de transcrição que tem uma extensa homologia em sua seqüência de consenso de reconhecimento do DNA (DNA-binding domain-DBD) (Au, *et al.*, 1995; Nguyen *et al.*, 1998 e Li, *et al.*, 1999). A família dos IRFs consiste de nove membros: IRF1, IRF2, IRF3, IRF4, IRF5, IRF6, IRF7, IRF8 e IRF9 (Mamane *et al.*, 1999; Taniguchi *et al.*, 2001, Tamura 2008; Nehyba *et al.*, 2009). Os membros dessa família de reguladores transcricionais têm em comum a habilidade de se ligar a uma seqüência homóloga do gene do interferon- β e vários genes regulados pelo interferon. A principal função da família IRF é a regulação de respostas imunes, especialmente contra a infecção viral ou de ligação ao Interferon tipo I, resultando na amplificação do ataque antiviral e ativação da defesa adaptativa (Nehyna, 2002). A resposta inata é a primeira

linha de defesa contra uma infecção viral e envolve a produção de interferons (IFNs) e citocinas; ativação do sistema complemento e das células natural killer (NKC). Estes eventos estimulam a resposta imune adaptativa que habilita o reconhecimento de antígenos de alto grau na especificidade natural.

Os IRFs possuem um papel central na diferenciação e proliferação de células hematopoéticas (células mielóides, linfócitos B, T e natural *killer* (NK) e células dendríticas), regulam o ciclo celular, apoptose e oncogene (Lohoff e Mak, 2005; Takaoka et al., 2008; Tamura et al., 2008).

Alguns IRFs são ativados diretamente através de estímulos de antígenos ou por estímulo de proliferação e o IFN é um indutor importante dos genes IRFs. As funções dos fatores de transcrição IRF durante a resposta imune são amplas, e defeitos nesse sistema de regulação levam ao desenvolvimento de tumores, como, por exemplo, associações entre câncer e alterações na expressão dos genes *IRF1* ou *IRF8*, com mutações do *IRF2* e com a superexpressão do *IRF4* (Nehyna, 2002).

Fator Regulador de Interferon-1 (IRF-1)

O IRF1 foi o primeiro membro da família a ser descrito e é expresso constitutivamente em baixos níveis em quase todos os tipos celulares. É um ativador transcricional dos genes interferons alfa, beta e outros genes induzidos por interferons (Liebermann et al, 2002). O IRF-1 está envolvido na regulação de genes durante a inflamação, resposta imune, hematopoese e proliferação celular (Nguyen et al, 1997; Coccia et al, 2001; Liebermann et al, 2002; Liebermann et al., 2009) e tem sido considerado importante indutor de apoptose juntamente com o P53 (Tanaka et al., 1996; Liebermann et al, 2002; Gao et al., 2009).

A expressão do *IRF-1* é de grande importância durante o processo de diferenciação de células mielóides. A medula óssea de camundongos deficientes (*knockout*) de *IRF1* apresenta aumento no número de precursores granulocíticos imaturos assim como significativa diminuição dos fatores CPB α (*CAAT-enhancer-binding protein*) e PU.1 (Abdollahi et al., 1991; Testa et al., 2004). Acredita-se que a perda do gene *IRF1* em CTH resulta na desregulação de fatores de transcrição determinantes para o desenvolvimento mielóide e bloqueio da diferenciação granulocítica (Testa et al., 2004; Tamura et al., 2008).

O gene *IRF1* está localizado no cromossomo 5q31.1, região comumente deletada em SMD e em tumores sólidos (Willman et al., 1993; Johannsdottir et al., 2006). Luciane et al. demonstraram que a baixa expressão ou inativação do gene *IRF1* é associada ao aumento da sobrevivência celular (devido a redução da apoptose) em células de carcinoma de cabeça-pescoço (Luciane et al., 2009). A baixa expressão de *IRF-1* também tem sido relatada em outros estudos com câncer gástrico (Nozawa et al., 1998) e câncer de esôfago (Ogasawara et al., 1996).

Evidências sugerem que a inativação e/ou deleção do gene *IRF1* possa ser uma etapa crítica no desenvolvimento de algumas neoplasias hematológicas (Vaughan et al., 1997; Nguyen et al., 1998). Pacientes com imunexpressão de *IRF-1* superior a 50% (em amostras de medula óssea) apresentaram maior sobrevida em relação aos demais (Pinheiro et al., 2009). Este achado parece estar associado à função do *IRF-1* como indutor de diferenciação da célula tronco mielóide.

O *IRF-1* tem sido considerado um importante fator para a manutenção da estabilidade genômica. Em uma análise de pacientes com SMD e LMA, Pinheiro et al., 2008 mostraram associação entre perda de heterozigose (LOH) do *IRF-1* com alterações cromossômicas complexas (Pinheiro et al., 2008). O fenômeno de LOH do *IRF-1* parece

anteceder à presença de alterações cromossômicas em pacientes com SMD e LMA (Maratheftis et al., 2006; Pinheiro et al., 2008).

Fator Regulador de Interferon-2 (IRF-2)

O *IRF-2* é uma proteína nuclear expressa em diversos tipos celulares que funciona como atenuador transcricional de interferon tipo I, regulando negativamente os elementos de resposta estimulados por genes induzíveis por interferon (Taniguichi et al., 2001; Honda et al., 2006).

O *IRF2* desempenha importante função no desenvolvimento das linhagens mielóides (Tamura et al., 2008; Masumi et al., 2009). A sinalização do IFN tipo I inibe o desenvolvimento da linhagem de células eritroides enquanto o *IRF2* balanceia a excessiva sinalização de IFN para proporcionar o desenvolvimento de eritrócitos (Mizutani et al., 2008). Mizutani et al. demonstraram que a ausência de *IRF2* inibe o desenvolvimento da linhagem eritróide na medula óssea. Camundongos deficientes de *IRF-2* (camundongos *Irf2*^{-/-}) apresentam anemia, apesar dos altos níveis de eritropoetina (Mizutani et al., 2008).

Stellacci et al. 2004 demonstraram que a expressão de *IRF-2* em célula progenitora mielóide (linhagem 32Dcl3) resulta na diferenciação megacariocítica por ativação de genes reguladores do desenvolvimento do megacariócito como *GATA-2*, *GATA-1*, *FOG-1* e *NF-E2*, além de induzir a transcrição de receptor de trombopoetina. A expressão de *IRF-2* na célula progenitora mielóide induz um desvio de diferenciação de linhagem granulocítica para megacariocítica com indução de marcadores de membrana de megacariócitos como CD41 e CD61 (Stellacci et al. 2004).

Não há estudos que avaliem a expressão do IRF-2 em células hematopoéticas de pacientes com SMD. Sendo esta doença principalmente caracterizada por um bloqueio de diferenciação da célula tronco mielóide, acreditamos que a análise do IRF-2 poderá ajudar a um melhor entendimento de sua fisiopatologia.

Fator Regulador de Interferon 3 (IRF-3)

O IRF3 é expresso constitutivamente em vários tipos celulares e é importante indutor de IFN tipo I (IFN α e IFN β) (Tamura et al., 2008). IRF-3 desempenha um papel essencial na regulação da apoptose medida por TLR3 mediada através da ativação de ambas as vias intrínsecas e extrínsecas apoptóticas. O IRF3 possui expressão reduzida em câncer de próstata e essa baixa expressão está associada a uma estratégia bem sucedida de escape do sistema imunológico para algumas neoplasias em fases avançadas (Gambara et al. 2015)

O IRF3 pode desempenhar um papel na apoptose induzida por danos no DNA. O IRF3 é fosforilado em resposta a agentes que causam danos no DNA, translocando do citoplasma para o núcleo e ativando a transcrição. Karpova et al. 2003 demonstraram que proteína quinase dependente de DNA (DNA-PK) pode ser responsável pela fosforilação da IRF3 em resposta a danos no DNA. Consistente com o seu papel de indução de apoptose após lesão no DNA, o IRF3 pode inibir o crescimento de linhagens de células de câncer *in vitro* e *in vivo*, sendo considerado um supressor de tumor (Tamura et al, 2008).

Fator Regulador de Interferon 4 (IRF-4)

O gene IRF4 é expresso em células B, monócitos e células dendríticas CD11b+ e é regulador negativo dos TLRs quando ativos por citocinas pró-inflamatórias (Tamura et al., 2008).

Vários experimentos sugerem uma associação entre a expressão IRF4 e neoplasias. Em células T humanas, a expressão do mRNA do IRF4, induzida pela infecção do vírus-1 (HTLV-1), reduz a expressão do gene que codifica a ciclina B1 e genes de reparo de DNA que codificam o Rad51, XRCC1, Yng1, RPA e PCNA entre as fases G2 e M (Tamura et al., 2008). Além disso, a desregulação do IRF4 está associada a diversos tipos de neoplasias como linfomas, leucemia, mielomas e tumores sólidos como o melanoma (Wang et al., 2014 e Weilemann et al., 2015).

Fator Regulador de Interferon 5 (IRF-5)

O *IRF-5* é um importante indutor da produção de citocinas pró-inflamatórias, tais como, interleucina 12 (IL-12), IL-6 e interferon tipo I (Lopes-Pelaez, 2014). O *IRF-5* tem sido associado à regulação do crescimento celular, sendo considerado um importante gene supressor tumoral (Barnes et al., 2003; Hu et al., 2005). Pesquisadores evidenciaram a baixa expressão de IRF-5 em células de pacientes

com leucemia e câncer gastrointestinal (Barnes et al., 2003; Hu et al., 2005). Sua atividade parece ser relacionada à indução de apoptose em resposta a danos no DNA. Entretanto, embora o *IRF-5* seja um alvo direto do *P53*, sua atividade reguladora de ciclo celular e seus efeitos pro-apoptóticos são independentes do *P53*, similarmente ao *IRF-1* (Mori et al., 2002; Hu e Barnes, 2009).

O *IRF-5* está localizado no cromossomo 7q32 (Takaoka et al., 2008), região comumente deletada em pacientes com SMD e que determina um prognóstico bastante desfavorável (Greenberg et al., 1997; Solé et al., 2005). Não há estudos que avaliem o status do *IRF-5* em SMD.

Fator regulador de Interferon 6 (IRF6)

O fator regulador de interferon (*IRF6*) é o membro da família dos fatores de transcrição *IRFs* menos estudado. Os nove membros da família de *IRFs* desempenham um papel importante na resposta imune inata e têm sido relacionados a inúmeros processos celulares, incluindo a supressão do tumor, a regulação do ciclo celular e apoptose. No entanto, *IRF6* não tem sido implicado em qualquer uma das vias que regulam a ativação e função de outros *IRFs*. O *IRF6* tem sido associado com as síndromes de Van de Woude e pterígio popliteal (Bailey e Hendrix 2008).

A função do gene *IRF6* tem sido pouco explorada na hematopoese. Um único estudo avaliou a função do *IRF6* na eritropoiese. Xu et al., 2012 demonstraram que o *IRF6* e o *IRF2* interagem com os reguladores *master* da eritropoiese, como o *GATA 1* e o *TAL1*, formando um complexo de proteínas específico que são progressivamente ativos durante a eritropoiese adulta.

Em neoplasias, baixos ou ausentes níveis de *IRF6* estão associados a carcinomas da mama, sugerindo que o *IRF6* possa possuir propriedade supressora tumoral (Caleb et al., 2008).

Fator regulador de interferon 7 (IRF-7)

O *IRF7* é um fator de transcrição regulador chave de interferon tipo I e desempenha um papel essencial em restringir a infecção causada por vírus. A Ativação do *IRF7* está envolvida no controle para prevenir inflamação excessiva e auto-imunidade.

Em tumores, Bidwell et al, 2012 demonstraram que a expressão de genes regulados por *IRF7* em células de câncer de mama está associado a sobrevida livre de metástase. Portanto, a baixa expressão do *IRF7* em tumor primário de mama está associada a pacientes de alto risco e com desenvolvimento de metástases (Bidwell et al, 2012).

Fator regulador de interferon 8 (IRF-8)

O *IRF-8*, também conhecido como ICSBP (do inglês, *interferon consensus sequence binding protein*) é outro membro importante da família dos IRFs e é expresso exclusivamente em células mielóides e células B (Weizs, 1994; Takaoka et al., 2008; Tamura et al., 2008). O *IRF-8* regula a transcrição de vários genes envolvidos no processo inflamatório (*CYBB* e *NCF2*) além de possuir um papel importante na regulação, proliferação, diferenciação e apoptose de células hematopoéticas (Nelson et al., 1993; Grabielle et al., 1999; Wang et al., 2009).

O *IRF-8* tem sido associado à diferenciação de linhagem macrofágica a partir da célula progenitora mielóide. Estudos com *knocout* deste gene têm gerado, em modelos murinos, uma doença tipo leucemia mielóide crônica (LMC) com intensa atividade proliferativa (Holtschke, 1996). A baixa expressão de *IRF-8* gera um desvio na diferenciação para a linhagem granulocítica, o que poderia explicar o fenótipo de uma doença mieloproliferativa tipo LMC (Schelter, 1999).

O nível da expressão do *IRF-8* é relativamente constante durante a diferenciação celular. A deficiência de *IRF-8* bloqueia o processo de diferenciação e sustenta a proliferação durante a mielopoese. Portanto, é provável que dependendo do nível de expressão do *IRF-8*, este pode funcionar como um supressor da transformação neoplásica da célula mielóide (Schmidt et al., 2001).

Fator regulador de interferon 9 (IRF9)

O IRF9 forma o complexo STAT1-STAT2-IRF9 que é conhecido como fator de gene estimulado por IFN - ISGF3 (interferon stimulated gene factor 3) (González-Navajas et al., 2012). Este complexo migra para o núcleo e se liga a elementos de resposta estimulados por IFN - ISRE (interferon stimulated response element) na região promotora de genes estimulados por IFN-ISG (interferon stimulated gene) para iniciar a transcrição do gene (Brierley & Fish, 2002; González-Navajas et al., 2012).

1.7 Metilação do DNA e câncer

O câncer é uma doença heterogênea com diferentes propriedades biológicas originado por uma série de mudanças genéticas e epigenéticas que afetam genes supressores tumorais e oncogenes. Essas mudanças levam a uma instabilidade cromossômica durante a iniciação e progressão tumoral (Feinberg et al., 2006).

Mesmo havendo evidências de que a perda da regulação epigenética possa ser o evento transformante preliminar para a carcinogênese, não se sabe se os eventos epigenéticos exercem um papel causal no desenvolvimento dos tumores e na sua progressão, ou se são consequências de um fenótipo anormal nas células malignas (Feinberg et al., 2004; Esteller 2002).

O fenômeno da metilação do DNA ocorre pela adição de um grupo metil (CH_3) no carbono 5' do anel de pirimidina da citosina em dinucleotídeos CpG pela enzima DNA metiltransferase, resultando na formação de 5-metil-citosina. As citosinas que constituem as ilhas CpG da região promotora dos genes são, em sua grande maioria, não metiladas em tecidos normais. O bloqueio epigenético por meio da hipermetilação das ilhas CpGs das regiões promotoras dos genes gera um silêncio gênico com bloqueio na transcrição e consequente perda de sua função (Stephen, 2005).

A hipermetilação do DNA no câncer está associada com o silenciamento de genes supressores tumorais, enquanto a hipometilação tem um papel importante na formação progressiva do tumor e promove a instabilidade cromossômica. Entretanto, os genes supressores tumorais não são os únicos afetados por metilação aberrante. Genes anormalmente metilados com outras funções são também silenciados em neoplasias humanas, incluindo genes envolvidos no reparo do DNA, apoptose, angiogênese, regulação do ciclo celular, interação célula-célula, controle da proliferação celular,

diferenciação das células em linhagens mais específicas e controle da estabilidade genômica (Baylin, 2005).

1.7.1 Bloqueio Epigenético de Genes Supressores Tumorais: Um fenômeno comum em neoplasias da Célula tronco Hematopoética

O grande número de genes hipermetilados em várias neoplasias sugere que as alterações epigenéticas sejam o passo inicial da progressão do câncer (Shen et al.,2010). De acordo com a teoria mais aceita para o desenvolvimento do câncer proposto por Knudson et al., 1991, a teoria dos dois passos, o fenômeno da hipermetilação pode constituir o passo inicial em muitas neoplasias originadas de células somáticas com subseqüentes mutações ou deleções eliminando o segundo gene.

Em SMD muitas destas ilhas CpGs tornam-se hipermetiladas. A metilação aberrante é estável, apresenta propagação clonal e está associada com o silenciamento do gene envolvido. A metilação anormal pode ocorrer como evento iniciador, predispondo outras alterações, muitas vezes ocorre independente das mudanças citogenéticas e está associada a uma progressão mais rápida da doença à LMA.

O p15INK4b encontra-se hipermetilado em 10% a 30% dos casos de SMD e esse fenômeno está associada com um prognóstico desfavorável. Estudos em modelos murinos demonstram que este gene se comporta como um supressor de tumor nas células hematopoéticas. Em casos avançados de SMD são descritos fenômenos de metilação de genes como *P15*, *P16* e *P53*.

Estudos recentes demonstram novos perfis de hipermetilação aberrante e redução de expressão de genes envolvidos na resposta imune (IL27RA), apoptose

(como por exemplo, *BCL2* e *ETSI*) em pacientes de baixo risco de SMD (Key et al., 2013).

Shen et al., 2010 demonstraram baixos níveis de metilação nas ilhas CpG de 10 genes de células $CD34^+$ e $CD3^-/19^-$ de pacientes com SMD de baixo risco (classificação IPSS). Entretanto, a presença de metilação foi principalmente encontrada em casos de alto risco, sendo associada prognóstico desfavorável e elevado risco de transformação em leucemia aguda.

Wang et al., 2013 demonstraram a metilação de genes antagonistas do Wnt, importantes para regulação da proliferação celular, como um evento comum em SMD. A metilação dos genes *SFRP*, *SFRP4* e *SFRP5* está correlacionada com um prognóstico desfavorável, pior sobrevida e alto risco de evolução para leucemia.

Os IRFs são uma família de reguladores transcricionais. Seus membros possuem distintos efeitos regulatórios na expressão de vários genes, agindo como ativador ou repressor da transcrição. O presente estudo se propôs a avaliar os níveis de expressão, metilação e as interações dos diversos membros da família dos IRFs para entender os possíveis mecanismos patogênicos da SMD. Esta avaliação poderá ajudar no melhor entendimento do bloqueio de diferenciação da célula tronco hematopoética, identificando possíveis genes como marcadores de prognóstico e/ou alvo terapêutico para a SMD.

2. OBJETIVO

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o perfil de metilação e expressão dos genes dos fatores reguladores de interferon (*IRFs*) em células da medula óssea pacientes com síndrome mielodisplásica.

2.3 OBJETIVOS ESPECIFICOS

1. Avaliar o perfil de metilação e expressão dos *IRFs* (*IRF1*, *IRF2*, *IRF3*, *IRF4*, *IRF5*, *IRF6*, *IRF7*, *IRF8* e *IRF9*) em células de medula óssea total de pacientes com SMD.
2. Avaliar o perfil de metilação e expressão dos *IRFs* nas subpopulações de células tronco hematopoéticas CD34⁻/CD133⁺ e CD133⁺/CD34⁺ isoladas da medula óssea total de pacientes com SMD.
3. Avaliar se o mecanismo de regulação da expressão dos *IRFs* está relacionado com a metilação da região promotora desses genes em SMD.
4. Avaliar o perfil de metilação e expressão dos *IRFs* em células da medula óssea total de pacientes de SMD comparando a células de medula óssea de indivíduos normais
6. Avaliar o perfil de metilação e expressão dos *IRFs* de acordo com as variáveis clínicas e laboratoriais (subtipo da OMS, cariótipo, variáveis do R-IPSS e dependência transfusional).
7. Avaliar o perfil de metilação e expressão dos *IRFs* durante a evolução da doença, relacionar a sobrevida e risco de transformação para LMA.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Seleção de Amostras

No estudo, foram incluídos 119 amostras de pacientes do banco de para DNA e RNA do Laboratório de Citogenômica do Câncer. As amostras selecionadas foram de paciente de ambos os sexos, com diagnóstico de Síndrome Mielodisplásica (SMD), segundo os critérios da OMS (SWERDLOW et al. 2008), diagnosticados e regularmente inscritos no ambulatório de Hematologia do Hospital Universitário Walter Canditio/Universidade Federal do Ceará, no período de março de 2008 a junho de 2014. Todos os pacientes foram previamente submetidos ao protocolo de exclusão durante investigação da doença (**Tabela 6**).

Tabela 6 - Protocolo de exclusão de causas não clonais que, com frequência, cursam com citopenias e/ou dispoeses na medula. Protocolo aplicado à pacientes que se encontram sob investigação de SMD.

Critérios do Protocolo de exclusão

Deficiências nutricionais: vitamina B12 e ácido fólico

Exposição recente a agentes tóxicos: metais pesados, benzeno e derivados do petróleo.

Exposição recente a drogas citotóxicas e fatores de crescimento.

Disfunções endócrinas

Etilismo

Disfunções metabólicas: doença hepática crônica e insuficiência renal

Doenças inflamatórias crônicas

Infecções virais: SIDA, hepatites, CMV, toxoplasmose, parvovirus B19

Doenças auto-imunes

Fonte: Magalhães e Lorand-Metze (2004).

Como grupo controle, foram incluídos 17 indivíduos sadios, dos quais amostra de medula óssea foi coletada para a realização da avaliação da expressão gênica, análise de metilação e análise de expressão proteica.

3.2 COLETA DAS AMOSTRAS

Amostras de medula óssea foram coletadas ao diagnóstico de 119 pacientes com SMD e durante o seguimento de alguns pacientes (21 pacientes). A medula óssea foi coletada em seringa heparinizada, para avaliação do cariótipo por banda G. Além disso, foram coletados dois tubos de medula óssea em tubos 15x75 mm com EDTA. Um tubo foi destinado para estocagem de medula total e o segundo tubo foi utilizado para separação das subpopulações de células tronco hematopoiéticas CD133⁺/CD34⁻ e CD133⁺/CD34⁺. Todas as amostras de medula óssea foram coletadas por hematologista experiente após consentimento informado. O estudo do cariótipo por banda - G e a separação de células tronco hematopoiéticas CD133⁺/CD34⁻ e CD133⁺/CD34⁺ foram realizados à época das coletas.

As amostras de medula total foram centrifugadas (1811xg por 15 minutos a 4°C) e a camada leucocitária foi transferida para tubos contendo 1mL de Trizol LS (solução monofásica de fenol e isotiocianato de guanidina – Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) com 250µL de PBS 1X com DEPC ((Dietilpirocarbonato; Sigma-Aldrich, Steinheim, Alemanha). Em seguida, as amostras foram homogeneizadas em vórtex por 1 minuto e armazenadas a -80 °C para posterior extração de RNA, DNA e proteínas.

Para as amostras de células tronco hematopoiéticas CD133⁺/CD34⁻ e CD133⁺/CD34⁺, depois de isoladas, foram ressuspensas em 250 µl de PBS 1X com

DEPC e 750 µl de TRIZOL LS (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) e mantidas em freezer a -80°C para posterior extração de RNA, DNA e proteínas.

3.3 CITOGENÉTICA CLÁSSICA

A citogenética clássica por banda G foi realizada no Laboratório de Citogenômica do Câncer (Universidade Federal do Ceará-UFC), segundo Chauffaille et al. (1996). A medula óssea colhida em heparina de forma estéril foi dividida em dois frascos contendo 7 mL de meio RPMI (pH 7,0) e 3 mL de soro fetal bovino. Este material foi cultivado por 24 horas em incubadora a 37°C em 5% de CO₂. Uma hora antes do término da cultura foram adicionados 70µL de um inibidor da formação do fuso mitótico (Colcemid®), por 30 minutos, a 8°C. Em seguida, o material foi centrifugado e ressuspenso em solução hipotônica de KCl 0,075 M e lavado com solução fixadora (solução de ácido acético e metanol, proporção 3:1), por 4 vezes. Para confecção das lâminas para análise, o material foi gotejado em lâminas de microscopia e em seguida aquecido por 3 minutos em microondas, na potência alta. O bandeamento foi realizado pela técnica de tripsina e as bandas coradas com Kit Panótico®. Foram analisadas pelo menos 20 metáfases de cada paciente, sempre que possível. As metáfases foram capturadas e analisadas em sistema computadorizado com software para cariotipagem CytoVision®. Os resultados da análise citogenética de medula óssea foram estabelecidos de acordo com o critério do Sistema Internacional de Nomenclatura Citogenética Humana (ISCN) (Shaffer e Tommerup 2014).

3.10 ISOLAMENTO DAS CÉLULAS MONONUCLEARES DE MEDULA ÓSSEA

Dos 119 pacientes coletados, 29 amostras de medula óssea foram utilizadas para a realização da separação da camada de células mononucleadas. As células mononucleares (CMN) foram isoladas por centrifugação em gradiente de densidade utilizando Ficoll-Hypaque PLUS (Amersham Biosciences, No.17-1440-02). Nos tubos contendo medula óssea, foram adicionados PBS (tampão fosfato salina) até completar o volume de 5mL e em seguida realizada homogeneização da amostra. Em tubos Falcon de 50mL foram adicionado 7 ml de Ficoll-Hypaque na parte inferior de cada tubo e sobre a solução de Ficoll foi adicionada lentamente a medula óssea diluída em PBS, resultando na formação de duas fases, a orgânica (mais inferior, composta por solução de Ficoll) e a aquosa (mais superior composta pela amostra diluída). Em seguida, as amostras passaram por centrifugação de 2000rpm por 30 minutos à temperatura ambiente, resultando na formação de um anel entre as fases, onde se localizam as CMNs. Esse anel foi recolhido de cada amostra e transferido para novos tubos, que passaram por processo triplo de lavagem com PBS 1X e centrifugação de 1500rpm por 10 minutos a 4°C. O pellet formado foi ressuspensado em tampão (PBS 1X, pH 7.2, 0.5% *bovine serum albumin* (BSA) e 2 mM EDTA) e as células foram contadas em câmara de Neubauer, para posterior separação das células CD133⁺/CD34⁻ e CD133⁺/CD34⁺.

3.11 SEPARAÇÃO IMUNOMAGNÉTICA DAS CÉLULAS DAS SUBPOPULAÇÕES DE CÉLULAS CD133⁺/CD34⁻ e CD133⁺/CD34⁺.

As subpopulações de células CD133⁺/CD34⁻ e CD133⁺/CD34⁺, contidas entre as mononucleares, foram isoladas imunomagneticamente a partir das amostras utilizando o Kit MACS CD34 MultiSort Kit human (No. 130-056-701, Miltenyi Biotec), seguindo as instruções do fabricante, sob condições assépticas. Inicialmente foi realizado a separação de células CD34⁺. Para isso, as células mononucleares isoladas foram incubadas com anticorpos monoclonais anti-CD34 (clone QBEND/10) ligados a partículas magnéticas (beads) por 30 minutos a 4°C. As amostras foram passadas através da coluna de separação magnética sob campo magnético e, assim, as células CD34⁺ marcadas magneticamente ficaram retidas na coluna LS (Miltenyi Biotec, No. 130-042-201) por meio de um ímã SuperMACS (Miltenyi Biotec, No. 130-044-104). A coluna, ainda na presença do ímã, foi lavada com tampão de coluna, a fim de retirar as células com fraca marcação de CD34⁺. Posteriormente, a coluna foi retirada do campo magnético, realizou-se a eluição e contagem das células CD34⁺ em câmara de Neubauer.

Para a separação das células CD133⁺/CD34⁺, foi utilizado o efluente da obtido da separação de células CD34⁺, ou seja, contendo células CD34⁻. Para cada 1mL de efluente obtido, foi adicionado 20ul de MultiSort Release Reagent. A amostra foi homogeneizada e incubada no escuro a (2–8 °C) durante 10 minutos. A amostra foi lavada com 5ml de tampão e em seguida centrifugada a 300g durante 10 minutos. A amostra foi ressuspensa com 50µL tampão por 10⁷ células totais e foi adicionado 30µL de MultiSort Stop Reagent por 10⁷ células totais. Em seguida, foi adicionado à amostra o segundo marcador anticorpo anti-CD133 para a realização da separação das células CD133⁺/CD34⁻. Depois da adição do anticorpo, a amostra foi homogeneizada e

incubada a 2–8°C durante 15 minutos. O processo de separação nas células CD133⁺/CD34⁻ foi realizado como anteriormente descrito para a separação de células CD34.

3.12 ANÁLISE DA PUREZA DAS SUBPOPULAÇÕES DE CÉLULAS CD133⁺/CD34⁻ E CD133⁺/CD34⁺.

Após a separação da camada de células mononucleadas e da separação imunomagnética, cerca de 2x10⁵ células foram reservadas para análise de pureza e caracterização da composição da amostra em citometria de fluxo. Para isso, a porção de células reservadas para a citometria foram ressuspensas em 200 µl de PBS.

Para realizar a compensação das cores, amostras de células mononucleadas foram marcadas com reagente imunológico, anti-CD45 humano marcado com FITC (No- 130-080-202, Miltenyi Biotec), outro tubo foi marcado com reagente imunológico anti-CD34 humano marcado com PE, clone AC136 (No130-081-002, Miltenyi Biotec) e outro tubo continha células sem nenhuma marcação. Para a análise de pureza, foram adicionados nas amostras de células mononucleadas e nas imunomagneticamente separadas, 5µl dos anticorpos anti-CD45 humano, marcado com FITC (No. 130-080-202, Miltenyi Biotec), anti CD34 humano marcado com PE, clone AC136 (No.130-081-002, Miltenyi Biotec) e o anti CD133/1 (AC133) humano, APC (No. 130-090-826, Miltenyi Biotec), em cada amostra analisada. Os tubos foram incubados por 20 minutos no escuro, adicionou-se, em seguida, 500µl de PBS 1x, após isso a análise foi realizada em citômetro FACSCalibur (Becton Dickinson, San Jose, Ca, EUA) utilizando o software específico CellQuest (Becton Dickinson, San Jose, CA, EUA). Neste, cerca de

5.000 a 50.000 eventos foram adquiridos e plotados em função dos parâmetros de FSC (forward scatter – tamanho celular) e SSC (side scatter – granularidade celular). De acordo com esses parâmetros os eventos foram selecionados através de gates, isolando e calculando a porcentagem das células de acordo com as marcações por anticorpo.

3.13 ANÁLISE DE EXPRESSÃO DO GENES IRFS

Os procedimentos referentes às análises de expressão gênica foram realizados no Laboratório de Hematologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (USP) - Ribeirão Preto.

3.7.1 Extração do RNA Total

A extração de RNA total baseou-se nas instruções do fabricante. As amostras de medula total e as subpopulações CD133⁺/CD34⁻ e CD133⁺/CD34⁺, foram descongeladas e a cada uma foi adicionado 10µl (20ng/ml) de glicogênio e 200µl de clorofórmio, homogeneizaram-se as amostras em vórtex e, em seguida, os tubos foram centrifugados a 14000rpm por 15 minutos a 4°C. Retirou-se cuidadosamente o sobrenadante formado em cada amostra, transferindo para novos tubos. Nestes tubos foram adicionados 400µl de isopropanol gelado para a precipitação do RNA. O tempo de precipitação do RNA variou de acordo com o tipo de amostra, as amostras de medula total permaneceram durante 60 minutos a -20°C e as amostras de CD133⁺/CD34⁻ e CD133⁺/CD34⁺, permaneceram precipitando *overnight* a -20°C, devido à baixa concentração de células. Após a precipitação o material foi centrifugado a 14000rpm por 30 minutos a 4°C e o sobrenadante foi descartado por inversão. O pellet formado foi ressuspenso em etanol 70% e centrifugado a 14000rpm por 10 minutos a 4°C. Em

seguida, o sobrenadante foi novamente descartado por inversão e o pellet ressuspenso em 20µl de água livre de RNase. Os RNAs quantificados e congelados em freezer -80°C.

3.7.2 Quantificação de RNA

O RNA total obtido das amostras foram quantificado em através de leitura em espectrofotômetro Nanovue no comprimento de onda de 260nm, utilizando equivalência de 40µg/ml para 1 unidade de absorbância. O grau de pureza das amostras foi avaliado através da razão 260/280nm, sendo considerada uma boa extração aquela que apresentou valores entre 1,6 e 1,8. A qualidade do RNA total e também foi verificada em gel de agarose 1%.

3.7.3 Reação da Polimerase em Cadeia por Transcriptase Reversa (RT-PCR)

Após extração e purificação, parte do RNA extraído (2000ng) de cada amostra foi empregado na síntese do cDNA (20µl), a síntese do cDNA a partir do RNA total foi realizada de acordo com o protocolo do Kit *High Capacity RNA-to-cDNA* (Cat#4387406, Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA). O cDNA por sua vez foi diluído 5 vezes para ser utilizado nas reações de qPCR. Os cDNAs foram armazenados a -20°C.

3.7.4 PCR Quantitativo em Tempo Real (qPCR)

As reações foram realizadas no aparelho 7300 Real Time PCR System (Applied Biosystems, Foster City, CA), em placas transparentes de 96 wells (Applied Biosystems). As reações de PCR em tempo real foram realizadas em duplicata

utilizando sondas TaqMan (“Assay on demand”). O volume final de cada reação foi de 10µl, sendo 7,5µl de TaqMan Universal, 0,5µl de primer (TaqMan Assay) e 2,5µl de cDNA. As condições de termociclagem compreenderam uma incubação a 50°C por 2 minutos, 95°C por 10 minutos (para ativação da DNA polimerase), seguidos por 40 ciclos de 95°C por 15 segundos (desnaturação) e 60°C por 1 minuto (anelamento e extensão simultâneos).

Todas as amostras (casos, controles normais e controle interno das reações) foram realizadas em duplicatas. Uma amostra calibradora quantitativa foi incluída em todas as placas de qPCR (*pool* de diversas linhagens de tumores humanos) para minimizar as diferenças de amplificação entre as reações. Como controle de contaminantes da PCR, NTCs (*no-templante controls*), no qual água foi adicionada no lugar do RNA, foram incluídos em cada placa.

Para análise da expressão gênica foram utilizados ensaios adquiridos (TaqMan® *Gene Expression Assay*) com marcação FAM-MGB pela Applied Biosystems (Tabela 7).

Tabela 7: Lista dos genes utilizados na avaliação da expressão gênica por PCR em Tempo Real.

GENES	CÓDIGO DE REFERÊNCIA (Applied Biosystems)
Genes Normalizadores	
<i>ACTB</i> (β-actina)	4310881E
<i>GAPDH</i> (Gliceraldeído fosfato desidrogenase)	4318884E
<i>B2M</i> (β2-microglobulina)	Hs99999907_m1
<i>HPRT1</i> (Hipoxantina-guanina fosforibosiltransferase)	Hs02800695_m1
<i>UBC</i> (Ubiquitina C)	Hs00824723_m1
Genes de estudo	
<i>IRF1</i> (Interferon Regulatory Factor 1)	Hs00971980_m1
<i>IRF2</i> (Interferon Regulatory Factor 2)	Hs00180006_m1
<i>IRF3</i> (Interferon Regulatory Factor 3)	Hs01547283_m1
<i>IRF4</i> (Interferon Regulatory Factor 4)	Hs01056533_m1
<i>IRF5</i> (Interferon Regulatory Factor 5)	Hs00158114_m1
<i>IRF6</i> (Interferon Regulatory Factor 6)	Hs01062178_m1
<i>IRF7</i> (Interferon Regulatory Factor 7)	Hs01014809_g1
<i>IRF8</i> (Interferon Regulatory Factor 8)	Hs01128710_m1
<i>IRF9</i> (Interferon Regulatory Factor 9)	Hs00196051_m1

Certas variáveis precisam ser controladas na análise da expressão gênica, como a quantidade de material inicial, qualidade do RNA utilizado, eficiência da transcrição reversa (RT), componentes inibitórios e diferença na atividade transicional global das células. Para a normalização dos parâmetros acima, foram utilizados cinco genes de referência: *ACTB*, *HPRT1*, *GAPDH*, *B2M* e *UBC*. O programa *Bestkeeper* (Pfaffl et al., 2004) foi utilizado para auxiliar na escolha do par de genes de referência (frequentemente chamados de genes *housekeeping*) mais estável e determinar qualidades das amostras avaliadas. Em relação ao software *BestKeeper*, calcula-se o desvio padrão do gene de referência (SD) com base em valores brutos (C_q - *quantification cycle*), independentemente da eficiência da amostra. O gene com o menor SD é considerado o mais estável. Além disso, o programa *BestKeeper* calcula um coeficiente de correlação de Pearson para cada par de genes de referência candidatos. Todos os genes de referência altamente correlacionadas são então combinados em um

fator de normalização. Utilizamos o par de genes mais estável para a normalização da expressão genica que foi realizada através do cálculo da média geométrica dos dois genes.

Os resultados foram avaliados através do software *Sequence Detection System VI.3* para obtenção dos valores de Cq. Ao final de cada corrida os dados foram exportados para planilhas do software Excel para o cálculo dos valores de ΔCT . A nomenclatura padrão utilizada para os experimentos da PCR quantitativa em tempo real foi baseada no MIQE (*Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments*) (Bustin et. al., 2009).

Posteriormente, os resultados qPCR, os Cq para cada gene de estudo foram normalizados para cada amostra, subtraindo o valor da média geométrica dos Cq do par de genes de referência (obtendo o valor de ΔCq). Como referência para cálculo de valores de expressão ($2^{-\Delta Cq}$) (Pfaffl, 2001). Segundo a formula abaixo:

$$2^{-\Delta Cq} = Cq \text{ do gene alvo} - \text{média geométrica do Cq dos genes de referência}$$

3.14ANALISE DE METILAÇÃO DA REGIÃO PROMOTORA DOS GENES DOS *IRFS*

Os procedimentos referentes às análises de metilação da região promotora dos genes dos *IRFs* foram realizados Centro de Pesquisa em Oncologia (CEPON) do Hospital do Câncer de Barretos, São Paulo.

3.8.1 Extração de DNA de Células da Medula Óssea

Após a extração de RNA, a fase orgânica foi reservada para a realização da extração de DNA. O sobrenadante remanescente foi retirado e foram adicionados 500µl de BEB (*Back Extraction Buffer*) ao precipitado e as amostras permaneceram sob agitação constante durante 30 minutos. Em seguida o material foi submetido à centrifugação a 12000rpm durante 15 minutos a 4°C. Após a centrifugação, o sobrenadante obtido foi transferido para um novo tubo. O precipitado resultante dessa fase foi estocado a -80°C para posterior extração de proteínas. No tubo com sobrenadante, foram adicionados 400µl de isopropanol para a precipitação do DNA, a amostra foi homogeneizada por inversão e permaneceu durante 1hora a -20°C. Após esse período a amostra foi centrifugada a 14000rpm durante 30 minutos a 4°C. Em seguida o sobrenadante foi descartado e o precipitado foi lavado com etanol 70% e com seguida centrifugação a 14000rpm durante 5 minutos à 4°C, esse procedimento foi repetido durante 4 vezes. Após a última lavagem o sobrenadante foi descartado e tubo contendo o DNA permaneceu secando a temperatura ambiente. O DNA foi hidratado com água livre de DNase e permaneceu em banho-maria durante 30 minutos à 60°C. As amostras foram quantificadas e estocadas à -20°C.

3.8.2 Extração do DNA de Sangue Periférico

DNA de leucócitos de indivíduos saudáveis foram utilizados na curva padrão da PCR quantitativa metilação específica em tempo real (QMSP), descrita posteriormente. Uma amostra de sangue periférico de um indivíduo normal foi coletada em tubo *Vacutainer*® *EDTA*. O tubo foi centrifugado a 3.500 RPM, por 10 minutos à 4°C para a obtenção de um anel leucocitário ou *buffycoat*. Aproximadamente, 500 µL do *buffycoat* foram transferidos para um tubo cônico de 15 mL. A lise de hemácias foi realizada previamente antes da extração, para obtenção de um *pellet* de leucócitos livre de hemácias. A lise de hemácias foi realizada pela adição de 12 mL de solução de lise composta por cloreto de amônio (10X) e bicarbonato de amônio (1X) em um tubo cônico que foi posteriormente imerso no gelo por 20 minutos. Após esse tempo, o tubo foi centrifugado por 10 minutos a 3.500 RPM a 4°C, e o *pellet* transferido para um microtubo de 1,5 mL. O DNA foi extraído através do *DNeasy Blood & Tissue kit* (Qiagen), adicionando 25 µL de proteinase K ao *pellet*, 4µL de RNase A e 200µL de tampão de lise, conforme protocolo do fabricante. A amostra foi incubada a 56°C por 3 horas com agitação de 600 RPM em termomixer. Após a incubação, foram adicionados 200µL de etanol absoluto e o conteúdo do tubo transferido para a coluna fornecida pelo fabricante. O protocolo seguiu com a lavagem da coluna com solução tampão, e o conteúdo eluído em 60µL de água estéril deionizada (milliQ). O DNA foi quantificado e armazenado em freezer a uma temperatura de -20°C.

3.8.3 Quantificação de DNA

O DNA obtido das amostras foi quantificado por nanoespectrofotometria em Nanodrop (ThermoScientific) no comprimento de onda de 260nm, utilizando equivalência de 40µg/ml para 1 unidade de absorvância. Este aparelho quantifica ácidos nucleicos e proteínas, através da leitura de comprimento de onda absorvido ou refletido. A absorvância de 260nm indica o pico de absorção de UV do DNA, a absorvância de 280nm o pico de absorção de UV de proteínas e 230nm o pico de absorção de UV para contaminantes orgânicos.

O grau de pureza das amostras foi avaliado através da razão 260/280 e 260/230, sendo considerada uma boa extração aquela que apresentou valores entre 1,6 e 2,1. Todas as amostras foram estocadas à -20°C.

3.8.4 Tratamento do DNA Genômico com Bissulfito de Sódio

O DNA genômico extraído a partir das amostras de medula óssea de indivíduos saudáveis, de pacientes com SMD, assim como as amostras de sangue periférico de indivíduos saudáveis utilizados para a curva padrão, foi submetido ao tratamento com bissulfito de sódio pelo *EZ DNA Methylation Kit* (ZymoResearch).

O tratamento consiste em converter as citosinas não metiladas em uracila com a perda do grupo amina da base citosina. Já as citosinas metiladas ficam protegidas e, portanto, permanecem inalteradas. Com a utilização deste método, a taxa de conversão química tem sido estimada em 95-98% (Clark *et al.* 2006).

O tratamento consiste em uma primeira etapa de desnaturação do DNA, uma segunda etapa de tratamento com bissulfito de sódio (deaminação) e uma terceira etapa de purificação, dessulfonação e eluição. Como a deaminação por bissulfito ocorre

somente em fita simples do DNA, a etapa de desnaturação é primordial para a garantia da conversão, pois a presença de citosinas em fragmentos de fita dupla protege as mesmas da deaminação. Portanto, inicialmente, para a desnaturação da fita dupla de DNA foi adicionado aos 2µg de amostra, 1X do tampão de diluição, em um volume final de 50 µL e colocados em incubação a 37°C por 15 minutos. Na etapa de conversão (deaminação), as amostras foram incubadas a 50°C com o reagente de conversão CT (*EZ DNA Methylation Kit*) que contém bissulfito de sódio, por 16 horas protegidos de luz. Na etapa de purificação, as amostras foram transferidas para a coluna *Zymo-Spin* contendo o tampão de ligação e centrifugadas por 30 segundos a 13.000 RPM, seguido de adição de tampão de lavagem e nova centrifugação. Em seguida, foi adicionado o tampão de desulfonação à coluna e o produto incubado a temperatura ambiente por 20 minutos. Na última etapa de eluição, a coluna foi transferida para um tubo de 1,5 mL e foram adicionados 20 µL de água estéril deionizada (milliQ) com incubação de 1 minuto, por duas vezes, para obtenção máxima do rendimento da coluna, totalizando 40 µL finais de produto eluído e então armazenados em freezer -20°C.

A correta conversão do DNA com bissulfito de sódio foi confirmada por sequenciamento (descrito a seguir) de algumas amostras, utilizando os iniciadores do gene endógeno ACTB, verificando-se presença de timina no lugar de citosina. O tratamento de bissulfito converte a citosina não metilada em uracila que é reconhecida como timina nas PCRs.

3.8.5 Metilação do DNA de Leucócitos *in vitro*

O DNA genômico de leucócitos normais metilado *in vitro* foi empregado na construção das curvas padrão da PCR quantitativa metilação específica em tempo real

(QMSP). A metilação *in vitro* do DNA genômico foi realizada utilizando o kit *CpG Methyltransferase M.SssI* (New England Biolabs), seguindo as instruções do fabricante. Para tanto, adicionou-se em um tubo 20 µg de DNA de leucócitos previamente extraídos de sangue periférico com 2,5 µL de S-adenosilmetionina (SAM) a 32 mM, 25 unidades de *SssI* metilase, 25 µL de tampão NEB 10x e água ultra-pura na quantidade suficiente para 250 µL, e incubado a 37°C por 4 horas. Após a incubação, foram adicionados mais 5 µL de SAM e 12,4 unidades da *SssI* metilase, e nova incubação a 37°C por 4 horas.

Foram adicionados 250 µL de fenol-clorofórmio-álcool isoamílico (25:24:1) e transferidos para um tubo *PhaseLock Gel* (Eppendorf) e centrifugado por 15 minutos a 13.000 RPM. A fase aquosa foi transferida para um tubo de 1,5 mL e adicionados 800 µL de etanol 100%, 100 µL de acetato de amônio 7,5 M, homogeneizado por inversão e incubado a -20°C *overnight*. Após a incubação, foi adicionado 1 mL de etanol 70% e homogeneizado por inversão. Em seguida centrifugado por dois minutos a 8.000 RPM, retirado o sobrenadante e o *pellet* foi seco a temperatura ambiente.

O *pellet* de DNA foi ressuspenso em 11µL de água estéril deionizada (milliQ), quantificado e submetido ao tratamento com bissulfito de sódio conforme descrito anteriormente. Após a conversão do DNA genômico 100% metilado, foram aliqüotadas as curvas padrão, constituídas de seis pontos de diluições seriadas (fator de diluição 1:10), partindo de 50 ng de DNA 100% metilado e armazenadas na temperatura -80°C.

3.8.6 Desenho de Iniciadores e sondas Específicos

O desenho dos iniciadores é uma etapa importante, pois a confiabilidade desse método depende da escolha de regiões do promotor que contenham ilhas CpG e que

possam ser reconhecidas pelos iniciadores quando estiverem metiladas.

O objetivo de desenhar iniciadores para análise de metilação quantitativa é amplificar sequências metiladas com eficiência, evitando a amplificação de sequências não convertidas.

Os iniciadores e sondas que foram utilizados para amplificar a região promotora dos genes de interesse e do gene de referência (*ACTB*) estão descritos na **Tabela 8**. As sequências dos iniciadores para a região promotora dos *IRFs* foram baseadas no trabalho de Yamashita, et al., 2010. Além disso, com exceção do *gene IRF9* todos os genes apresentam ilha CpG em suas regiões promotoras (<http://www.genome.ucsc.edu>). Para o *gene IRF9* foi avaliada uma região densa em CpG localizada na região promotora, porém não obtemos sucesso de fragmentos específicos e o *gene IRF9* foi excluído da análise de metilação. Para localização das sequências dos iniciadores e sondas destes genes e também para a visualização das ilhas CpG foram utilizadas as ferramentas: *Human Blat Search* e *MethPrimer*.

Tabela 8 - Iniciadores e sondas para avaliação do perfil de metilação da região promotora dos genes dos *IRFs* e gene de referência.

<i>Gene</i>	Iniciador Direito 5'-3' (Primer Foward)	Sonda 5'-3' (6-FAM -5'3'-lowaBlack)	Reverso 5'-3' (Primer Reverse)	T°C	Amplicon (pb)	CG (n)
<i>ACTB</i>	TGG TGA TGG AGG AGG TTT AGT AAG T	AAC CAA TAA AAC CTA CTC CTC CCT TAA	AAC CAA TAA AAC CTA CTC CTC CCT TAA	60	133	13
<i>IRF1</i>	TAC GTA GTC GGT TAA TGG GC	GAC CCC GCC CCC GAA CAA CCG	AAA ACA ACG ACG CCA CC	62	105	14
<i>IRF2</i>	GCG AGT CGC GGA TTT AC	GCT TCC CCA AAT CGC GAC GAC GAA	CAT TAA CGA ACA ACG CCG	65	113	11
<i>IRF3</i>	GGG TCG ATA ATC GGT TTA GC	CCC AAC GTT CCG CCC TTT CTA CGC	CCC GCT AAA CTA TTC CCG	62	134	16
<i>IRF4</i>	TAG TTT TCG AAG CGG CG	CGC CCG AAA AAC GCA CCT CCA ACC G	AAA TAA AAT TCC CGC GCC	*	88	17
<i>IRF5</i>	GGG TAT TGT TCG CGT TC	CCG AAC ACT TCC GCG TCT TAC CGC	CAA ACT ACG CCT CCC G	64	104	12
<i>IRF6</i>	GTC GGG TAG TTT AGA AAC GC	TCG CAT CCG CCC GAC CAC G	CCG AAC TCA CGT CAA CG	62	145	18
<i>IRF7</i>	TTT TTC GTT TTT TCG CGA GAC	TCG CTC CCG ACC TAC ACC GCG	TAC CCC TCC GAA ATC ACG	60	132	14
<i>IRF8</i>	TAA GTT GAC GTT ATT GGT CGG	ACG ATA CGC CAA CGA TCG CGC GAC	CAC GCT TAC TAC CGC G	62	117	16
<i>IRF9</i>	TAA AAA ATT AGT CGG GCG T	CTC ACT ACA AAC TCC GCC TCC CGA	TTT AAA ACG AAA TCT CGC TC	*	159	11

3.8.7 Análise de PCR Quantitativa Metilação Específica em Tempo Real (QMSP)

A técnica que foi utilizada para avaliar os níveis de metilação é um método quantitativo, que permite analisar a amplificação em tempo real do produto. Nesta abordagem, amostras de DNA bissulfito convertido foram amplificadas utilizando iniciadores e sonda específicos (**Tabela 8**) para a região promotora de cada gene alvo estudado, que se anelam especificamente às sequências metiladas bissulfito convertidas. Como controle interno, foi utilizado o gene β -actina (ACTB) na qual, os iniciadores e sonda (**Tabela 8**) se anelam a região sem sítios CpGs. Sendo assim, a amplificação do controle interno é independente do grau de metilação do DNA e é utilizado para controlar a quantidade de DNA colocada na reação, o que serviu posteriormente para a normalização e determinação dos níveis de metilação dos nove genes avaliados.

Os iniciadores flaqueiam uma sonda fluorogênica de hibridização marcada com um fluoróforo “reporter”, ou seja, emissor de fluorescência a 5’ (FAM – 6-carboxi-fluoresceína) e na extremidade 3’ um fluoróforo “quencher”, ou seja, receptor (Iowa Black). A atividade 5’ exonuclease da enzima Taq DNA polimerase cliva a sonda durante a fase de extensão e libera o “repórter” cuja fluorescência é detectada pelo laser. Após a fluorescência ultrapassar o limiar de detecção, a amplificação da PCR resulta em um sinal de fluorescência proporcional à quantidade de produto de PCR gerado. Portanto o nível de fluorescência detectado é proporcional à quantidade de produto amplificado.

As reações de amplificação foram realizadas em um volume final de 20 μ L, nas seguintes condições: 1 μ L (~50 ng) de DNA genômico modificado com bissulfito; 600nM de iniciadores direto e reverso, 200nM de sonda; 0,6 unidades de *platinumTaq DNA polimerase* (Invitrogen); 200 μ M de dNTPs; 2 μ L de tampão de reação 10X

(contendo sulfato de amônio 166 mM, Tris-HCl (pH 8,0) 670 mM, cloreto de magnésio 67 mM, β mercaptoetanol 100 mM, DMSO 1%) e 0,4 μ L de *ROX ReferenceDye* (Invitrogen), que atua como um normalizador da fluorescência.

As reações foram realizadas seguindo as condições: 95°C durante 3 minutos, seguido de 50 ciclos a 95°C durante 15 segundos e o tempo de ligação dos iniciadores foram variáveis de acordo com cada gene (**Tabela 8**) durante o tempo de 1 minuto, para se obter uma maior eficiência e especificidade da reação.

Antes da realização das reações de QMSP, foram realizadas as padronizações de todos os conjuntos de iniciadores e sondas para verificar e estabelecer a temperatura ótima da reação (**Tabela 8**).

As reações foram feitas em placas de 96 poços (Applied Biosystems) no *ViiA™ 7 Real-Time PCR System* (Applied Biosystems, Foster City, CA) e as corridas analisadas com o auxílio do programa *ViiA 7 RUO Software v1.2* (Applied Biosystems). Cada placa continha amostras de pacientes normais e tumorais em triplicata, e três controles negativos (NTC) em que se adicionou água no lugar do DNA molde. Além das amostras, cada placa também continha 11 poços destinados a curva padrão construída a partir da diluição seriada do DNA de leucócitos de indivíduo normal metilado *in vitro* como descrito anteriormente. Para se obter a quantidade de DNA total na reação, o gene *ACTB* foi utilizado como referência interna.

Para as reações foram adotados os seguintes critérios: as amostras foram consideradas metiladas quando foi possível detectar a amplificação de pelo menos duas das triplicatas. Nos casos em que apenas uma das triplicatas era amplificada, os experimentos foram repetidos e consideradas metiladas caso o resultado fosse confirmado. A ausência de amplificação indicava que a amostra não era metilada. Além disso, para utilizar a curva padrão na quantificação da metilação nas amostras,

consideramos o mínimo de três pontos com sinal de amplificação.

O nível relativo de DNA metilado para cada gene em cada amostra foi determinado como a razão entre as médias das triplicatas do gene de interesse dividido pelo valor da média das triplicatas da amostra em questão para *ACTB*, e então este valor multiplicado por 1000, para a melhor representação dos dados.

3.8.8 Purificação do produto de PCR para sequenciamento

Para o sequenciamento, os produtos de PCR foram purificados com o kit *Wizard SV Gel and PCR Clean-up System (Promega)*. Seguindo protocolo do fabricante, os produtos amplificados foram aplicados em gel de agarose 2% com tampão TAE 1X, e submetidos a uma corrida de eletroforese a 100V e 400mA por 50 minutos. Com o auxílio do transiluminador UV, as bandas foram cortadas com um bisturi, colocadas em um tubo de 1,5 mL e pesadas em balança científica. O tamanho esperado dos fragmentos amplificados para cada gene pode ser observado na **Tabela 8**.

De acordo com o peso obtido de cada fragmento do gel, foi adicionado o tampão de ligação numa razão de 10 µL da solução a cada 10 mg do gel, e então foram incubados a 60°C por 10 minutos até dissolução completa do gel. O gel dissolvido foi transferido para a coluna SV com o tubo coletor e centrifugada a 14.000 RPM por um minuto. A coluna foi lavada com a adição do tampão de lavagem contendo etanol por duas vezes, o produto foi precipitado, e posteriormente eluído em 50 µL de água ultra-pura e armazenado a -20°C.

3.8.9 Sequenciamento

Para avaliar a eficiência do tratamento por bissulfito das amostras de DNA foram utilizados os produtos da PCR quantitativa metilação específica em tempo real (QMSP) purificados.

O sequenciamento dos produtos tratados por bissulfito de sódio fornece base qualitativa e eficiente para identificar a citosina metilada. Esse método foi introduzido primeiramente por Frommer et al.⁷² e baseia-se nas reações de deaminação da citosina após o tratamento⁷³.

Os produtos de PCR foram purificados com 2 µL da enzima *Exo SAP-IT* (USB) a cada 5µL do produto da PCR purificado do gel. A reação foi incubada a 37°C durante 30 minutos, seguido de 15 minutos a 80°C. A partir das amostras tratadas com *Exo SAP*, foi adicionado 1 µL de reagente *Big Dye*, 1,5 µL de tampão 5X do *kit DNA Sequencing BigDye Terminator v3.1* (Applied Biosystems) e 1 µL do iniciador empregado na amplificação (3,2 µM). Para análise da eficiência da conversão por bisulfito foi utilizado o iniciador direto de *ACTB*. O volume final da reação foi de 10 µL. A reação final foi incubada em termociclador *Veriti® 96-Well Thermal Cycler* (Applied Biosystems) por 30 ciclos de 96°C por 10 segundos, 50°C por 5 segundos e 60°C por 4 minutos. Após a ciclagem utilizou-se *Big Dye X-Terminator Purification Kit* (Applied Biosystems). Essa etapa teve como objetivo purificar o produto das reações de sequenciamento mediante o uso de 10 µL de *X-Terminator Solution* – que captura os dNTPs e os íons de sal não incorporados durante a reação de sequenciamento - e 45 µL de *SAM Solution* – que potencializa a performance do *X-Terminator Solution* e estabiliza a amostra após a purificação. Finalmente, os produtos da PCR foram sequenciados utilizando o equipamento *3500 Genetic Analyzer* (Applied Biosystems).

3.15 Análise Estatística

As variáveis epidemiológicas, clínicas e moleculares quando contínuas foram apresentadas como mediana, valores mínimo e máximo e quando variáveis categóricas foram apresentadas pelas frequências e porcentagens.

Inicialmente, análise estatística para expressão gênica e metilação dos genes *IRFs* foi tratada como uma variável contínua (quantitativa). É importante enfatizar que a partir dessa análise numérica, avaliamos o nível de metilação e expressão para cada gene. A associação entre o nível de expressão e metilação dos genes *IRFs* com as variáveis de interesse foi avaliada por meio dos testes não-paramétricos Mann Whitney (comparação entre dois grupos) e Kruskal Wallis (comparação de 3 grupos ou mais). Para esses testes, o nível de significância adotado foi para um $p < 0.05$. Na comparação de três grupos ou mais, no caso de significância estatística, foi utilizado a correção de Bonferroni, para verificar a significância no pós teste. Como pós teste para a comparação entre os dois grupos foi utilizado o Mann Whitney.

Os resultados de metilação foram constituídos de muitos zeros e existia uma amplitude muito grande dos dados. Portanto, os dados de metilação foram categorizados, para se estabelecer um perfil de metilação tumoral (metilados) e não tumoral (não metilados). Essa análise permitiu verificar aonde estava a diferença entre os grupos utilizando-se frequência dos pacientes metilados ou não metilados em cada classe avaliada. Dessa forma, foi determinado um ponto de corte utilizando a curva ROC, considerando o melhor ponto, aquele que apresentou a melhor sensibilidade e especificidade na comparação entre casos e controles. Para a avaliação desse ponto, foram analisados a área sob a curva (AUC), a sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo, valor preditivo negativo e acurácia e seus respectivos intervalos de

confiança de 95%. Quando os valores não foram discriminados pela curva ROC, utilizou-se a mediana do grupo controle e do grupo caso para estabelecer o ponto de corte. No caso dos dados que não foram discriminados em nenhum dos métodos descritos acima, utilizou-se como último recurso o valor mais alto do grupo controle como ponto de corte. Pela análise categórica da metilação, podemos identificar quantos pacientes eram metilados para um perfil tumoral para um determinado gene e quantos não era metilados.

Para a análise da metilação baseada nas classes determinadas pelo ponto de corte descrita acima, a metilação foi relacionada com as características clínicas dos pacientes, pelo Teste Qui-quadrado ou Teste Exato de Fisher.

A sobrevida global e sobrevida livre de eventos foram avaliadas pelo método de Kaplan-Meier. Para a sobrevida global, foi considerado como evento o óbito por qualquer causa, sendo o tempo de acompanhamento a data de diagnóstico até a data do óbito. As diferenças entre as curvas de sobrevivência foram feitas pelo teste de *LogRank*. Posteriormente, a relação (conjunta) das características clínicas e moleculares em relação a sobrevivência foi realizada através da regressão de COX múltipla. Para isso, foram selecionadas apenas aquelas que obtiveram $p < 0,2$ no teste anterior.

O odds-ratio (OR) com intervalo de confiança de 95% (IC95%) foi demonstrado para os desfechos analisados pela regressão logística.

Em todo o estudo foi considerado um nível de significância de 5%. Os dados foram analisados no programa estatístico SPSS v.21. Os gráficos foram elaborados com o auxílio do programa GraphPad Prism v.6.

4. RESULTADOS

4.1 Características Epidemiológicas e Clínicas dos Pacientes Portadores de SMD

Dos 119 pacientes diagnosticados com SMD, incluídos neste estudo, 58/119 (48,8%) foram do sexo feminino e 61/119 (51,2%) foram do sexo masculino. A média da idade foi de 67 anos, mediana de 70 anos (mínima: 15 anos, máxima: 91 anos), sendo que 75% estava acima dos 60 anos. Dos 119 pacientes, 112 informaram quanto a origem de moradia, 71/112 pacientes (63,4%) eram de origem urbana e 41/112 (36,6%) tinham origem rural.

Os 119 pacientes avaliados foram classificados de acordo com a OMS, sendo 106/119 (89%) foram classificados como SMD primária, 8/119 (7%) SMD relacionada a terapia (RT-SMD) e 5/119 (4%) Leucemia Mielomonocítica Crônica (LMMC). Dentre os pacientes com SMD primária, o subtipo mais frequente foi a CRDM (51% - 59/106 pacientes), seguido pelo subtipo AREB (19% - 20/106 pacientes), ARSA (13% - 14/106 pacientes), CRDU (12% - 13/106 pacientes). A **Tabela 9** demonstra as variáveis clínicas dos pacientes

Tabela 9: Variáveis clínicas dos pacientes com SMD.

VARIÁVEIS	NÚMERO DE PACIENTES	PERCENTAGEM DE PACIENTES %
IDADE	119	100%
≤60	30	25,2%
>60-70	32	26,9%
>70-80	33	27,7%
>80	24	20,2%
HEMOGLOBINA, G/DL	119	100%
≥ 10	33	27,7%
8-<10	32	26,9%
<8	54	45,4%
ANC	119	100%
≥ 800	78	65,5%
<800	41	34,5%
PLAQUETAS	119	100%
≥ 100	56	47,1%
50-<100	32	26,9%
<50	31	26,1%
BLASTOS MO	119	100%
≤ 2	86	72,2%
>2% - <5%	11	9,2%
5%-10%	13	11,0%
>10%	9	7,6%
SIDEROBLASTOS EM ANEL	119	100%
0	88	74%
>1-<15%	9	8%
≥ 15%	22	18%
DEPENDÊNCIA TRANSFUSIONAL	110	92%
Não	49	44,5%
Sim	61	55,5%
CELULARIDADE MEDULAR	81	67%
Hipocelular	12	14,8%
Normocelular	14	17,3%
Hipercelular	55	67,9%
FIBROSE MEDULAR	22	18%
Ausência de fibrose	12	31,6%
Presença de fibrose	10	68,4%

Quanto as terapias utilizadas em pacientes com SMD na população estudada, encontram-se descrita na **Tabela 10**. A forma terapêutica mais utilizada foi eritropetina (49% dos pacientes). Entretanto 30% dos pacientes não apresentaram resposta a esse tipo de tratamento necessitando de outras terapias, como o tratamento com hipometilantes (17% dos pacientes).

Tabela 10. Frequência das modalidades terapêuticas aplicadas em com paciente com SMD.

TRATAMENTO		RESPOSTA AO TRATAMENTO					
		USO		COM RESPOSTA		SEM RESPOSTA	
		N	%	N	%	N	%
Eritropoetina	Não	60	51%	*	*	*	*
	Sim	57	49%	17%	36%	30	67%
Lenalidomida	Não	112	96%	*	*	*	*
	Sim	5	4%	0	0%	5	100%
Hipometilante	Não	97	83%	*	*	*	*
	Sim	20	17%	7%	50%	7	50%
Quimioterapia	Não	112	97%	NA	NA	NA	NA
	Sim	4	3%	NA	NA	NA	NA
TMO	Não	111	96%	NA	NA	NA	NA
	Sim	5	4%	NA	NA	NA	NA

*NA- Não avaliado

4.1.1 Citogenética Clássica

A citogenética clássica foi realizada para todos os pacientes participantes do estudo, a fim de se obter o perfil citogenético de cada paciente. Entretanto, 81/119 (68%) pacientes foram obtidas metáfases para análise citogenética e 31/119 (32%) pacientes não se obteve metáfases, impossibilitando a realização dessa análise. Sendo assim, dos pacientes que obtiveram resultado de banda-G, 44/81 pacientes (54%) possuíam cariótipo normal e 37/81 pacientes (46%) apresentaram cariótipo alterado.

A alteração cromossômica mais comum envolveu o cromossomo 5 (5q-), ocorrendo em 15/46 pacientes (41%). Foram observadas outras alterações frequentes envolvendo o cromossomo 7 (7/7q-) em 7/46 casos (15%), cromossomo 17 (-17/17p-) em 5/46 casos (11%), cromossomo 11 em 4/34 caso (8%) e cromossomo 20 (-20/20q-) em 2/46 (4%) dos pacientes.

Os pacientes com cariótipo foram estratificados de acordo com a classificação de grupos citogenéticos estabelecido pelo IPSS E R-IPSS (**Figura 1**). Conforme o IPSS, 52/81 pacientes (64%) foram classificados como cariótipo de prognóstico favorável,

18/81 pacientes (24%) como prognóstico intermediário e 10/81 como prognóstico desfavorável. De acordo com o R-IPSS, 2/81 pacientes (3%) foram classificados como tendo cariótipo de prognóstico muito favorável, 53/81 pacientes (68%) como cariótipo de prognóstico favorável, 17/81 (22%) prognóstico intermediário, 2/81 (3%), como prognóstico desfavorável e 4/81 (5%) como prognóstico muito desfavorável (**Figura 1**).

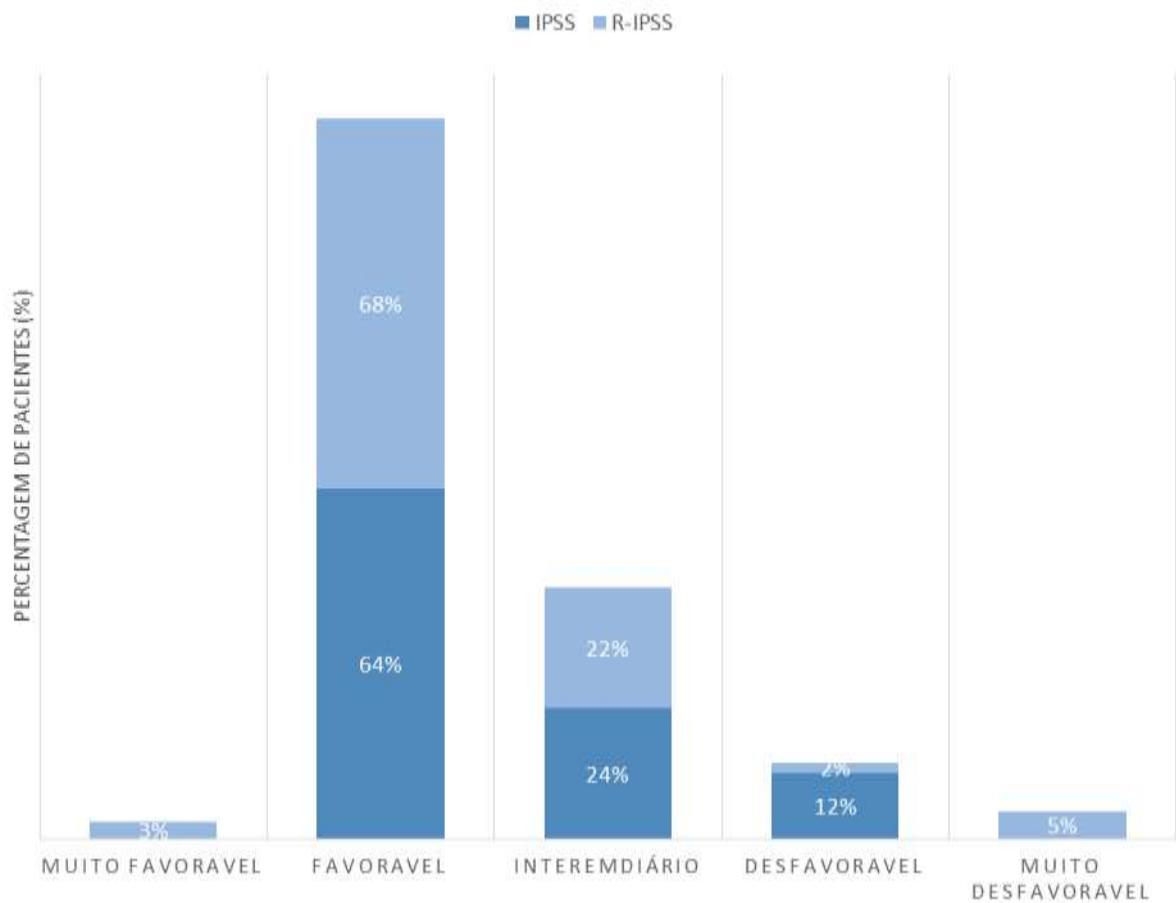


Figura 1. Distribuição dos pacientes portadores de SMD, estratificados de acordo com a classificação de grupos citogenéticos estabelecido pelo IPSS E R-IPSS.

4.1.2 Estratificações de risco dos pacientes com SMD

Dos 81 pacientes com resultado de citogenética, 78 pacientes (pacientes com SMD primária) tiveram a discriminação do risco prognóstico. A grande maioria dos pacientes foram estratificados nas classes de menor risco (baixo e intermediário) de acordo com os critérios dos índices de prognósticos IPSS, R-IPSS e WPSS. Segundo os critérios estabelecidos pelo IPSS, 27% (21/78) dos pacientes foram baixo risco, 58% (45/78) dos pacientes de risco intermediário I, 10% (8/78) dos pacientes, com risco intermediário II e somente 5% dos pacientes (4/78) foram de alto risco. Pela estratificação de risco do R-IPSS, 17% (13/78) dos pacientes foram de risco muito baixo, 50% (39/78) dos pacientes foram de risco baixo, 15% (12/78) foram de risco intermediário, 9% (7/78) dos pacientes de risco alto e 9% (7/78) dos pacientes de risco muito alto. Finalmente, baseado nos critérios do WPSS, 8% (6/73) dos pacientes foram de risco muito baixo, 34% (25/73) dos pacientes de risco baixo, 34% (25/73) dos pacientes de risco intermediário, 19% (14/73) dos pacientes de risco alto e 4% (3/73) dos pacientes com risco muito alto (**Figura 2**).

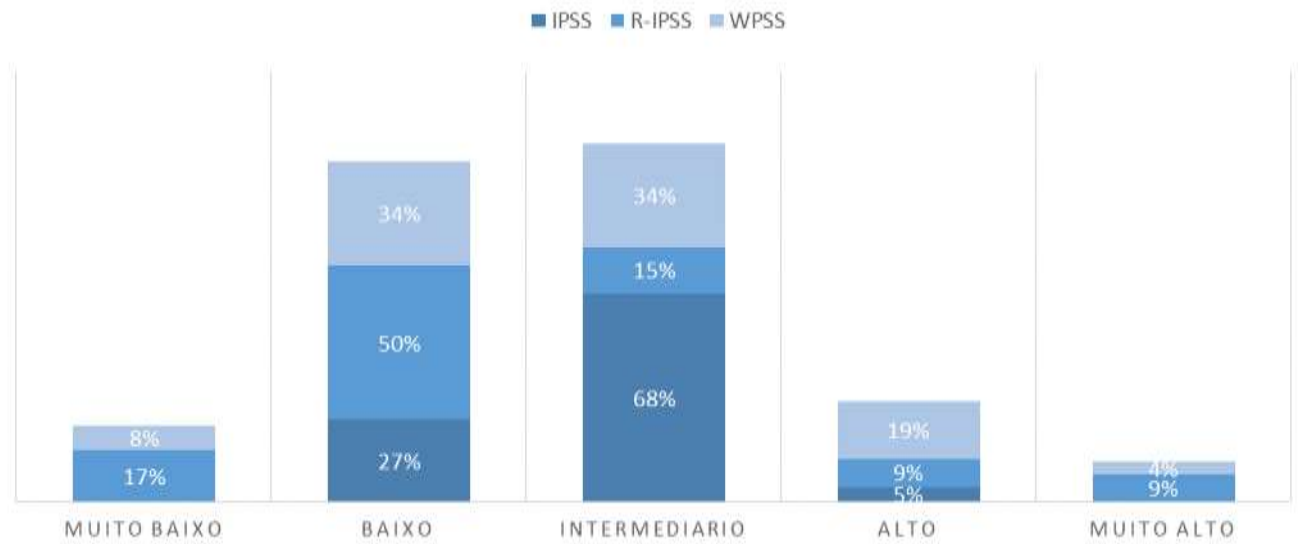


Figura 2. Distribuição dos pacientes portadores de SMD, estratificados de acordo com as classes de risco estabelecido pelo IPSS, R-IPSS e WPSS.

4.2 Critérios da Análise de Metilação e Expressão Gênica de Acordo com os tipos Celulares

4.2.1 Critérios para análise de metilação do IRFs

A análise de metilação dos genes dos IRFs foi realizada de duas maneiras distintas. Inicialmente, a metilação dos genes foi considerada como uma variável numérica (quantitativa), utilizando a mediana para comparar os níveis de metilação entre as variáveis avaliadas. Posteriormente, consideramos metilação como uma variável categórica (qualitativa) para comparar as diferenças entre as variáveis avaliadas. Foram utilizadas duas metodologias para a realização da categorização da metilação.

Primeiramente, a metilação foi categorizada pela análise da curva ROC. Para cada gene avaliado, levando em consideração todas as amostras (controles e casos) foi determinado o ponto de corte no nível de metilação capaz de discriminar com a maior sensibilidade e especificidade os grupos controle e caso. Posteriormente, levando-se em conta que a metilação observada nas amostras normais seja fisiológica, a metilação foi determinada utilizando-se como ponto de corte o maior valor de metilação observado no grupo controle. Esta análise está representada pela **Tabela 11**.

Entre essas duas análises, o ponto de corte foi determinado como aquele que apresentou a maior sensibilidade e especificidade na discriminação entre casos e controles. Com exceção do gene *IRF8* para o qual utilizamos o ponto de corte determinado pela curva ROC, para todos os demais genes o ponto de corte foi utilizado como o maior valor de metilação observado no grupo controle (tabela 7 e 8). A partir da determinação destes pontos de corte, as amostras que apresentaram níveis de metilação

abaixo do ponto foram consideradas não-metiladas, enquanto aquelas acima do ponto de corte consideradas metiladas.

Após a categorização das amostras, esses dados foram utilizados para realizar as associações com as características clínicas dos pacientes.

Tabela 11. Pontos de corte estabelecidos pela curva ROC ou maior valor do grupo controle para cada gene para a análise categórica da metilação.

Gene	Ponto de Corte	Sensibilidade (%)	Especificidade (%)	Prevalência da Doença (%)	VPP (%)	VPN (%)	Acurácia (%)
<i>IRF1</i>	0.65	47,2 (36,7 - 58,0)	36,4 (10,9 - 69,2)	89,2 (81,5 - 94,5)	86,0 (73,3 - 94,2)	7,7 (2,1 -18,5)	46
<i>IRF2</i>	0.0	18,9 (11,3 - 28,2)	90,9 (58,7 - 99,8)	89,2 (81,5 - 94,5)	94,4 (72,7 - 99,9)	11,9 (5,9 - 20,8)	26
<i>IRF3</i>	0.0	48,3 (37,8 - 59,1)	100,0 (71,5 - 100,0)	89,2 (81,5 - 94,5)	100 (91,9- 100,0)	18,9 (9,9- 41,4)	54
<i>IRF5</i>	0.0	47,3 (36,7 - 58,0)	100,0 (71,5 -100,0)	89,2 (81,5 - 94,5)	100 (91,8 - 100,0)	18,6 (9,7 - 30,9)	53
<i>IRF6</i>	0.48	54,9 (44,2 - 65,4)	9,1 (0,23 - 41,3)	89,2 (81,5 - 94,5)	83,3 (71,5 - 91,7)	2,38 (0,06 - 12,6)	50
<i>IRF7</i>	0.0	19,8 (12,2 - 29,5)	90,0 (58,7 - 99,8)	89,2 (81,5 - 94,5)	94,7 (73,9 - 99,9)	12,1 (5,9 - 21,0)	27
<i>IRF8*</i>	0.3582	81,8 (48,2 - 97,7)	68,1 (57,5 - 77,5)	10,9 (5,5 - 18,5)	23,7 (11,4 - 40,2)	96,8 (89,2 - 99,6)	70

*Valores entre parênteses, intervalo de confiança (95% IC); VPP – valor preditivo positivo; VPN – valor preditivo negativo; * o gene IRF8 foi o único gene para qual o ponto de corte utilizado foi o determinado pela curva ROC, para os outros genes o ponto de corte foi determinado como o maior valor de metilação no grupo de controles.*

4.3.2 Critérios para análise de expressão gênica dos IRFs

A associação da expressão genica dos IRFs foi realizada considerando-a como variável quantitativa. Para as análises de sobrevida e risco de evolução para LMA, a expressão foi considerada como variável categórica estabelecida pelos pontos de cortes descrito na Tabela 8.

Primeiramente, a expressão foi categorizada pela curva ROC. Para cada gene avaliado, levando em consideração todas as amostras (controles e casos) foi determinado o ponto de corte no nível de metilação que fosse capaz de discriminar com a maior sensibilidade e especificidade controles e casos. Dessa forma, poderíamos discriminar um perfil de expressão baixo para as amostras com nível de expressão abaixo desse ponto e um perfil de expressão alto para níveis de expressão acima deste ponto. A expressão dos genes *IRF2*, *IRF3*, *IRF7* e *IRF9* foram categorizados através da curva ROC. Para a análise da expressão dos outros *IRFs*, o critério utilizado foi a mediana do grupo controle de cada gene e considerar esse ponto como corte para a metilação entre casos e controles (**Tabela 12**).

Tabela 12. Pontos de corte estabelecidos pela curva ROC ou mediana do grupo controle de cada gene para a análise categórica da expressão gênica dos IRFs.

Gene	Ponto de Corte	Sensibilidade (%)	Especificidade (%)	Prevalência da Doença (%)	VPP (%)	VPN (%)	Acurácia (%)
<i>IRF1</i> **	0.5843	52,3 (41,4 – 63,0)	63.6 (30.8 – 89.0)	88.9 (80.9-94.3)	92.0 (80.7 – 97.8)	14.3 (5.9 – 27.2)	53.5
<i>IRF2</i> *	0.0388	87.5 (78.7 – 93,5)	72.7 (39.0 – 93.9)	88.8 (80.9 – 94.3)	96.2 (89.4 – 99.2)	42.1 (20.2– 66.5)	85.9
<i>IRF3</i> *	0.0373	77.5 (67.5 – 85.7)	63.4 (30.8 -89.0)	89.0 (81.1 – 94.4)	94.5 (86.5 – 98.5)	25.9 (11.1- 46.3)	76.0
<i>IRF4</i> **	0.0213	46.6 (35.8 – 57.5)	18.2 (2,3 – 51.8)	88.8 (80.9 – 94.3)	82.0 (68.5 – 91.4)	4.08 (0.5 – 13.9)	43.4
<i>IRF5</i> **	0.0213	50.5 (39.7 – 61.3)	45.5 (16.7 – 76.6)	89.0 (81.1 – 94.4)	88.2 (76.1 – 95.5)	10.2 (3.4 – 22.2)	50.0
<i>IRF6</i> **	0.00055	51.7 (40.8 – 62.4)	54.5 (23.4 – 83.3)	89.0 (81.2 – 94.4)	90.2 (78.6 – 96.7)	12.2 (4.6 – 24.8)	52.0
<i>IRF7</i> *	0.0604	73.0 (62.5 – 81.9)	63.6 (30.7 – 89.0)	89.0 (81.1 – 94.4)	94.2 (85.8 – 98.4)	22.5 (9,5 – 41.1)	72.0
<i>IRF8</i> **	0.01142	50.5 (39.7 – 61.3)	54.5 (23.3 – 83.2)	89.0 (81.2 – 94.3)	90.0 (78.1 – 96.6)	12.0 (4.53– 24.3)	51
<i>IRF9</i> *	0.0281	82.0 (72.4 – 89.7)	63.6 (30.8 – 89.0)	89.0 (81.2 – 94.4)	94.8 (87.2 – 98.5)	30.4 (13.2- 52.9)	80.0

*Valores entre parênteses, intervalo de confiança (95% IC); VPP – valor preditivo positivo; VPN – valor preditivo negativo; * genes com ponto de corte pela curva ROC; ** genes componto de corte definidos pela mediana dos grupos controle.*

Em nosso trabalho foram consideradas as seguintes associações:

- Grupo: Controles e Casos;
- OMS: AR, ARSA, CRDM, AREB, RT-SMD, LMMC;
- Formas SMD: Iniciais (AR + ARSA + CRDM) e Avançadas (AREB);
- Cariótipo: Normal e Alterado;
- Aneuploidia: Normal, Alterado não aneuplóide e Aneuplóide;
- Deleção 5q: Normal, Alterado com 5q- e Alterado sem 5q-;
- Monossomia 7/ del 7q: Normal, Alterado com 7q- e Alterado sem 7q-;
- Classificação Cariótipo IPSS: Favorável, Intermediário, Desfavorável e Muito Desfavorável;
- Classificação Cariótipo R-IPSS: Muito Favorável, Favorável, Intermediário, Desfavorável e Muito Desfavorável;
- Celularidade da MO: hipocelular, normocelular e hipercelular;
- Displasia MO: diseritropoese, dismegacariopoese e disgranulopoese;
- Fibrose na medula óssea: Presente e Ausente;
- Fibrose MO presente: Grau I, Grau II, Grau III e Grau IV;
- ALIPS: Presente e Ausente;
- Micromegacariócitos: Presente e Ausente;
- Hemoglobina (R-IPSS): > 10 , $\leq 10 - \geq 8$, < 8 g/dL;
- Contagem de Neutrófilos (ANC): $ANC \geq 800/\mu\text{L}$ e $ANC < 800/\mu\text{L}$;
- Contagem de plaquetas: ≥ 100.000 , $\leq 50 - \leq 100.000$ e $< 50.000/\mu\text{L}$;
- Citopenias (IPSS): 0, 1, 2 e 3;
- Citopenias (R-IPSS): 0, 1, 2 e 3;
- Porcentagem de Blastos (R-IPSS): $\leq 2\%$, > 2 e $< 5\%$, $5\% - 10\%$, $> 10\%$;
- Risco (IPSS): baixo, intermediário-1, intermediário-2 e alto;
- Risco (R-IPSS): muito baixo, baixo, intermediário, alto e muito alto;
- Risco (WPSS): muito baixo, baixo, intermediário, alto e muito alto;
- Dependência transfusional: Não e Sim;
- Tratamento com eritropoietina: Sem resposta e com resposta;
- Tratamento com hipometilantes: Sem resposta e com resposta;
- Amostra: Diagnóstico e Seguimento;

- Progressão de doença: Sim e Não;
- Evolução (LMA): Sim e Não;

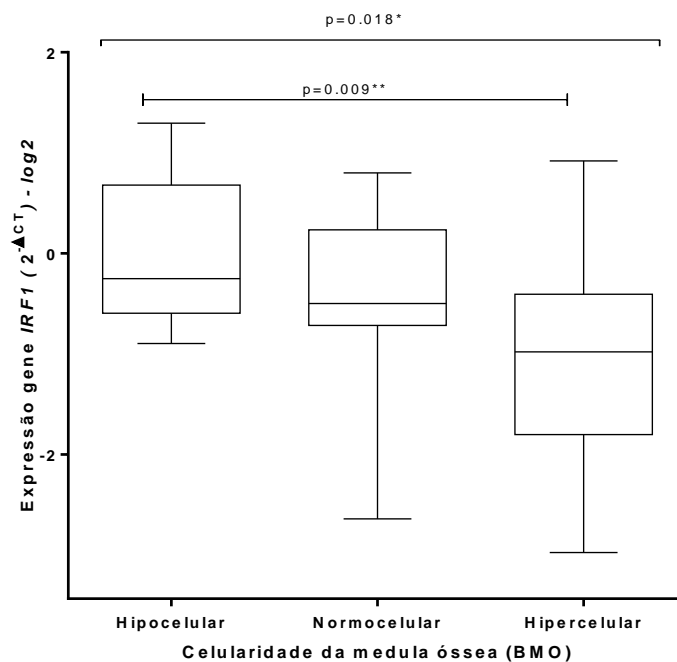
A partir deste momento, para facilitar o entendimento, os resultados serão apresentados gene a gene para as análises realizadas. As variáveis relacionadas a fibrose medular, presença de alips e relacionadas a tratamento não tiveram associações relevantes e por esse motivo não serão demonstradas nas análises a seguir.

4.4 Análise de Metilação da Região Promotora e expressão dos Genes *IRFS* a Partir de Amostras de Medula Total

4.4.1 Gene *IRF1*

4.4.1.1 Expressão do gene *IRF1*

Para análise da expressão do gene *IRF1* foi observada uma associação entre os níveis de expressão do gene *IRF1* e a celularidade da medula óssea ($p=0,0018$) (**Figura 3**) (**Tabela 13**). Um maior nível de expressão do gene *IRF1* (1.66 vezes mais) está associado a pacientes com medula óssea hipocelular (**Figura 3**).



* Valor do p para o teste de Kruskal-Wallis (comparação do grupo), $p < 0,05$.

**Valor p abaixo do valor da correção de Bonferroni ($p=0,0166$), para o teste de Mann-Whitnet U, realizado como pós teste.

Figura 3. Expressão gênica do gene *IRF1* em células de medula total entre pacientes medula hipocelular, normocelular e hipercelular de acordo com a BMO.

O gene *IRF1* é mais expresso em células de pacientes com medula hipocelular quando comparados a pacientes com medula normo e hipercelular.

Tabela 13. Análise expressão do gene *IRF1* de acordo com as variáveis clínicas dos pacientes com SMD.

Variáveis clínicas	Classes	<i>IRF1</i>			p-Valor	
		N	Mediana	Mínimo		Máximo
Grupo	Controle	11	0,54905	0,15767	0,88577	0,148
	Caso	88	0,59978	0,12718	2,45377	
OMS	AR	11	0,53589	0,16043	2,45377	0,679
	ARSA	12	0,46713	0,16437	1,27456	
	CRDM	37	0,63288	0,12718	1,89212	
	AREBs	16	0,55963	0,32197	1,60214	
	LMMC	3	0,55287	0,24827	0,78187	
	RT-SMD	7	0,55671	0,17374	1,49485	
Formas SMD	Baixo Risco	60	0,60500	0,12718	2,45377	0,984
	Alto Risco	17	0,55671	0,32197	1,60214	
Cariótipo						
Cariótipo Normal X Alterado	Normal	31	0,50698	0,16043	1,31039	0,185
	Alterado	22	0,60186	0,12718	1,60214	
Aneuploidia	Normal	31	0,50698	0,16043	1,31039	0,284
	Alterado com aneuploidia	8	0,61999	0,17374	0,84968	
	Aneuploide	14	0,57676	0,12718	1,60214	
deleção 5q	Normal	31	0,50698	0,16043	1,31039	0,208
	Alterado com 5q-	8	0,59978	0,17374	0,84090	
	Alterado sem 5q-	13	0,60710	0,17374	1,60214	
-7/7q	Normal	31	0,50698	0,16043	1,31039	0,109
	Alterado com -7/7q	5	0,74098	0,37242	1,60214	
	Alterado sem -7/7q	16	0,59978	0,17374	1,26138	
Grupos Citogenéticos IPSS	Favorável	36	0,55768	0,16043	1,31039	0,907
	Intermediário	12	0,58955	0,12718	1,26138	
	Desfavorável	5	0,55478	0,31534	1,60214	
Grupos Citogenéticos R-IPSS	Muito favorável	1	0,69737	0,69737	0,69737	0,779
	Favorável	36	0,56156	0,16043	1,31039	
	Intermediário	9	0,55287	0,12718	1,26138	
	Desfavorável	1	0,55478	0,55478	0,55478	
	Muito desfavorável	3	0,65975	0,31534	1,60214	
Características da BMO						
Celularidade BMO	Hipocelular	7	0,84090	0,53775	2,45377	0,018
	Normocelular	8	0,70806	0,16043	1,74110	
	Hipercelular	45	0,50698	0,12718	1,89212	
Diseritropoese BMO	Ausência	24	0,65539	0,12718	1,89212	0,313
	Presença	27	0,55864	0,16099	1,74110	
Dismegacariopese BMO	Ausência	34	0,55575	0,16099	1,89212	0,086
	Presença	17	0,67129	0,12718	1,49485	
Disgranulopese BMO	Ausência	15	0,55287	0,16099	1,60214	0,193
	Presença	36	0,66897	0,12718	1,89212	
Micromegacariocito BMO	Ausência	48	0,59978	0,16099	1,74110	0,598
	Presença	12	0,55103	0,12718	1,89212	

Continuação Tabela 13. Análise expressão do gene *IRF1* de acordo com as variáveis clínicas dos pacientes com SMD.

Variáveis clínicas	Classes	N	<i>IRF1</i>			p-Valor
			Mediana	Mínimo	Máximo	
Citopenias						
HB (R-IPSS)	≥ 10	18	0,55575	0,17374	0,84090	0,392
	8-<10	28	0,61789	0,12718	2,45377	
	<8	39	0,63069	0,16099	1,89212	
ANC (R-IPSS)	≥800	56	0,58035	0,16043	2,45377	0,219
	<800	29	0,65975	0,12718	1,74110	
Plaquetas (R-IPSS)	≥100	40	0,55479	0,16043	1,89212	0,773
	50-<100	23	0,66665	0,12718	2,45377	
	<50	22	0,61889	0,17374	1,74110	
Número de Citopenias (IPSS)	0	10	0,38962	0,17374	0,74484	0,250
	1	26	0,59978	0,16043	2,45377	
	2	24	0,61999	0,16099	1,49485	
	3	25	0,63949	0,12718	1,74110	
Número de Citopenias (R-IPSS)	0	10	0,38962	0,17374	0,74484	0,099
	1	34	0,59156	0,16043	1,89212	
	2	21	0,69979	0,16099	2,45377	
	3	20	0,60199	0,12718	1,74110	
Sideroblastos em anel						
Sideroblastos em anel	Ausência	55	0,58439	0,12718	2,45377	0,816
	Presença	26	0,58955	0,16099	1,74110	
Porcentagem de sideroblastos em anel	0	55	0,58439	0,12718	2,45377	0,162
	1-14%	6	0,67169	0,33102	1,74110	
	Acima de 15%	20	0,52143	0,16099	1,49485	
Blastos MO						
Porcentagem de blastos (R-IPSS)	Menor Igual a 2	59	0,60710	0,12718	2,45377	0,833
	>2% - <5%	9	0,59874	0,16043	1,19748	
	5%-10%	9	0,58035	0,33102	0,79554	
	>10%	8	0,35520	0,32197	1,60214	
Classificação de Risco						
Grupo de Risco (IPSS)	Baixo	15	0,39502	0,16043	0,84968	0,640
	Intermediário I	26	0,60082	0,12718	1,31039	
	Intermediário II	4	0,45916	0,31534	0,65975	
	Alto	4	0,46360	0,33102	1,60214	
	Muito baixo	6	0,38372	0,16099	0,84090	
Grupos de Risco (R-IPSS)	Baixo	26	0,59156	0,16437	1,31039	0,640
	Intermediário	8	0,55867	0,12718	1,26138	
	Alto	5	0,63949	0,55478	1,19748	
	Muito alto	5	0,33798	0,31534	1,60214	
Grupo de Risco (WPSS)	Muito baixo	4	0,44560	0,26794	0,84968	0,380
	Baixo	17	0,39502	0,16043	1,27456	
	Intermediário	16	0,60186	0,12718	1,31039	
	Alto	6	0,60992	0,31534	1,26138	
	Muito alto	3	0,37242	0,33102	1,60214	
Dependência transfusional, evolução e óbito						
Dependência transfusional	Não	33	0,55671	0,16043	2,45377	0,788
	Sim	47	0,60710	0,12718	1,89212	
Evolução	Não	74	0,58237	0,12718	2,45377	0,788
	Sim	11	0,60082	0,23407	1,11729	
Óbito	Não	33	0,55671	0,16043	2,45377	0,788
	Sim	28	0,64632	0,12718	1,89212	

4.4.1.2 Metilação da região promotora do gene *IRF1*

Para a análise de metilação do gene *IRF1* foi observada uma associação entre metilação e os subtipos de SMD classificados de acordo com a OMS e entre as formas de SMD ($p < 0.001$, respectivamente) (**Tabela 14**). A frequência de pacientes metilados para o gene *IRF1* foi menor nos subtipos AR e ARSA (22% e 0%, respectivamente). Por outro lado, no subtipo AREB, LMMC e RT-SMD foi encontrado uma percentagem maior de pacientes com metilação do *IRF1* (76%, 100% e 75%) (**Tabela 14**). Para a comparação entre as formas de SMD, o gene *IRF1* foi metilado em 82% dos pacientes com forma avançada e somente 33% dos pacientes com formas iniciais (**Tabela 14**).

A metilação do *IRF1* foi associada a pacientes com percentagem de blastos acima de 2% na medula óssea ($p = 0,018$) (**Tabela 14**). Pacientes com blastos entre $< 2\%$ - $< 5\%$, 5% - $< 10\%$ e $\geq 10\%$ apresentaram maior frequência do *IRF1* metilado (67%, 73% e 75%, respectivamente), enquanto os pacientes com blastos $\leq 2\%$ tiveram somente 35% dos pacientes com o gene *IRF1* metilado (**Tabela 14**).

Outra associação importante foi que a metilação do gene *IRF1* foi associada a categorias de risco do R-IPSS ($p = 0.006$) (**Tabela 14**). Uma alta frequência de pacientes com o *IRF1* metilado foi associada aos grupos de risco intermediário, alto e muito alto (71%, 100% e 80%, respectivamente) (**Tabela 14**).

Sendo assim, nossos resultados sugerem que a metilação dos *IRF1* está associada a formas mais agressivas da SMD, a uma maior percentagem de blastos e a um maior risco em SMD.

Tabela 14. Análise qualitativa da metilação da região promotora do gene *IRF1* de acordo com as variáveis clínicas dos pacientes com SMD.

Variáveis clínicas	Classes	<i>IRF1</i>				<i>p</i> -Valor
		Não Metilado		Metilado		
		N	%	N	%	
Grupo	Controle	4	36,4%	7	63,6%	0,353
	Caso	48	52,7%	43	47,3%	
OMS	AR	7	77,8%	2	22,2%	<0,001
	ARSA	13	100,0%	0	0,0%	
	CRDM	22	53,7%	19	46,3%	
	AREBs	4	23,5%	13	76,5%	
	LMC	0	0,0%	3	100,0%	
	RT-SMD	2	25,0%	6	75,0%	
Formas SMD	Baixo Risco	43	67,2%	21	32,8%	<0,001
	Alto Risco	3	17,6%	14	82,4%	
Cariótipo						
Cariótipo Normal X Alterado	Normal	19	54,3%	16	45,7%	0,601
	Alterado	11	44,0%	14	56,0%	
Aneuploidia	Normal	19	54,3%	16	45,7%	0,765
	Alterado com aneuploidia	4	44,4%	5	55,6%	
	Aneuploide	7	43,8%	9	56,3%	
Deleção 5q	Normal	19	54,3%	16	45,7%	0,567
	Alterado com 5q-	4	50,0%	4	50,0%	
	Alterado sem 5q-	6	37,5%	10	62,5%	
-7/7q	Normal	19	54,3%	16	45,7%	0,666
	Alterado com -7/7q	2	40,0%	3	60,0%	
	Alterado sem -7/7q	8	42,1%	11	57,9%	
Grupos Citogenéticos IPSS	Favorável	21	53,8%	18	46,2%	0,463
	Intermediário	8	53,3%	7	46,7%	
	Desfavorável	1	20,0%	4	80,0%	
Grupos Citogenéticos R-IPSS	Muito favorável	2	100,0%	0	0,0%	0,371
	Favorável	21	53,8%	18	46,2%	
	Intermediário	6	46,2%	7	53,8%	
	Desfavorável	0	0,0%	1	100,0%	
	Muito desfavorável	0	0,0%	2	100,0%	
Características da BMO						
Celularidade BMO	Hipocelular	2	28,6%	5	71,4%	0,341
	Normocelular	5	55,6%	4	44,4%	
	Hipercelular	27	60,0%	18	40,0%	
Diseritropose BMO	Ausência	11	50,0%	11	50,0%	0,389
	Presença	19	65,5%	10	34,5%	
Dismegacariopose BMO	Ausência	20	64,5%	11	35,5%	0,304
	Presença	10	50,0%	10	50,0%	
Disgranulopose BMO	Ausência	8	53,3%	7	46,7%	0,607
	Presença	22	61,1%	14	38,9%	
Micromegacariocito BMO	Ausência	29	65,9%	15	34,1%	0,262
	Presença	8	50,0%	8	50,0%	

Continuação Tabela 14. Análise qualitativa da metilação da região promotora do gene *IRF1* de acordo com as variáveis clínicas dos pacientes com SMD.

Variáveis clínicas	Classes	<i>IRF1</i>				p-Valor
		Não Metilado		Metilado		
		N	%	N	%	
Citopenias						
HB (R-IPSS)	>= 10	13	50,0%	13	50,0%	0,742
	8-<10	15	60,0%	10	40,0%	
	<8	20	51,3%	19	48,7%	
ANC (R-IPSS)	>=800	34	55,7%	27	44,3%	0,652
	<800	14	48,3%	15	51,7%	
Plaquetas (R-IPSS)	>=100	27	65,9%	14	34,1%	0,100
	50-<100	11	42,3%	15	57,7%	
	<50	10	43,5%	13	56,5%	
Número de Citopenias (IPSS)	0	6	50,0%	6	50,0%	0,521
	1	18	64,3%	10	35,7%	
	2	14	51,9%	13	48,1%	
	3	10	43,5%	13	56,5%	
Número de Citopenias (R-IPSS)	0	7	50,0%	7	50,0%	0,200
	1	23	65,7%	12	34,3%	
	2	10	45,5%	12	54,5%	
	3	8	42,1%	11	57,9%	
Sideroblastos em anel						
Sideroblastos em anel	Ausência	23	41,1%	33	58,9%	0,001
	Presença	21	80,8%	5	19,2%	
Porcentagem de sideroblastos em anel	0	23	41,1%	33	58,9%	0,004
	1-14%	5	83,3%	1	16,7%	
	Acima de 15%	16	80,0%	4	20,0%	
Blastos MO						
Porcentagem de blastos (R-IPSS)	Menor Igual a 2	40	64,5%	22	35,5%	0,018
	>2% - <5%	3	33,3%	6	66,7%	
	5%-10%	3	27,3%	8	72,7%	
	>10%	2	25,0%	6	75,0%	
Classificação de Risco						
Grupo de Risco (IPSS)	Baixo	10	62,5%	6	37,5%	0,249
	Intermediário I	16	53,3%	14	46,7%	
	Intermediário II	1	16,7%	5	83,3%	
	Alto	1	33,3%	2	66,7%	
Grupos de Risco (R-IPSS)	Muito baixo	4	40,0%	6	60,0%	0,006
	Baixo	22	71,0%	9	29,0%	
	Intermediário	2	28,6%	5	71,4%	
	Alto	0	0,0%	3	100,0%	
Grupo de Risco (WPSS)	Muito alto	1	20,0%	4	80,0%	0,163
	Muito baixo	3	100,0%	0	0,0%	
	Baixo	14	60,9%	9	39,1%	
	Intermediário	10	52,6%	9	47,4%	
Óbito	Alto	1	16,7%	5	83,3%	
	Muito alto	1	50,0%	1	50,0%	
Dependência transfusional, evolução e óbito						
Dependência transfusional	Não	21	52,5%	19	47,5%	0,461
	Sim	24	53,3%	21	46,7%	
Evolução	Não	42	51,2%	40	48,8%	0,491
	Sim	6	66,7%	3	33,3%	
Óbito	Não	18	47,4%	20	52,6%	
	Sim	13	46,4%	15	53,6%	

4.4.2 Gene *IRF2*

4.4.2.2 Expressão do gene *IRF2*

Pela análise da expressão foi observado que um maior nível de expressão do gene *IRF2* em SMD quando comparada a indivíduos saudáveis ($p=0.002$) (**Figura 4**) (**Tabela 15**). Na comparação entre os subgrupos da OMS, o gene *IRF2* foi duas vezes mais expresso em AR quando comparada ao subtipo CRDM. Quando a expressão do *IRF2* de cada subgrupo da OMS foi comparada ao grupo controle, todas as comparações foram diferentes estatisticamente. Ressaltamos que a expressão do *IRF2* foi 4.9 vezes maior em pacientes com AR quando comparada a indivíduos sadios ($p=0.0020$). Nos subtipos ARSA, CRDM e AREB, o *IRF2* foi, em média, duas vezes mais expresso do que em células do grupo controle (ARSA x controle - $p=0.0004$; CRDM x controle - $p=0.0155$; AREB x controle - $p=0.001$) (**Tabela 15, Figura 5**).

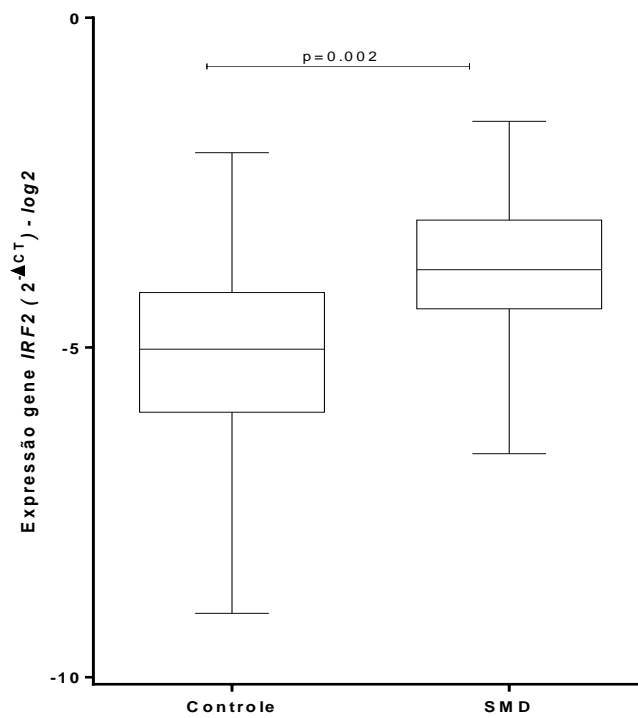
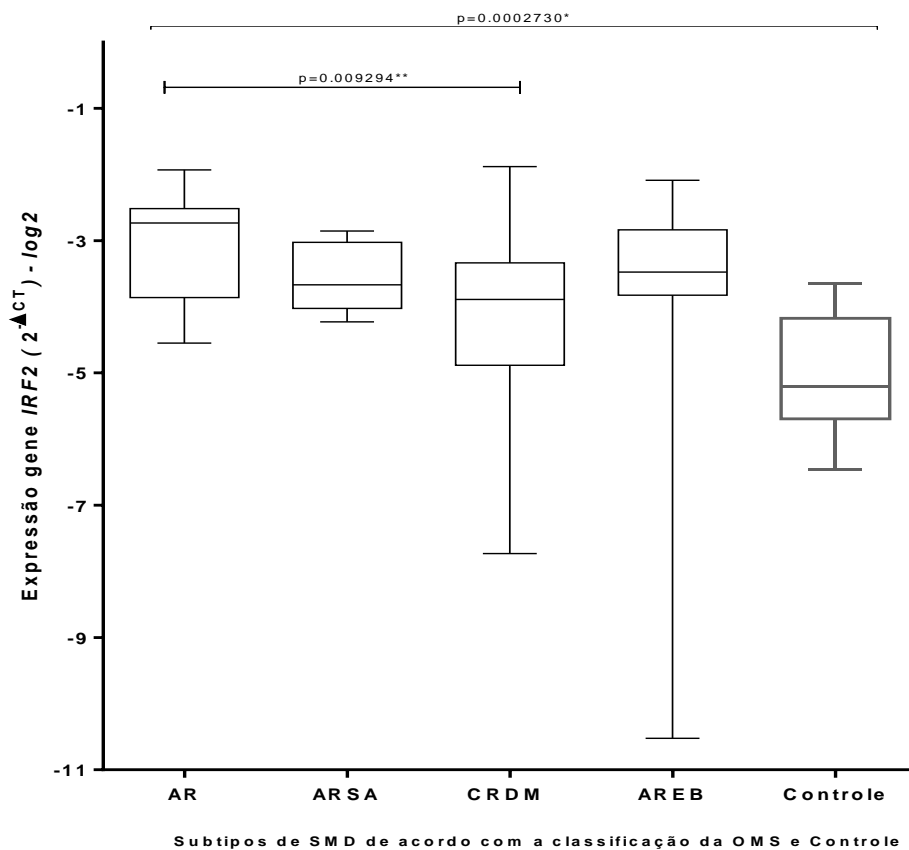


Figura 4. Perfil de expressão gênica do gene *IRF2* em células de medula total de paciente portadores de SMD. A. O gene *IRF2* apresenta maior nível de expressão gênica (2.2 vezes mais) em células de SMD do que em células de indivíduos controles.



*Considerar valor do p para o teste de Kruskal-Wallis (comparação do grupo), $p < 0,05$.

**Considerar significativo o p abaixo do valor da correção de Bonferroni ($p = 0,0166$), para os testes de Mann-Whitney U, realizado como pós teste.

Ar. Anemia refratária; ARSA. Anemia refratária com sideroblastos em anel; CRDM. Citopenia refratária com displasia em multilinhagens; AREB. Anemia refratária com excesso de blastos.

Figura 5. Perfil de expressão gênica do gene *IRF2* em células de medula total de paciente portadores de SMD de acordo com a classificação OMS. A. Um maior nível de expressão do gene *IRF2* está correlacionada com o subtipo AR em SMD. A expressão do gene *IRF2* foi diferente em AR quando comparada ao subtipo CRDM ($p = 0,0092$). A figura mostra o p valor que foi significativo entre os subtipos da OMS. Quanto a expressão do *IRF2* de cada subtipo da OMS quando comparada ao grupo controle, todos foram diferentes estatisticamente (AR x controle - $p = 0,0020$; ARSA x controle - $p = 0,0004$; CRDM x controle - $p = 0,0155$; AREB x controle - $p = 0,001$, não demonstrados na figura).

Tabela 15. Análise expressão do gene *IRF2* de acordo com as variáveis clínicas dos pacientes com SMD.

Variáveis clínicas	Classes	<i>IRF2</i>			<i>p</i> -Valor	
		N	Mediana	Mínimo		Máximo
Grupo	Controle	17	0,0307	0,0020	0,2423	0,002
	Caso	121	0,0708	0,0102	0,3368	
OMS	AR	13	0,1502	0,0427	0,2624	0,021
	ARSA	14	0,0787	0,0533	0,1382	
	CRDM	59	0,0725	0,0194	0,3368	
	AREBs	20	0,0577	0,0102	0,2457	
	LMMC	5	0,0583	0,0309	0,0643	
	RT-SMD	8	0,0364	0,0253	0,0741	
Formas SMD	Baixo Risco	87	0,0808	0,0194	0,3368	0,112
	Alto Risco	20	0,0533	0,0102	0,2457	
Cariótipo						
Cariótipo Normal X Alterado	Normal	44	0,0725	0,0253	0,2357	0,978
	Alterado	37	0,0714	0,0102	0,2624	
Aneuploidia	Normal	44	0,0725	0,0253	0,2357	0,855
	Alterado com aneuploidia	17	0,0871	0,0102	0,2624	
	Aneuploide	20	0,0680	0,0353	0,2457	
Deleção 5q	Normal	44	0,0725	0,0253	0,2357	0,696
	Alterado com 5q-	15	0,0648	0,0364	0,2382	
	Alterado sem 5q-	21	0,1069	0,0102	0,2624	
-7/7q	Normal	44	0,0725	0,0253	0,2357	0,721
	Alterado com -7/7q	9	0,0720	0,0575	0,2457	
	Alterado sem -7/7q	27	0,0765	0,0102	0,2624	
Grupos Citogenéticos IPSS	Favorável	52	0,0741	0,0253	0,2624	0,420
	Intermediário	18	0,0617	0,0102	0,1749	
	Desfavorável	10	0,0708	0,0402	0,2457	
	Muito favorável	2	0,1363	0,1363	0,1363	
Grupos Citogenéticos R-IPSS	Favorável	53	0,0741	0,0253	0,2624	0,557
	Intermediário	17	0,0652	0,0102	0,1749	
	Desfavorável	2	0,0492	0,0492	0,0492	
	Muito desfavorável	4	0,1233	0,0402	0,2457	
Características da BMO						
Celularidade BMO	Hipocelular	12	0,0720	0,0194	0,2457	0,277
	Normocelular	14	0,0866	0,0466	0,2357	
	Hiper celular	55	0,0643	0,0102	0,2382	
Diseritropoese BMO	Ausência	31	0,0638	0,0194	0,2457	0,792
	Presença	37	0,0741	0,0102	0,2382	
Dismegacariopose BMO	Ausência	45	0,0686	0,0194	0,2457	0,780
	Presença	23	0,0741	0,0102	0,2341	
Disgranulopose BMO	Ausência	18	0,0634	0,0344	0,2457	0,7250
	Presença	50	0,0733	0,0102	0,2382	
Micromegacariocito BMO	Ausência	60	0,0814	0,0102	0,3368	0,130
	Presença	22	0,0648	0,0353	0,1382	

Continuação Tabela 15. Análise expressão do gene *IRF2* de acordo com as variáveis clínicas dos pacientes com SMD.

Variáveis clínicas	Classes	N	<i>IRF2</i>			p-Valor
			Mediana	Mínimo	Máximo	
Citopenias						
HB (R-IPSS)	>= 10	32	0,0594	0,0253	0,2277	0,501
	8-<10	32	0,0705	0,0102	0,2624	
	<8	54	0,0756	0,0194	0,3368	
ANC (R-IPSS)	>=800	78	0,0771	0,0102	0,3368	0,115
	<800	40	0,0652	0,0194	0,2457	
Plaquetas (R-IPSS)	>=100	55	0,0731	0,0253	0,2624	0,385
	50-<100	32	0,0652	0,0102	0,2277	
	<50	31	0,0762	0,0266	0,3368	
Número de Citopenias (IPSS)	0	14	0,0569	0,0343	0,1749	0,405
	1	36	0,0822	0,0253	0,2624	
	2	35	0,0705	0,0266	0,3368	
	3	33	0,0708	0,0102	0,2457	
Número de Citopenias (R-IPSS)	0	17	0,0569	0,0343	0,1749	0,229
	1	45	0,0892	0,0253	0,2624	
	2	30	0,0689	0,0102	0,3368	
	3	26	0,0680	0,0194	0,2457	
Sideroblastos em anel						
Sideroblastos em anel	Ausência	79	0,0689	0,0158	0,2624	0,735
	Presença	31	0,0771	0,0102	0,3368	
Porcentagem de sideroblastos em anel	0	79	0,0689	0,0158	0,2624	0,078
	1-14%	9	0,0884	0,0451	0,3368	
	Acima de 15%	22	0,0705	0,0102	0,1523	
Blastos MO						
Porcentagem de blastos (R-IPSS)	Menor Igual a 2	86	0,0741	0,0194	0,3368	0,476
	>2% - <5%	11	0,0689	0,0402	0,2357	
	5%-10%	12	0,0451	0,0102	0,1544	
	>10%	9	0,0664	0,0390	0,2457	
Classificação de Risco						
Grupo de Risco (IPSS)	Baixo	21	0,0767	0,0475	0,2624	0,051
	Intermediário I	43	0,0771	0,0253	0,2357	
	Intermediário II	8	0,0579	0,0102	0,1233	
	Alto	4	0,0600	0,0451	0,2457	
Grupos de Risco (R-IPSS)	Muito baixo	13	0,0551	0,0417	0,1363	0,632
	Baixo	40	0,0986	0,0253	0,2624	
	Intermediário	11	0,0613	0,0309	0,0708	
	Alto	6	0,1154	0,0102	0,2357	
	Muito alto	7	0,0708	0,0402	0,2457	
Grupo de Risco (WPSS)	Muito baixo	6	0,0987	0,0527	0,2624	0,632
	Baixo	25	0,0767	0,0417	0,2176	
	Intermediário	25	0,0847	0,0253	0,2382	
	Alto	13	0,0572	0,0102	0,1233	
	Muito alto	3	0,0708	0,0451	0,2457	
Dependência transfusional, evolução e óbito						
Dependência transfusional	Não	49	0,0689	0,0253	0,2277	0,826
	Sim	61	0,0741	0,0102	0,3368	
Evolução	Não	104	0,0717	0,0102	0,3368	0,600
	Sim	14	0,0643	0,0309	0,2382	
Óbito	Não	48	0,0634	0,0253	0,1713	0,3368
	Sim	39	0,0714	0,0102	0,3368	

4.4.2.2 Metilação da região promotora do gene *IRF2*

Para o gene *IRF2* foi observado que a maioria dos pacientes com SMD não apresentam metilação do gene. Foi observado que o gene *IRF2* não metilado está associado aos subtipos da OMS, RT-SMD e LMMC ($p=0,024$) (**Tabela 16**). A grande maioria dos pacientes com AR, ARSA, CRDM, LMMC e RT-SMD (100%, 92%, 80%, 100%, 100%, respectivamente) não apresentam a metilação do gene *IRF2*. Entretanto, 47% (8/18) dos indivíduos do subtipo AREB apresentam o *IRF2* metilado (**Tabela 16**).

A partir da avaliação da metilação do *IRF2* com variáveis citogenéticas, observou-se que a metilação do gene *IRF2* foi diferente entre os grupos avaliados em relação ao cariótipo com deleção do cromossomo 5 ($p=0,045$) (**Tabela 16**). Somente 12,5% dos pacientes com deleção do cromossomo 5q apresentavam a metilação do gene *IRF2*, enquanto 37,5% dos pacientes que possuíam outros tipos de alterações estavam metilados (**Tabela 16**). Outra associação observada foi entre a metilação do *IRF2* em pacientes classificados de acordo com o cariótipo pelos critérios do IPSS ($p=0,007$) e R-IPSS ($p=0,014$). A partir dessa análise foi observado que 60% dos pacientes com cariótipo desfavorável pelo IPSS apresentaram o gene *IRF2* metilado, enquanto 8% e 28% dos pacientes com cariótipo favorável e intermediário, respectivamente tinham o *IRF2* metilado (**Tabela 16**).

A metilação do gene *IRF2* foi associada a citopenias periféricas em SMD. A frequência de pacientes com o *IRF2* metilado e com neutrófilo abaixo de $800/\mu\text{L}$ (31%) foi maior que a frequência de pacientes com neutrófilo acima de $800/\mu\text{L}$ (13%) ($p=0,042$) (**Tabela 16**). A frequência de pacientes com *IRF2* metilado e que possuíam plaquetas abaixo de $50.000/\mu\text{L}$ (39%) foi maior que a frequência de pacientes com

plaquetas acima de 100.000/ μ L (7%) ($p=0,010$) (**Tabela 16**). Quanto ao número de citopenias estabelecidos pelos critérios do IPSS e R-IPSS, o gene *IRF2* foi mais frequentemente metilado em pacientes com 3 citopenias (43% e 42%, respectivamente) ($p=0,002$ e $p=0,010$, respectivamente) (**Tabela 16**).

Outra associação importante foi observada entre a metilação do gene *IRF2* e a percentagem de blastos na medula óssea ($p=0,016$) (**Tabela 16**). Uma maior frequência de pacientes com blastos acima de 5% foram metilados (blastos 5% - <10%, 36%; blastos >10%, 50%) quando comparado a pacientes com blastos abaixo de 5% (blastos ≤ 2 , 14% e blastos <2% - <5%, 0%) (**Tabela 16**).

A metilação do *IRF2* foi associada as categorias de alto risco estabelecidas pelo IPSS, R-IPSS e WPSS ($p=0,0016$, $p=0,003$ e $p=0,007$, respectivamente). (Tabela X, p). Sendo que os grupos de alto risco, para os três critérios, tiveram uma maior frequência de pacientes com o *IRF2* metilado (67%, 100% e 66%, respectivamente) (**Tabela 16**).

Em resumo, nossos resultados apontam que o gene *IRF2* é pouco metilado em SMD. Entretanto, quando o *IRF2* está metilado é associado a características agressivas da doença, como cariótipo de prognóstico desfavorável, neutrófilo abaixo de 800/ μ L, plaquetas abaixo de 50.000/ μ L, 3 citopenias e blastos ≥ 5 . Ademais, a metilação do gene *IRF2* foi associada a grupos de alto risco em SMD (IPSS, R-IPSS e WPSS).

Tabela 16. Análise qualitativa da metilação da região promotora do gene *IRF2* de acordo com as variáveis clínicas dos pacientes com SMD.

Variáveis clínicas	Classes	<i>IRF2</i>				p-Valor
		Não Metilado		Metilado		
		N	%	N	%	
Grupo	Controle	10	90,9%	1	9,1%	0,684
	Caso	74	81,3%	17	18,7%	
OMS	AR	9	100,0%	0	0,0%	0,024
	ARSA	12	92,3%	1	7,7%	
	CRDM	33	80,5%	8	19,5%	
	AREBs	9	52,9%	8	47,1%	
	LMC	3	100,0%	0	0,0%	
	RT-SMD	8	100,0%	0	0,0%	
Formas SMD	Baixo Risco	54	84,4%	10	15,6%	0,085
	Alto Risco	10	58,8%	7	41,2%	
Cariótipo						
Cariótipo Normal X Alterado	Normal	32	91,4%	3	8,6%	0,077
	Alterado	18	72,0%	7	28,0%	
Aneuploidia	Normal	32	91,4%	3	8,6%	0,097
	Alterado com aneuploidia	6	66,7%	3	33,3%	
	Aneuploide	12	75,0%	4	25,0%	
Deleção 5q	Normal	32	91,4%	3	8,6%	0,045
	Alterado com 5q-	7	87,5%	1	12,5%	
	Alterado sem 5q-	10	62,5%	6	37,5%	
-7/7q	Normal	32	91,4%	3	8,6%	0,066
	Alterado com -7/7q	3	60,0%	2	40,0%	
	Alterado sem -7/7q	14	73,7%	5	26,3%	
Grupos Citogenéticos IPSS	Favorável	36	92,3%	3	7,7%	0,007
	Intermediário	11	73,3%	4	26,7%	
	Desfavorável	2	40,0%	3	60,0%	
	Muito favorável	1	50,0%	1	50,0%	
Grupos Citogenéticos R-IPSS	Favorável	36	92,3%	3	7,7%	0,014
	Intermediário	10	76,9%	3	23,1%	
	Desfavorável	0	0,0%	1	100,0%	
	Muito desfavorável	1	50,0%	1	50,0%	
Características da BMO						
Celularidade BMO	Hipocelular	5	71,4%	2	28,6%	0,541
	Normocelular	8	88,9%	1	11,1%	
	Hipercelular	39	86,7%	6	13,3%	
Diseritropose BMO	Ausência	19	86,4%	3	13,6%	0,718
	Presença	26	89,7%	3	10,3%	
Dismegacariopose BMO	Ausência	26	83,9%	5	16,1%	0,228
	Presença	19	95,0%	1	5,0%	
Disgranulopose BMO	Ausência	13	86,7%	2	13,3%	0,822
	Presença	32	88,9%	4	11,1%	
Micromegacariocito BMO	Ausência	37	84,1%	7	15,9%	0,330
	Presença	15	93,8%	1	6,3%	

Continuação Tabela 16. Análise qualitativa da metilação da região promotora do gene *IRF2* de acordo com as variáveis clínicas dos pacientes com SMD.

Variáveis clínicas	Classes	<i>IRF2</i>				p-Valor
		Não Metilado		Metilado		
		N	%	N	%	
Citopenias						
HB (R-IPSS)	≥ 10	21	80,8%	5	19,2%	0,999
	8-<10	20	80,0%	5	20,0%	
	<8	32	82,1%	7	17,9%	
ANC (R-IPSS)	≥800	53	86,9%	8	13,1%	0,042
	<800	20	69,0%	9	31,0%	
Plaquetas (R-IPSS)	≥100	38	92,7%	3	7,3%	0,010
	50-<100	21	80,8%	5	19,2%	
	<50	14	60,9%	9	39,1%	
Número de Citopenias (IPSS)	0	11	91,7%	1	8,3%	0,002
	1	27	96,4%	1	3,6%	
	2	22	81,5%	5	18,5%	
	3	13	56,5%	10	43,5%	
Número de Citopenias (R-IPSS)	0	12	85,7%	2	14,3%	0,010
	1	33	94,3%	2	5,7%	
	2	17	77,3%	5	22,7%	
	3	11	57,9%	8	42,1%	
Sideroblastos em anel						
Sideroblastos em anel	Ausência	46	82,1%	10	17,9%	0,782
	Presença	22	84,6%	4	15,4%	
Porcentagem de sideroblastos em anel	0	46	82,1%	10	17,9%	0,958
	1-14%	5	83,3%	1	16,7%	
	Acima de 15%	17	85,0%	3	15,0%	
Blastos MO						
Porcentagem de blastos (R-IPSS)	Menor Igual a 2	53	85,5%	9	14,5%	0,016
	>2% - <5%	9	100,0%	0	0,0%	
	5%-10%	7	63,6%	4	36,4%	
	>10%	4	50,0%	4	50,0%	
Classificação de Risco						
Grupo de Risco (IPSS)	Baixo	16	100,0%	0	0,0%	0,016
	Intermediário I	25	83,3%	5	16,7%	
	Intermediário II	4	66,7%	2	33,3%	
	Alto	1	33,3%	2	66,7%	
Grupos de Risco (R-IPSS)	Muito baixo	9	90,0%	1	10,0%	0,003
	Baixo	29	93,5%	2	6,5%	
	Intermediário	5	71,4%	2	28,6%	
	Alto	0	0,0%	3	100,0%	
Grupo de Risco (WPSS)	Muito alto	4	80,0%	1	20,0%	0,007
	Muito baixo	3	100,0%	0	0,0%	
	Baixo	22	95,7%	1	4,3%	
	Intermediário	16	84,2%	3	15,8%	
	Alto	2	33,3%	4	66,7%	
Óbito	Muito alto	1	50,0%	1	50,0%	
Dependência transfusional, evolução e óbito						
Dependência transfusional	Não	34	85,0%	6	15,0%	0,395
	Sim	35	77,8%	10	22,2%	
Evolução	Não	68	82,9%	14	17,1%	0,600
	Sim	6	66,7%	3	33,3%	
Óbito	Não	33	86,8%	5	13,2%	
	Sim	20	71,4%	8	28,6%	

4.4.3 Gene *IRF3*

4.4.3.1 Expressão do gene *IRF3*

Na análise da expressão do gene *IRF3* foi observado que um maior nível de expressão estava associado a pacientes com SMD quando comparados a indivíduos saudáveis ($p=0,002$) (**Tabela 17**).

Um maior nível de expressão do gene *IRF3* foi também associada a citopenias periféricas características de pacientes com SMD. O gene *IRF3* foi mais expresso em pacientes com níveis de hemoglobina abaixo de 10g/dL ($p=0,034$) e mais expresso em pacientes com o número de neutrófilos abaixo de 800/ μ L ($p=0,036$) (Tabela 17). Pacientes com 2/3 citopenias possuíam maior nível de expressão do gene *IRF3*, pelo critério do IPSS ($p=0,019$) e pelo R-IPSS, que utiliza critérios mais rígidos para classificar as citopenias, a maior expressão do gene *IRF3* foi associada a pacientes com 3 citopenias ($p=0,028$) (Tabela 17).

Em resumo, a partir dos nossos resultados, observamos que um maior nível da expressão do gene *IRF3* está associada a pacientes com SMD. Essa associação pode estar relacionada a valores menores de hemoglobina e neutrófilos e presença de 3 citopenias.

Tabela 17. Análise expressão do gene *IRF3* de acordo com as variáveis clínicas dos pacientes com SMD.

Variáveis clínicas	Classes	<i>IRF3</i>				p-Valor
		N	Mediana	Mínimo	Máximo	
Grupo	Controle	11	0,0277	0,0000	0,0797	0,002
	Caso	89	0,0677	0,0007	0,2717	
OMS	AR	11	0,0708	0,0224	0,1941	0,068
	ARSA	12	0,0506	0,0273	0,2066	
	CRDM	38	0,0672	0,0047	0,2717	
	AREBs	16	0,0898	0,0007	0,2349	
	LMMC	3	0,0404	0,0341	0,1088	
	RT-SMD	7	0,0434	0,0118	0,1134	
Formas SMD	Baixo Risco	61	0,0670	0,0047	0,2717	0,068
	Alto Risco	17	0,0887	0,0007	0,2349	
Cariótipo						
Cariótipo Normal X Alterado	Normal	31	0,0571	0,0193	0,2080	0,563
	Alterado	22	0,0714	0,0007	0,2222	
Aneuploidia	Normal	31	0,0571	0,0193	0,2080	0,528
	Alterado com aneuploidia	8	0,0570	0,0007	0,1103	
	Aneuploide	14	0,0714	0,0201	0,2222	
Deleção 5q	Normal	31	0,0571	0,0193	0,2080	0,389
	Alterado com 5q-	8	0,0510	0,0138	0,0967	
	Alterado sem 5q-	13	0,0828	0,0007	0,2222	
-7/7q	Normal	31	0,0571	0,0193	0,2080	0,794
	Alterado com -7/7q	5	0,0828	0,0138	0,2222	
	Alterado sem -7/7q	16	0,0714	0,0007	0,1103	
Grupos Citogenéticos IPSS	Favorável	36	0,0578	0,0138	0,2080	0,495
	Intermediário	12	0,0648	0,0007	0,1103	
	Desfavorável	5	0,0828	0,0363	0,2222	
Grupos Citogenéticos R-IPSS	Muito favorável	1	0,0715	0,0715	0,0715	0,939
	Favorável	36	0,0556	0,0138	0,2080	
	Intermediário	9	0,0825	0,0007	0,1103	
	Desfavorável	1	0,0645	0,0645	0,0645	
	Muito desfavorável	3	0,0902	0,0363	0,2222	
Características da BMO						
Celularidade BMO	Hipocelular	8	0,0335	0,0087	0,2222	0,229
	Normocelular	8	0,1064	0,0201	0,2080	
	Hipercelular	45	0,0632	0,0007	0,2717	
Diseritropoese BMO	Ausência	25	0,0670	0,0087	0,2717	0,355
	Presença	27	0,0482	0,0007	0,1451	
Dismegacariopese BMO	Ausência	35	0,0571	0,0087	0,2717	0,838
	Presença	17	0,0583	0,0007	0,2066	
Disgranulopese BMO	Ausência	15	0,0559	0,0116	0,2222	0,664
	Presença	37	0,0632	0,0007	0,2717	
Micromegacariocito BMO	Ausência	48	0,0657	0,0007	0,2717	0,824
	Presença	13	0,0583	0,0087	0,2066	

Continuação Tabela 17. Análise expressão do gene *IRF3* de acordo com as variáveis clínicas dos pacientes com SMD.

Variáveis clínicas	Classes	N	IRF3			p-Valor
			Mediana	Mínimo	Máximo	
Citopenias						
HB (R-IPSS)	≥ 10	18	0,0436	0,0047	0,1062	0,034
	8-<10	28	0,0794	0,0007	0,2222	
	<8	40	0,0751	0,0087	0,2717	
ANC (R-IPSS)	≥800	56	0,0578	0,0007	0,2717	0,036
	<800	30	0,0899	0,0087	0,2222	
Plaquetas (R-IPSS)	≥100	41	0,0559	0,0047	0,2066	0,115
	50-<100	23	0,0797	0,0007	0,2717	
	<50	22	0,0847	0,0093	0,2349	
Número de Citopenias (IPSS)	0	10	0,0447	0,0047	0,1062	0,019
	1	26	0,0530	0,0118	0,2066	
	2	25	0,0866	0,0087	0,2349	
	3	25	0,0896	0,0007	0,2717	
Número de Citopenias (R-IPSS)	0	10	0,0447	0,0047	0,1062	0,028
	1	34	0,0578	0,0093	0,2066	
	2	22	0,0661	0,0007	0,2717	
	3	20	0,0906	0,0116	0,2222	
Sideroblastos em anel						
Sideroblastos em anel	Ausência	56	0,0695	0,0047	0,2349	0,776
	Presença	26	0,0634	0,0007	0,2222	
Porcentagem de sideroblastos em anel	0	56	0,0695	0,0047	0,2349	0,088
	1-14%	6	0,1083	0,0201	0,2222	
	Acima de 15%	20	0,0467	0,0007	0,2066	
Blastos MO						
Porcentagem de blastos (R-IPSS)	Menor Igual a 2	59	0,0670	0,0047	0,2717	0,074
	>2% - <5%	10	0,0383	0,0087	0,2080	
	5%-10%	9	0,0677	0,0007	0,1743	
	>10%	8	0,0898	0,0632	0,2349	
Classificação de Risco						
Grupo de Risco (IPSS)	Baixo	15	0,0459	0,0138	0,1103	
	Intermediário I	26	0,0785	0,0193	0,2080	
	Intermediário II	4	0,0633	0,0007	0,0909	
	Alto	4	0,0826	0,0645	0,2222	
Grupos de Risco (R-IPSS)	Muito baixo	6	0,0447	0,0138	0,0715	0,197
	Baixo	26	0,0689	0,0193	0,1436	
	Intermediário	8	0,0584	0,0341	0,1088	
	Alto	5	0,0902	0,0007	0,2080	
Grupo de Risco (WPSS)	Muito alto	5	0,0828	0,0363	0,2222	0,274
	Muito baixo	4	0,0742	0,0224	0,1103	
	Baixo	17	0,0540	0,0138	0,1431	
	Intermediário	16	0,0833	0,0201	0,2080	
	Alto	6	0,0771	0,0007	0,1743	
	Muito alto	3	0,0828	0,0825	0,2222	
Dependência transfusional, evolução e óbito						
Dependência transfusional	Não	33	0,0559	0,0047	0,2717	0,590
	Sim	48	0,0692	0,0007	0,2349	
Evolução	Não	75	0,0670	0,0007	0,2717	0,473
	Sim	11	0,0875	0,0289	0,1451	
Óbito	Não	34	0,0615	0,0087	0,2066	
	Sim	28	0,0788	0,0007	0,2349	

4.4.3.2 Metilação da região promotora do gene *IRF3*

No presente trabalho, a metilação do gene *IRF3* foi associada a pacientes com SMD ($p=0,002$) e foi diferente entre os subtipos da OMS ($p<0.001$) (**Tabela 18**). É importante destacar que 8/8 (100%) dos pacientes com RT-SMD e 15/17 (88%) dos pacientes com AREB tiveram o gene *IRF3* metilado (**Tabela 18**). A metilação do gene *IRF3* foi associada a formas mais avançadas da doença (88%), enquanto somente 29,7% dos pacientes com formas iniciais da doença (AR, ARSA e CRDM) apresentavam metilação do *IRF3* ($p<0,001$).

A metilação do gene *IRF3* está associada a pacientes com micromegacariócitos (75% desses pacientes possuem metilação do *IRF3*) ($p=0,008$) e pacientes com a presença de disgranulopose na medula óssea (58,3% dos pacientes com digranulopose apresentavam metilação o *IRF3*) ($p=0,039$) (**Tabela 18**).

Ademais, a metilação do gene *IRF3* foi associada a pacientes com percentagem de blastos $\geq 5\%$ ($p=0,003$) (**Tabela 18**). Oitenta e dois por cento (9/11) dos pacientes com blastos entre 5-<10% e 87,5% (7/8) dos pacientes com blastos $\geq 10\%$ apresentaram a metilação do gene *IRF3*.

Em resumo, a metilação o gene *IRF3* está associada a SMD e é predominantemente metilado em pacientes com formas mais agressivas da doença, como o subtipo AREB e RT-SMD. Assim como também, a metilação do gene *IRF3* está associada a presença disgranulopose, micromegacariócitos e presença de blastos na medula óssea.

Tabela 18. Análise qualitativa da metilação da região promotora do gene *IRF3* de acordo com as variáveis clínicas dos pacientes com SMD.

Variáveis clínicas	Classes	<i>IRF3</i>				<i>p</i> -Valor
		Não Metilado		Metilado		
		N	%	N	%	
Grupo	Controle	11	100,0%	0	0,0%	0,002
	Caso	47	51,6%	44	48,4%	
OMS	AR	8	88,9%	1	11,1%	<0,001
	ARSA	8	61,5%	5	38,5%	
	CRDM	28	68,3%	13	31,7%	
	AREBs	2	11,8%	15	88,2%	
	LMMC	1	33,3%	2	66,7%	
	RT-SMD	0	0,0%	8	100,0%	
Formas SMD	Baixo Risco	45	70,3%	19	29,7%	<0,001
	Alto Risco	2	11,8%	15	88,2%	
Cariótipo						
Cariótipo Normal X Alterado	Normal	19	54,3%	16	45,7%	0,999
	Alterado	14	56,0%	11	44,0%	
Aneuploidia	Normal	19	54,3%	16	45,7%	0,295
	Alterado com aneuploidia	7	77,8%	2	22,2%	
	Aneuploide	7	43,8%	9	56,3%	
Deleção 5q	Normal	19	54,3%	16	45,7%	0,999
	Alterado com 5q-	5	62,5%	3	37,5%	
	Alterado sem 5q-	9	56,3%	7	43,8%	
-7/7q	Normal	19	54,3%	16	45,7%	0,103
	Alterado com -7/7q	5	100,0%	0	0,0%	
	Alterado sem -7/7q	9	47,4%	10	52,6%	
Grupos Citogenéticos IPSS	Favorável	22	56,4%	17	43,6%	0,999
	Intermediário	8	53,3%	7	46,7%	
	Desfavorável	3	60,0%	2	40,0%	
Grupos Citogenéticos R-IPSS	Muito favorável	1	50,0%	1	50,0%	0,906
	Favorável	23	59,0%	16	41,0%	
	Intermediário	7	53,8%	6	46,2%	
	Desfavorável	0	0,0%	1	100,0%	
	Muito desfavorável	1	50,0%	1	50,0%	
Características da BMO						
Celularidade BMO	Hipocelular	5	71,4%	2	28,6%	0,583
	Normocelular	4	44,4%	5	55,6%	
	Hipercelular	25	55,6%	20	44,4%	
Diseritropoese BMO	Ausência	10	45,5%	12	54,5%	0,492
	Presença	16	55,2%	13	44,8%	
Dismegacariopese BMO	Ausência	17	54,8%	14	45,2%	0,493
	Presença	9	45,0%	11	55,0%	
Disgranulopese BMO	Ausência	11	73,3%	4	26,7%	0,039
	Presença	15	41,7%	21	58,3%	
Micromegacariocito BMO	Ausência	28	63,6%	16	36,4%	0,008
	Presença	4	25,0%	12	75,0%	

Continuação Tabela 18. Análise qualitativa da metilação da região promotora do gene *IRF3* de acordo com as variáveis clínicas dos pacientes com SMD.

Variáveis clínicas	Classes	<i>IRF3</i>				p-Valor
		Não Metilado		Metilado		
		N	%	N	%	
Citopenias						
HB (R-IPSS)	≥ 10	16	61,5%	10	38,5%	0,352
	8-<10	14	56,0%	11	44,0%	
	<8	17	43,6%	22	56,4%	
ANC (R-IPSS)	≥800	34	55,7%	27	44,3%	0,273
	<800	13	44,8%	16	55,2%	
Plaquetas (R-IPSS)	≥100	26	63,4%	15	36,6%	0,133
	50-<100	12	46,2%	14	53,8%	
	<50	9	39,1%	14	60,9%	
Número de Citopenias (IPSS)	0	7	58,3%	5	41,7%	0,294
	1	16	57,1%	12	42,9%	
	2	16	59,3%	11	40,7%	
	3	8	34,8%	15	65,2%	
Número de Citopenias (R-IPSS)	0	9	64,3%	5	35,7%	0,285
	1	21	60,0%	14	40,0%	
	2	10	45,5%	12	54,5%	
	3	7	36,8%	12	63,2%	
Sideroblastos em anel						
Sideroblastos em anel	Ausência	26	46,4%	30	53,6%	0,342
	Presença	15	57,7%	11	42,3%	
Porcentagem de sideroblastos em anel	0	26	46,4%	30	53,6%	0,562
	1-14%	4	66,7%	2	33,3%	
	Acima de 15%	11	55,0%	9	45,0%	
Blastos MO						
Porcentagem de blastos (R-IPSS)	Menor Igual a 2	38	61,3%	24	38,7%	0,003
	>2% - <5%	6	66,7%	3	33,3%	
	5%-10%	2	18,2%	9	81,8%	
	>10%	1	12,5%	7	87,5%	
Classificação de Risco						
Grupo de Risco (IPSS)	Baixo	10	62,5%	6	37,5%	0,426
	Intermediário I	19	63,3%	11	36,7%	
	Intermediário II	2	33,3%	4	66,7%	
	Alto	1	33,3%	2	66,7%	
Grupos de Risco (R-IPSS)	Muito baixo	6	60,0%	4	40,0%	0,221
	Baixo	21	67,7%	10	32,3%	
	Intermediário	3	42,9%	4	57,1%	
	Alto	1	33,3%	2	66,7%	
Grupo de Risco (WPSS)	Muito alto	1	20,0%	4	80,0%	0,276
	Muito baixo	3	100,0%	0	0,0%	
	Baixo	16	69,6%	7	30,4%	
	Intermediário	10	52,6%	9	47,4%	
	Alto	2	33,3%	4	66,7%	
Muito alto		1	50,0%	1	50,0%	
Dependência transfusional, evolução e óbito						
Dependência transfusional	Não	24	60,0%	16	40,0%	0,305
	Sim	22	48,9%	23	51,1%	
Evolução	Não	43	52,4%	39	47,6%	0,734
	Sim	4	44,4%	5	55,6%	
Óbito	Não	20	52,6%	18	47,4%	
	Sim	12	42,9%	16	57,1%	

4.4.4 Gene *IRF4*

4.4.4.1 Expressão do gene *IRF4*

A partir dos dados de expressão do gene *IRF4* foi observado uma associação entre o aumento de expressão do *IRF4* em pacientes com neutrófilos abaixo de 800/ μ L ($p < 0,001$) (**Tabela 19**). Outra associação observada, foi a baixa expressão do gene *IRF4* em pacientes com sideroblastos em anel ($p = 0,039$) (**Figura 6**) (**Tabela 19**).

4.4.4.2 Metilação da região promotora do gene *IRF4*

A análise de metilação do gene *IRF4* não foi realizada pois não conseguimos a padronização da temperatura adequada para evitar a formação de ligações inespecíficas durante a QMSP.

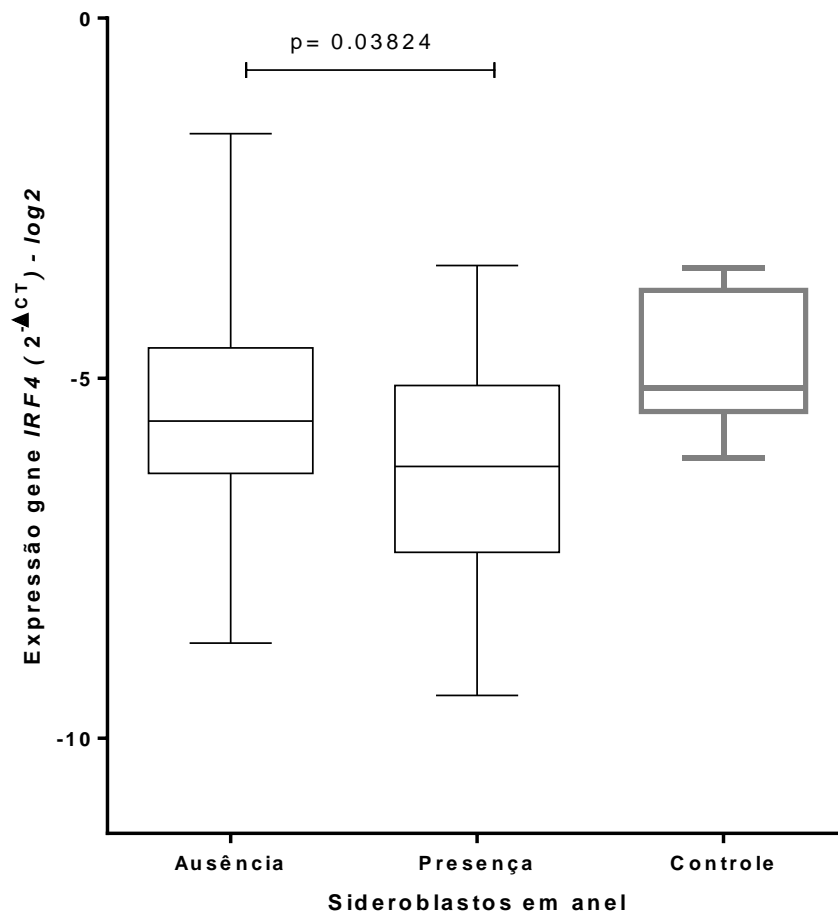


Figura 6. Expressão do gene *IRF4* em pacientes de acordo com a presença e ausência de sideroblastos em anel. Um menor nível de expressão do gene *IRF4* foi associado a pacientes com a presença de sideroblastos em anel. A expressão do grupo controle (indivíduos saudáveis) foi adicionada como referência.

Tabela 19. Análise expressão do gene *IRF4* de acordo com as variáveis clínicas dos pacientes com SMD.

Variáveis clínicas	Classes	<i>IRF4</i>				p-Valor
		N	Mediana	Mínimo	Máximo	
Grupo	Controle	11	0,02592	0,00068	0,09056	0,189
	Caso	88	0,01918	0,00148	0,32874	
OMS	AR	11	0,02083	0,00474	0,11227	0,794
	ARSA	12	0,01840	0,00148	0,03781	
	CRDM	37	0,02360	0,00244	0,16437	
	AREBs	16	0,02030	0,00342	0,32874	
	LMMC	3	0,00849	0,00592	0,01530	
	RT-SMD	7	0,01418	0,00537	0,07056	
Cariótipo						
Cariótipo Normal X Alterado	Normal	31	0,01618	0,00148	0,09910	0,794
	Alterado	22	0,01541	0,00244	0,09310	
Aneuploidia	Normal	31	0,01618	0,00148	0,09910	0,764
	Alterado com aneuploida	8	0,01477	0,00384	0,07229	
	Aneuploide	14	0,01541	0,00244	0,09310	
Deleção 5q	Normal	31	0,01618	0,00148	0,09910	0,757
	Alterado com 5q-	8	0,01422	0,00830	0,07229	
	Alterado sem 5q-	13	0,01782	0,00244	0,09310	
-7/7q	Normal	31	0,01618	0,00148	0,09910	0,924
	Alterado com -7/7q	5	0,02856	0,00830	0,05201	
	Alterado sem -7/7q	16	0,01541	0,00244	0,09310	
Grupos Citogenéticos IPSS	Favorável	36	0,01905	0,00148	0,09910	0,649
	Intermediário	12	0,01278	0,00244	0,09310	
	Desfavorável	5	0,01826	0,01067	0,05201	
Grupos Citogenéticos R-IPSS	Muito favorável	1	0,02711	0,02711	0,02711	0,793
	Favorável	36	0,01585	0,00148	0,09910	
	Intermediário	9	0,01530	0,00244	0,09310	
	Desfavorável	1	0,01826	0,01826	0,01826	
	Muito desfavorável	3	0,01408	0,01067	0,02856	
Características da BMO						
Celularidade BMO	Hipocelular	7	0,02856	0,00830	0,11227	0,326
	Normocelular	8	0,02002	0,00474	0,32874	
	Hipercelular	45	0,01728	0,00148	0,09310	
Diseritropoese BMO	Ausência	24	0,02126	0,00148	0,09910	0,910
	Presença	27	0,01530	0,00236	0,32874	
Dismegacariopose BMO	Ausência	34	0,01541	0,00148	0,09910	0,603
	Presença	17	0,01552	0,00384	0,32874	
Disgranulopose BMO	Ausência	15	0,01552	0,00484	0,04181	0,756
	Presença	36	0,01512	0,00148	0,32874	
Micromegacariocito BMO	Ausência	48	0,01814	0,00236	0,32874	0,698
	Presença	12	0,01307	0,00148	0,07056	

Continuação Tabela 19. Análise expressão do gene *IRF4* de acordo com as variáveis clínicas dos pacientes com SMD.

Variáveis clínicas	Classes	N	IRF4			p-Valor
			Mediana	Mínimo	Máximo	
Citopenias						
HB (R-IPSS)	≥ 10	18	0,01585	0,00342	0,05329	0,378
	8-<10	28	0,01573	0,00236	0,11227	
	<8	39	0,02083	0,00148	0,32874	
ANC (R-IPSS)	≥800	56	0,01504	0,00148	0,11227	<0,001
	<800	29	0,03615	0,00662	0,32874	
Plaquetas (R-IPSS)	≥100	40	0,02109	0,00148	0,16437	0,926
	50-<100	23	0,01618	0,00342	0,11227	
	<50	22	0,01823	0,00829	0,32874	
Número de Citopenias (IPSS)	0	10	0,01664	0,00537	0,16437	0,418
	1	26	0,01817	0,00148	0,11227	
	2	24	0,01577	0,00342	0,08747	
	3	25	0,02443	0,00384	0,32874	
Número de Citopenias (R-IPSS)	0	10	0,01664	0,00537	0,16437	0,110
	1	34	0,01544	0,00148	0,07229	
	2	21	0,01618	0,00384	0,11227	
	3	20	0,02901	0,00662	0,32874	
Sideroblastos em anel						
Sideroblastos em anel	Ausência	55	0,02069	0,00244	0,32874	0,039
	Presença	26	0,01336	0,00148	0,09246	
Porcentagem de sideroblastos em anel	0	55	0,02069	0,00244	0,32874	0,078
	1-14%	6	0,02204	0,00923	0,09246	
	Acima de 15%	20	0,00955	0,00148	0,07056	
Blastos MO						
Porcentagem de blastos (R-IPSS)	Menor Igual a 2	59	0,01782	0,00148	0,16437	0,985
	>2% - <5%	9	0,01546	0,00474	0,09910	
	5%-10%	9	0,02069	0,00384	0,04181	
	>10%	8	0,01918	0,00342	0,32874	
Classificação de Risco						
Grupos de Risco (R-IPSS)	Muito baixo	6	0,01888	0,00484	0,05059	0,983
	Baixo	26	0,01673	0,00148	0,07229	
	Intermediário	8	0,01190	0,00474	0,09310	
	Alto	5	0,01826	0,00384	0,09910	
	Muito alto	5	0,01265	0,00680	0,05201	
Grupo de Risco (WPSS)	Muito baixo	4	0,01922	0,01176	0,03082	0,748
	Baixo	17	0,01782	0,00148	0,05059	
	Intermediário	16	0,02044	0,00244	0,09910	
	Alto	6	0,01617	0,00384	0,09310	
	Muito alto	3	0,02856	0,01265	0,05201	
Dependência transfusional, evolução e óbito						
Dependência transfusional	Não	33	0,01728	0,00244	0,11227	0,707
	Sim	47	0,01845	0,00148	0,16437	
Evolução	Não	74	0,01836	0,00148	0,16437	0,969
	Sim	11	0,01728	0,00592	0,32874	

4.4.4 Gene *IRF5*

4.4.5.1 Expressão do gene *IRF5*

Na análise de expressão foi observado que, um maior nível de expressão do gene *IRF5* está relacionado a pacientes com dismegacariopoese na medula óssea ($p=0,031$) (**Tabela 20**). Outra associação importante foi que o aumento de expressão do gene *IRF5* está associada a pacientes que evoluíram para LMA ($p=0,020$) (**Tabela 20**).

Tabela 20. Análise expressão do gene *IRF5* de acordo com as variáveis clínicas dos pacientes com SMD.

Variáveis clínicas	Classes	<i>IRF5</i>				p-Valor
		N	Median	Mínimo	Máximo	
Grupo	Controle	11	0,01904	0,01020	0,15822	0,943
	Caso	89	0,02336	0,00379	0,15443	
OMS	AR	11	0,02426	0,00460	0,07155	0,263
	ARSA	12	0,02161	0,00523	0,05975	
	CRDM	38	0,01961	0,00379	0,15443	
	AREBs	16	0,03141	0,01148	0,10259	
	LMMC	3	0,08190	0,01978	0,08900	
	RT-SMD	7	0,02443	0,00795	0,07229	
Cariótipo						
Cariótipo Normal X Alterado	Normal	31	0,02142	0,00458	0,15443	0,149
	Alterado	22	0,01974	0,00417	0,07562	
Aneuploidia	Normal	31	0,02142	0,00458	0,15443	0,352
	Alterado com aneuploidia	8	0,03327	0,00417	0,07562	
	Aneuploide	14	0,01712	0,00613	0,04803	
Deleção 5q	Normal	31	0,02142	0,00458	0,15443	0,039
	Alterado com 5q-	8	0,01341	0,00613	0,07562	
	Alterado sem 5q-	13	0,01978	0,00417	0,04803	
-7/7q	Normal	31	0,02142	0,00458	0,15443	0,194
	Alterado com -7/7q	5	0,03269	0,01305	0,04803	
	Alterado sem -7/7q	16	0,01341	0,00417	0,07562	
Grupos Citogenéticos IPSS	Favorável	36	0,02617	0,00458	0,15443	0,398
	Intermediário	12	0,01341	0,00417	0,04404	
	Desfavorável	5	0,01305	0,01148	0,04803	
Grupos Citogenéticos R-IPSS	Muito favorável	1	0,04269	0,04269	0,04269	0,080
	Favorável	36	0,02161	0,00458	0,15443	
	Intermediário	9	0,01978	0,00768	0,04404	
	Desfavorável	1	0,01148	0,01148	0,01148	
	Muito desfavorável	3	0,01305	0,01180	0,04803	
Características da BMO						
Celularidade BMO	Hipocelular	8	0,03512	0,00411	0,04803	0,146
	Normocelular	8	0,01500	0,00460	0,15443	
	Hipercelular	45	0,01978	0,00379	0,08900	
Diseritropoese BMO	Ausência	25	0,02352	0,00411	0,15443	0,993
	Presença	27	0,02142	0,00379	0,08900	
Dismegacariopese BMO	Ausência	35	0,01957	0,00379	0,15443	0,031
	Presença	17	0,02816	0,00613	0,08900	
Disgranulopese BMO	Ausência	15	0,01978	0,00379	0,04803	0,193
	Presença	37	0,02477	0,00411	0,15443	
Micromegacariocito BMO	Ausência	48	0,02461	0,00379	0,15443	0,509
	Presença	13	0,02098	0,01017	0,05975	

Continuação Tabela 20. Análise expressão do gene *IRF5* de acordo com as variáveis clínicas dos pacientes com SMD.

Variáveis clínicas	Classes	N	<i>IRF5</i>			<i>p</i> -Valor
			Mediana	Mínimo	Máximo	
Citopenias						
HB (R-IPSS)	>= 10	18	0,01894	0,00613	0,05536	0,379
	8-<10	28	0,02161	0,00379	0,08900	
	<8	40	0,02566	0,00411	0,15443	
ANC (R-IPSS)	>=800	56	0,02161	0,00417	0,08900	0,319
	<800	30	0,02587	0,00379	0,15443	
Plaquetas (R-IPSS)	>=100	41	0,02426	0,00458	0,10259	0,903
	50-<100	23	0,02098	0,00379	0,08900	
	<50	22	0,02423	0,00417	0,15443	
Número de Citopenias (IPSS)	0	10	0,01459	0,00607	0,03691	0,309
	1	26	0,02161	0,00460	0,07562	
	2	25	0,02495	0,00417	0,10259	
	3	25	0,02352	0,00379	0,15443	
Número de Citopenias (R-IPSS)	0	10	0,01459	0,00607	0,03691	0,077
	1	34	0,02060	0,00417	0,07562	
	2	22	0,03113	0,01136	0,10259	
	3	20	0,02225	0,00379	0,15443	
Sideroblastos em anel						
Sideroblastos em anel	Ausência	56	0,02328	0,00379	0,15443	0,877
	Presença	26	0,02303	0,00417	0,08900	
Porcentagem de sideroblastos em anel	0	56	0,02328	0,00379	0,15443	0,929
	1-14%	6	0,02725	0,00613	0,05112	
	Acima de 15%	20	0,02303	0,00417	0,08900	
Blastos MO						
Porcentagem de blastos (R-IPSS)	Menor Igual a 2	59	0,02179	0,00379	0,10259	0,290
	>2% - <5%	10	0,02623	0,00460	0,15443	
	5%-10%	9	0,01937	0,01148	0,04404	
	>10%	8	0,04403	0,02352	0,04803	
Classificação de Risco						
Grupos de Risco (R-IPSS)	Muito baixo	6	0,02613	0,00776	0,04269	0,822
	Baixo	26	0,02053	0,00458	0,07562	
	Intermediário	8	0,01974	0,00460	0,08900	
	Alto	5	0,03147	0,01148	0,15443	
	Muito alto	5	0,02730	0,01180	0,04803	
Grupo de Risco (WPSS)	Muito baixo	4	0,02493	0,00776	0,03420	0,923
	Baixo	17	0,01964	0,00460	0,07155	
	Intermediário	16	0,02128	0,00458	0,15443	
	Alto	6	0,01638	0,01148	0,04404	
	Muito alto	3	0,02730	0,01453	0,04803	
Dependência transfusional, evolução e óbito						
Dependência transfusional	Não	33	0,02426	0,00458	0,08900	0,461
	Sim	48	0,02328	0,00379	0,15443	
Evolução	Não	75	0,01998	0,00379	0,15443	0,020
	Sim	11	0,03384	0,00458	0,08900	

4.4.5.2 Metilação da região promotora do gene *IRF5*

A partir da análise qualitativa da metilação foi observado uma associação da metilação da região promotora do gene *IRF5* com pacientes com SMD ($p=0,002$) (**Tabela 21**). O gene *IRF5* foi metilado em 47% (43/91) dos pacientes com SMD, enquanto 100% dos indivíduos saudáveis analisados apresentaram o *IRF5* não metilado (**Tabela 21**).

Na análise das variáveis clínicas foi observado uma associação da metilação do *IRF5* com as citopenias, 66% dos indivíduos com neutrófilo abaixo de 800 apresentaram o gene *IRF5* metilado, enquanto 61% dos indivíduos com $ANC \leq 800$ eram não metilados para o *IRF5* ($p=0,025$) (**Tabela 21**). Quando realizamos uma análise quantitativa (comparação de medianas) da metilação do gene *IRF5*, foi observado também uma associação de níveis mais altos de metilação do gene *IRF5* em pacientes com plaquetas abaixo de $50.000/\mu\text{L}$.

Tabela 21. Análise qualitativa da metilação da região promotora do gene *IRF5* de acordo com as variáveis clínicas dos pacientes com SMD.

Variáveis clínicas	Classes	<i>IRF5</i>				<i>p</i> -Valor
		Não Metilado		Metilado		
		N	%	N	%	
Grupo	Controle	11	100,0%	0	0,0%	0,002
	Caso	48	52,7%	43	47,3%	
OMS	AR	7	77,8%	2	22,2%	0,336
	ARSA	8	61,5%	5	38,5%	
	CRDM	17	41,5%	24	58,5%	
	AREBs	10	58,8%	7	41,2%	
	LMMC	1	33,3%	2	66,7%	
	RT-SMD	5	62,5%	3	37,5%	
Cariótipo						
Cariótipo Normal X	Normal	19	54,3%	16	45,7%	0,794
	Alterado	12	48,0%	13	52,0%	
Aneuploidia	Normal	19	54,3%	16	45,7%	0,764
	Alterado com aneuploida	5	55,6%	4	44,4%	
	Aneuploide	7	43,8%	9	56,3%	
Deleção 5q	Normal	19	54,3%	16	45,7%	0,757
	Alterado com 5q-	3	37,5%	5	62,5%	
	Alterado sem 5q-	9	56,3%	7	43,8%	
-7/7q	Normal	19	54,3%	16	45,7%	0,924
	Alterado com -7/7q	2	40,0%	3	60,0%	
	Alterado sem -7/7q	10	52,6%	9	47,4%	
Grupos Citogenéticos IPSS	Favorável	21	53,8%	18	46,2%	0,649
	Intermediário	6	40,0%	9	60,0%	
	Desfavorável	3	60,0%	2	40,0%	
Grupos Citogenéticos R-IPSS	Muito favorável	2	100,0%	0	0,0%	0,793
	Favorável	19	48,7%	20	51,3%	
	Intermediário	6	46,2%	7	53,8%	
	Desfavorável	1	100,0%	0	0,0%	
	Muito desfavorável	1	50,0%	1	50,0%	
Características da BMO						
Celularidade BMO	Hipocelular	2	28,6%	5	71,4%	0,117
	Normocelular	7	77,8%	2	22,2%	
	Hipercelular	23	51,1%	22	48,9%	
Diseritropoese BMO	Ausência	9	40,9%	13	59,1%	0,601
	Presença	14	48,3%	15	51,7%	
Dismegacariopese BMO	Ausência	11	35,5%	20	64,5%	0,886
	Presença	12	60,0%	8	40,0%	
Disgranulopese BMO	Ausência	6	40,0%	9	60,0%	0,637
	Presença	17	47,2%	19	52,8%	
Micromegacariocito BMO	Ausência	22	50,0%	22	50,0%	0,999
	Presença	8	50,0%	8	50,0%	

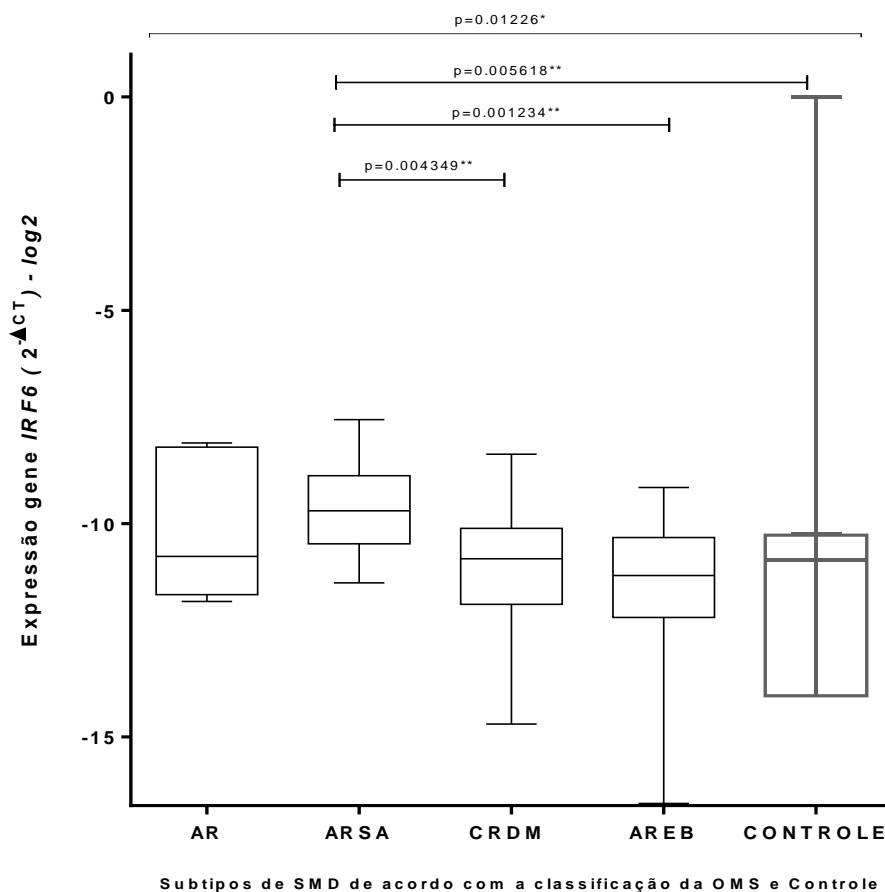
Continuação Tabela 21. Análise qualitativa da metilação da região promotora do gene *IRF5* de acordo com as variáveis clínicas dos pacientes com SMD.

Variáveis clínicas	Classes	<i>IRF5</i>				<i>p</i> -Valor
		Não Metilado		Metilado		
		N	%	N	%	
Citopenias						
HB (R-IPSS)	≥ 10	16	61,5%	10	38,5%	0,457
	8-<10	11	44,0%	14	56,0%	
	<8	20	51,3%	19	48,7%	
ANC (R-IPSS)	≥800	37	60,7%	24	39,3%	0,025
	<800	10	34,5%	19	65,5%	
Plaquetas (R-IPSS)	≥100	25	61,0%	16	39,0%	0,128
	50-<100	14	53,8%	12	46,2%	
	<50	8	34,8%	15	65,2%	
Número de Citopenias (IPSS)	0	10	83,3%	2	16,7%	0,104
	1	15	53,6%	13	46,4%	
	2	11	40,7%	16	59,3%	
	3	11	47,8%	12	52,2%	
Número de Citopenias (R-IPSS)	0	12	85,7%	2	14,3%	0,038
	1	17	48,6%	18	51,4%	
	2	11	50,0%	11	50,0%	
	3	7	36,8%	12	63,2%	
Sideroblastos em anel						
Sideroblastos em anel	Ausência	26	46,4%	30	53,6%	0,204
	Presença	16	61,5%	10	38,5%	
Porcentagem de sideroblastos em anel	0	26	46,4%	30	53,6%	0,261
	1-14%	3	50,0%	3	50,0%	
	Acima de 15%	13	65,0%	7	35,0%	
Blastos MO						
Porcentagem de blastos (R-IPSS)	Menor Igual a 2	33	53,2%	29	46,8%	0,234
	>2% - <5%	4	44,4%	5	55,6%	
	5%-10%	8	72,7%	3	27,3%	
	>10%	2	25,0%	6	75,0%	
Classificação de Risco						
Grupo de Risco (IPSS)	Baixo	11	68,8%	5	31,3%	0,313
	Intermediário I	13	43,3%	17	56,7%	
	Intermediário II	4	66,7%	2	33,3%	
	Alto	1	33,3%	2	66,7%	
Grupos de Risco (R-IPSS)	Muito baixo	8	80,0%	2	20,0%	0,054
	Baixo	13	41,9%	18	58,1%	
	Intermediário	4	57,1%	3	42,9%	
	Alto	3	100,0%	0	0,0%	
Grupo de Risco (WPSS)	Muito alto	1	20,0%	4	80,0%	0,301
	Muito baixo	3	100,0%	0	0,0%	
	Baixo	11	47,8%	12	52,2%	
	Intermediário	10	52,6%	9	47,4%	
	Alto	4	66,7%	2	33,3%	
	Muito alto	0	0,0%	2	100,0%	
Dependência transfusional, evolução e óbito						
Dependência transfusional	Não	22	55,0%	18	45,0%	0,331
	Sim	20	44,4%	25	55,6%	
Evolução	Não	45	54,9%	37	45,1%	0,298
	Sim	3	33,3%	6	66,7%	

4.4.6 Gene *IRF6*

4.4.6.1 Expressão do gene *IRF6*

A análise da expressão revelou que o subtipo ARSA está associado a um maior nível de expressão do gene *IRF6* quando comparado a células de medula óssea normal e com os outros subtipos da OMS ($p=0,023$) (**Figura 7, p; Tabela 22**). Além disso, níveis mais altos do gene *IRF6* foi associado a pacientes com cariótipo normal em todas as variáveis citogenéticas avaliadas. (**Figura 8, p.; Tabela 22**)



*Considerar valor do p para o teste de Kruskal-Wallis (comparação do grupo), $p < 0,05$.

**Considerar significativo o p abaixo do valor da correção de Bonferroni ($p=0,0166$), para o teste de Mann-Whitney U, realizado como pós teste.

Ar. Anemia refratária; ARSA. Anemia refratária com sideroblastos em anel; CRDM. Citopenia refratária com displasia em multilinhagens; AREB. Anemia refratária com excesso de blastos.

Figura 7. Perfil de expressão gênica do gene *IRF6* em células de medula total de paciente portadores de SMD de acordo com a classificação OMS. O gene *IRF6* foi mais expresso em células de pacientes com ARSA quando comparadas ao subtipo CRDM e AREB. A expressão do gene *IRF6*, quando comparada ao controle, foi diferente somente no subtipo ARSA.

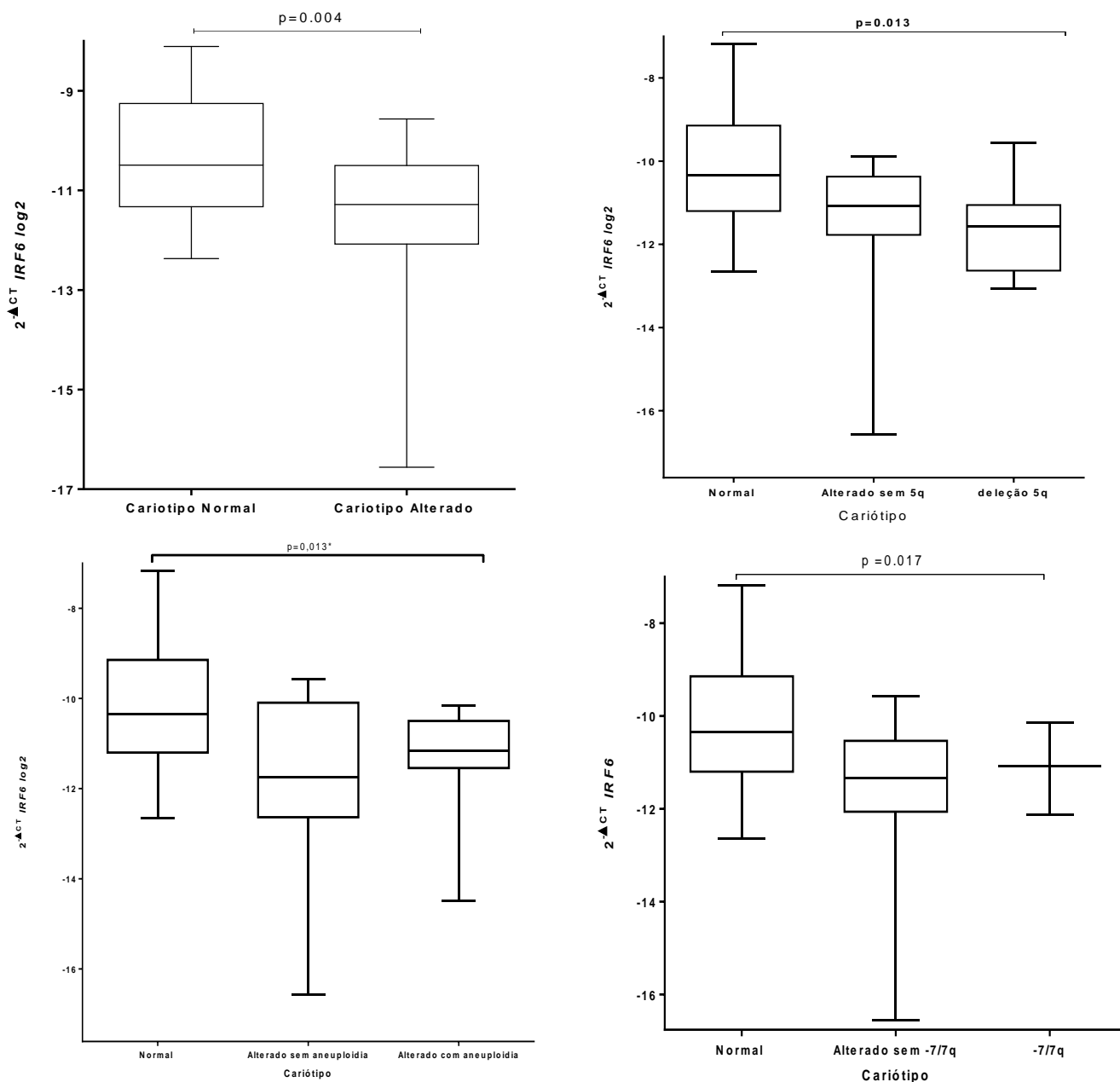


Figura 8. Comparação entre a expressão gênica de *IRF6* em células de medula total de paciente portadores de SMD de acordo com as variáveis citogenéticas. O gene *IRF6* foi mais expresso em pacientes com cariótipo normal do que em pacientes com algum tipo de alteração no cariótipo. **A.** Alterado x normal. **B.** Deleção do braço longo do cromossomo 5. **C.** Aneuloidia. **D.** Monossomia e deleção do braço longo do cromossomo 7. *Considerar valor do p para o teste de Kruskal-Wallis (comparação do grupo), $p < 0,05$. **Considerar significativo o p abaixo do valor da correção de Bonferroni ($p = 0,0166$), para o teste de Mann-Whitnet U, realizado como pós teste.

Tabela 22. Análise expressão do gene *IRF6* de acordo com as variáveis clínicas dos pacientes com SMD.

Variáveis clínicas	Classes	<i>IRF6</i>			p-Valor	
		N	Mediane	Mínimo		Máximo
Grupo	Controle	11	0,0005	0,0000	0,0008	0,241
	Caso	89	0,0006	0,0000	0,0069	
OMS	AR	11	0,0006	0,0003	0,0036	0,023
	ARSA	12	0,0012	0,0004	0,0053	
	CRDM	38	0,0006	0,0000	0,0030	
	AREBs	16	0,0004	0,0000	0,0018	
	LMMC	3	0,0008	0,0003	0,0069	
	RT-SMD	7	0,0003	0,0001	0,0042	
Cariótipo						
Cariótipo Normal X Alterado	Normal	31	0,0008	0,0002	0,0069	0,004
	Alterado	22	0,0004	0,0000	0,0013	
Aneuploidia	Normal	31	0,0008	0,0002	0,0069	0,013
	Alterado com aneuploidia	8	0,0003	0,0000	0,0013	
	Aneuploide	14	0,0004	0,0000	0,0009	
Deleção 5q	Normal	31	0,0008	0,0002	0,0069	0,013
	Alterado com 5q-	8	0,0003	0,0001	0,0013	
	Alterado sem 5q-	13	0,0005	0,0000	0,0011	
-7/7q	Normal	31	0,0008	0,0002	0,0069	0,017
	Alterado com -7/7q	5	0,0003	0,0002	0,0009	
	Alterado sem -7/7q	16	0,0004	0,0000	0,0013	
Grupos Citogenéticos IPSS	Favorável	36	0,0006	0,0001	0,0069	0,315
	Intermediário	12	0,0005	0,0000	0,0013	
	Desfavorável	5	0,0005	0,0002	0,0009	
Grupos Citogenéticos R-IPSS	Muito favorável	1	0,0004	0,0004	0,0004	0,440
	Favorável	36	0,0006	0,0001	0,0069	
	Intermediário	9	0,0004	0,0000	0,0011	
	Desfavorável	1	0,0004	0,0004	0,0004	
	Muito desfavorável	3	0,0007	0,0005	0,0009	
Características da BMO						
Celularidade BMO	Hipocelular	8	0,0004	0,0000	0,0023	0,188
	Normocelular	8	0,0005	0,0002	0,0025	
	Hipercelular	45	0,0007	0,0000	0,0069	
Diseritropoese BMO	Ausência	25	0,0006	0,0000	0,0053	0,589
	Presença	27	0,0007	0,0000	0,0069	
Dismegacariopese BMO	Ausência	35	0,0007	0,0000	0,0034	0,992
	Presença	17	0,0005	0,0000	0,0069	
Disgranulopese BMO	Ausência	15	0,0008	0,0002	0,0030	0,499
	Presença	37	0,0006	0,0000	0,0069	
Micromegacariocito BMO	Ausência	48	0,0005	0,0000	0,0069	0,459
	Presença	13	0,0007	0,0000	0,0053	

Continuação Tabela 22. Análise expressão do gene *IRF6* de acordo com as variáveis clínicas dos pacientes com SMD.

Variáveis clínicas	Classes	N	<i>IRF6</i>			p-Valor
			Mediana	Mínimo	Máximo	
Citopenias						
HB (R-IPSS)	≥ 10	18	0,0005	0,0000	0,0040	0,706
	8-<10	28	0,0006	0,0000	0,0069	
	<8	40	0,0006	0,0000	0,0053	
ANC (R-IPSS)	≥800	56	0,0006	0,0000	0,0069	0,807
	<800	30	0,0006	0,0000	0,0042	
Plaquetas (R-IPSS)	≥100	41	0,0007	0,0000	0,0053	0,656
	50-<100	23	0,0005	0,0000	0,0069	
	<50	22	0,0005	0,0001	0,0025	
Número de Citopenias (IPSS)	0	10	0,0010	0,0000	0,0040	0,659
	1	26	0,0005	0,0000	0,0053	
	2	25	0,0005	0,0000	0,0069	
	3	25	0,0006	0,0000	0,0035	
Número de Citopenias (R-IPSS)	0	10	0,0010	0,0000	0,0040	0,604
	1	34	0,0005	0,0000	0,0053	
	2	22	0,0005	0,0000	0,0069	
	3	20	0,0006	0,0002	0,0030	
Sideroblastos em anel						
Sideroblastos em anel	Ausência	56	0,0006	0,0000	0,0036	0,060
	Presença	26	0,0008	0,0000	0,0069	
Porcentagem de sideroblastos em anel	0	56	0,0006	0,0000	0,0036	0,268
	1-14%	6	0,0005	0,0002	0,0035	
	Acima de 15%	20	0,0009	0,0000	0,0069	
Blastos MO						
Porcentagem de blastos (R-IPSS)	Menor Igual a 2	59	0,0006	0,0000	0,0069	0,290
	>2% - <5%	10	0,0006	0,0000	0,0053	
	5%-10%	9	0,0008	0,0000	0,0014	
	>10%	8	0,0003	0,0001	0,0018	
Classificação de Risco						
Grupos de Risco (R-IPSS)	Muito baixo	6	0,0006	0,0003	0,0016	0,676
	Baixo	26	0,0005	0,0000	0,0036	
	Intermediário	8	0,0008	0,0003	0,0069	
	Alto	5	0,0008	0,0000	0,0025	
	Muito alto	5	0,0004	0,0002	0,0007	
Grupo de Risco (WPSS)	Muito baixo	4	0,0010	0,0003	0,0040	0,589
	Baixo	17	0,0005	0,0002	0,0036	
	Intermediário	16	0,0005	0,0000	0,0025	
	Alto	6	0,0007	0,0000	0,0009	
	Muito alto	3	0,0004	0,0002	0,0005	
Dependência transfusional, evolução e óbito						
Dependência transfusional	Não	33	0,0006	0,0000	0,0069	0,631
	Sim	48	0,0006	0,0000	0,0053	
Evolução	Não	75	0,0006	0,0000	0,0053	0,962
	Sim	11	0,0005	0,0001	0,0069	

4.4.6.2 Metilação da região promotora do gene *IRF6*

O gene *IRF6* apresentou uma frequência maior de pacientes metilados no subtipo AR (6/9 – 67%) quando comparados aos outros *IRFs* que possuíam a maioria dos pacientes sem metilação (*IRF1*, 22%; *IRF2*, 0%; *IRF3*, 11%, *IRF5*, 22%, *IRF7*, 22% e *IRF8*, 0%). Além disso, o gene *IRF6* foi 100% metilado no subtipo AREB (17/17), em LMMC (3/3) e RT-SMD (8/8) (**Tabela 23**).

O gene *IRF6* mostrou ser mais frequentemente metilado (65%) em pacientes que apresentaram dismegacariopose ($p=0,049$) (**Tabela 23**).

O gene *IRF6* está associado a um maior número de pacientes metilados em percentagem de blastos acima de 2% ($p<0,001$) (**Tabela 23**). Além disso, foi observada associação da metilação do *IRF6* com o risco intermediário, alto e muito alto, de acordo com os critérios do R- IPSS ($p=0,006$) (**Tabela 23**). Portanto, a hipermetilação do gene *IRF6* está associado a parâmetros mais agressivos da doença.

Tabela 23. Análise qualitativa da metilação da região promotora do gene *IRF6* de acordo com as variáveis clínicas dos pacientes com SMD.

Variáveis clínicas	Classes	<i>IRF6</i>				<i>p</i> -Valor		
		Não Metilado		Metilado				
		N	%	N	%			
Grupo	Controle	1	9%	10	91%	0,025		
	Caso	41	45%	50	55%			
OMS	AR	3	33%	6	67%	<0,001		
	ARSA	9	69%	4	31%			
	CRDM	29	71%	12	29%			
	AREBs	0	0%	17	100%			
	LMMC	0	0%	3	100%			
	RT-SMD	0	0%	8	100%			
Cariótipo								
Cariótipo Normal X	Normal	17	49%	18	51%	0,999		
	Alterado	12	48%	13	52%			
Aneuploidia	Normal	17	49%	18	51%	0,878		
	Alterado com aneuploida	5	56%	4	44%			
	Aneuploide	7	44%	9	56%			
Deleção 5q	Normal	17	49%	18	51%	0,868		
	Alterado com 5q-	3	38%	5	63%			
	Alterado sem 5q-	8	50%	8	50%			
-7/7q	Normal	17	49%	18	51%	0,999		
	Alterado com -7/7q	2	40%	3	60%			
	Alterado sem -7/7q	9	47%	10	53%			
Grupos Citogenéticos IPSS	Favorável	19	49%	20	51%	0,999		
	Intermediário	7	47%	8	53%			
	Desfavorável	2	40%	3	60%			
Grupos Citogenéticos R-IPSS	Muito favorável	2	100%	0	0%	0,103		
	Favorável	20	51%	19	49%			
	Intermediário	4	31%	9	69%			
	Desfavorável	0	0%	1	100%			
Muito desfavorável	Muito desfavorável	2	100%	0	0%			
	Características da BMO							
	Celularidade BMO	Hipocelular	3	43%	4		57%	0,642
		Normocelular	3	33%	6		67%	
		Hipercelular	24	53%	21		47%	
Diseritropoese BMO	Ausência	15	68%	7	32%	0,058		
	Presença	12	41%	17	59%			
Dismegacariopose BMO	Ausência	20	65%	11	35%	0,039		
	Presença	7	35%	13	65%			
Disgranulopose BMO	Ausência	7	47%	8	53%	0,562		
	Presença	20	56%	16	44%			
Micromegacariocito BMO	Ausência	18	41%	26	59%	0,056		
	Presença	11	69%	5	31%			

Continuação Tabela 23. Análise qualitativa da metilação da região promotora do gene *IRF6* de acordo com as variáveis clínicas dos pacientes com SMD.

Variáveis clínicas	Classes	<i>IRF6</i>				p-Valor
		Não Metilado		Metilado		
		N	%	N	%	
Citopenias						
HB (R-IPSS)	≥ 10	10	38%	16	62%	0,072
	8-<10	16	64%	9	36%	
	<8	14	36%	25	64%	
ANC (R-IPSS)	≥800	30	49%	31	51%	0,257
	<800	10	34%	19	66%	
Plaquetas (R-IPSS)	≥100	22	54%	19	46%	0,206
	50-<100	11	42%	15	58%	
	<50	7	30%	16	70%	
Número de Citopenias (IPSS)	0	6	50%	6	50%	0,197
	1	13	46%	15	54%	
	2	15	56%	12	44%	
	3	6	26%	17	74%	
Número de Citopenias (R-IPSS)	0	8	57%	6	43%	0,224
	1	15	43%	20	57%	
	2	12	55%	10	45%	
	3	5	26%	14	74%	
Sideroblastos em anel						
Sideroblastos em anel	Ausência	22	39%	34	61%	0,361
	Presença	13	50%	13	50%	
Porcentagem de sideroblastos em anel	0	22	39%	34	61%	0,423
	1-14%	2	33%	4	67%	
	Acima de 15%	11	55%	9	45%	
Blastos MO						
Porcentagem de blastos (R-IPSS)	Menor Igual a 2	37	60%	25	40%	<0,001
	>2% - <5%	2	22%	7	78%	
	5%-10%	1	9%	10	91%	
	>10%	0	0%	8	100%	
Classificação de Risco						
Grupo de Risco (IPSS)	Baixo	11	69%	5	31%	0,121
	Intermediário I	15	50%	15	50%	
	Intermediário II	2	33%	4	67%	
	Alto	0	0%	3	100%	
Grupos de Risco (R-IPSS)	Muito baixo	9	90%	1	10%	0,006
	Baixo	16	52%	15	48%	
	Intermediário	1	14%	6	86%	
	Alto	1	33%	2	67%	
Grupo de Risco (WPSS)	Muito alto	1	20%	4	80%	0,316
	Muito baixo	2	67%	1	33%	
	Baixo	15	65%	8	35%	
	Intermediário	9	47%	10	53%	
Dependência transfusional, evolução e óbito	Alto	2	33%	4	67%	0,177
	Muito alto	0	0%	2	100%	
	Não	20	44%	25	56%	
	Sim	39	48%	43	52%	
Evolução	Não	2	22%	7	78%	0,072
	Sim	10	38%	16	62%	

4.4.7 Gene *IRF7*

4.4.7.1 Expressão do gene *IRF7*

Maiores níveis de expressão do gene *IRF7* foi associada a pacientes com SMD, quando comparadas a medula de indivíduos saudáveis ($p=0,028$) (Tabela X, p). Além disso, maiores níveis de expressão do gene *IRF7* foram associadas a pacientes com $HB < 10\text{g/dL}$ ($p=0,026$), $ANC < 800/\mu\text{L}$ ($p=0,001$) e plaquetas $< 50.000/\mu\text{L}$ ($p=0,0014$). Pacientes que apresentaram três citopenas periféricas pelos critérios do IPSS e R-IPSS também apresentaram maior nível de expressão do *IRF7* ($p=0,001$ e $p=0,001$, respectivamente (Tabela 24).

Tabela 24. Análise expressão do gene *IRF7* de acordo com as variáveis clínicas dos pacientes com SMD.

Variáveis clínicas	Classes	<i>IRF7</i>			p-Valor	
		N	Medianε	Mínimo		Máximo
Grupo	Controle	11	0,05403	0,00678	0,20166	0,028
	Caso	89	0,09119	0,01296	2,96905	
OMS	AR	11	0,06816	0,01897	1,01748	0,063
	ARSA	12	0,06357	0,02026	0,26062	
	CRDM	38	0,10586	0,01296	2,96905	
	AREBs	16	0,14849	0,04011	0,41466	
	LMMC	3	0,08077	0,08049	0,13397	
	RT-SMD	7	0,04972	0,04025	0,27452	
Cariótipo						
Cariótipo Normal X Alterado	Normal	31	0,08077	0,01897	1,09429	0,170
	Alterado	22	0,10601	0,02452	2,96905	
Aneuploidia	Normal	31	0,08077	0,01897	1,09429	0,252
	Alterado com aneuploidia	8	0,08808	0,02452	0,19751	
	Aneuploide	14	0,12430	0,02495	2,96905	
Deleção 5q	Normal	31	0,08077	0,01897	1,09429	0,038
	Alterado com 5q-	8	0,08116	0,02495	0,11744	
	Alterado sem 5q-	13	0,15336	0,02452	2,96905	
-7/7q	Normal	31	0,08077	0,01897	1,09429	0,178
	Alterado com -7/7q	5	0,15336	0,08747	0,26517	
	Alterado sem -7/7q	16	0,10601	0,02452	2,96905	
Grupos Citogenéticos IPSS	Favorável	36	0,08628	0,01897	1,09429	0,214
	Intermediário	12	0,09499	0,02452	2,96905	
	Desfavorável	5	0,16840	0,04011	0,26517	
Grupos Citogenéticos R-IPSS	Muito favorável	1	0,09740	0,09740	0,09740	0,060
	Favorável	36	0,08628	0,01897	1,09429	
	Intermediário	9	0,13397	0,02936	2,96905	
	Desfavorável	1	0,04011	0,04011	0,04011	
	Muito desfavorável	3	0,16840	0,15336	0,26517	
Características da BMO						
Celularidade BMO	Hipo celular	8	0,11678	0,04972	1,01748	0,5320
	Normo celular	8	0,09053	0,02495	1,09429	
	Hiper celular	45	0,09056	0,01296	2,96905	
Diseritropoese BMO	Ausência	25	0,11463	0,02194	1,09429	0,3320
	Presença	27	0,09056	0,01296	2,96905	
Dismegacariopese BMO	Ausência	35	0,10402	0,01296	2,96905	0,6470
	Presença	17	0,09119	0,02495	0,27452	
Disgranulopese BMO	Ausência	15	0,07668	0,01296	0,41037	0,1520
	Presença	37	0,11111	0,02026	2,96905	
Micromegacariocito BMO	Ausência	48	0,09087	0,01296	2,96905	0,5850
	Presença	13	0,11111	0,02194	0,54715	

Continuação Tabela 24. Análise expressão do gene *IRF7* de acordo com as variáveis clínicas dos pacientes com SMD.

Variáveis clínicas	Classes	N	<i>IRF7</i>			<i>p</i> -Valor
			Mediana	Mínimo	Máximo	
Citopenias						
HB (R-IPSS)	≥ 10	18	0,05292	0,02495	0,20448	0,026
	8-<10	28	0,10940	0,01296	1,01748	
	<8	40	0,09842	0,01897	2,96905	
ANC (R-IPSS)	≥800	56	0,07344	0,01897	1,01748	0,001
	<800	30	0,13900	0,01296	2,96905	
Plaquetas (R-IPSS)	≥100	41	0,07484	0,01897	0,54715	0,014
	50-<100	23	0,09056	0,01296	2,96905	
	<50	22	0,13684	0,02452	1,09429	
Número de Citopenias (IPSS)	0	10	0,05292	0,02936	0,10439	0,001
	1	26	0,07150	0,01897	1,01748	
	2	25	0,09773	0,02452	0,41466	
	3	25	0,14309	0,01296	2,96905	
Número de Citopenias (R-IPSS)	0	10	0,05292	0,02936	0,10439	0,001
	1	34	0,08270	0,01897	0,54715	
	2	22	0,10556	0,04011	1,01748	
	3	20	0,14823	0,01296	2,96905	
Sideroblastos em anel						
Sideroblastos em anel	Ausência	56	0,09263	0,01296	2,96905	0,256
	Presença	26	0,08398	0,02026	0,65293	
	0	56	0,09263	0,01296	2,96905	
Porcentagem de sideroblastos em anel	1-14%	6	0,10452	0,02495	0,65293	0,324
	Acima de 15%	20	0,07516	0,02026	0,27452	
Blastos MO						
Porcentagem de blastos (R-IPSS)	Menor Igual a 2	59	0,09056	0,01296	2,96905	0,310
	>2% - <5%	10	0,11513	0,02495	1,09429	
	5%-10%	9	0,11463	0,04011	0,41037	
	>10%	8	0,18739	0,04559	0,41466	
Classificação de Risco						
Grupos de Risco (R-IPSS)	Muito baixo	6	0,07692	0,03033	0,10402	0,117
	Baixo	26	0,08933	0,01897	0,28717	
	Intermediário	8	0,09890	0,04544	2,96905	
	Alto	5	0,15336	0,04011	1,09429	
	Muito alto	5	0,16840	0,08508	0,26517	
Grupo de Risco (WPSS)	Muito baixo	4	0,07425	0,03033	0,12631	0,720
	Baixo	17	0,06515	0,01897	0,26062	
	Intermediário	16	0,09260	0,02495	1,09429	
	Alto	6	0,16088	0,04011	2,96905	
	Muito alto	3	0,19615	0,11463	0,26517	
Dependência transfusional, evolução e óbito						
Dependência transfusional	Não	33	0,08538	0,02610	1,01748	0,123
	Sim	48	0,11583	0,01296	2,96905	
Evolução	Não	75	0,09119	0,01296	2,96905	0,340
	Sim	11	0,08747	0,07056	0,19888	

4.4.6.2 Metilação da região promotora do gene *IRF7*

A avaliação da metilação do gene *IRF7* foi realizada em SMD e nenhuma associação foi encontrada nas variáveis estudadas (**Tabela 25**).

Tabela 25. Análise qualitativa da metilação da região promotora do gene *IRF7* de acordo com as variáveis clínicas dos pacientes com SMD.

Variáveis clínicas	Classes	<i>IRF7</i>				<i>p</i> -Valor
		Não Metilado		Metilado		
		N	%	N	%	
Grupo	Controle	10	91%	1	9%	0,470
	Caso	73	80%	18	20%	
OMS	AR	7	78%	2	22%	0,146
	ARSA	7	54%	6	46%	
	CRDM	33	80%	8	20%	
	AREBs	15	88%	2	12%	
	LMMC	3	100%	0	0%	
	RT-SMD	8	100%	0	0%	
Cariótipo						
Cariótipo Normal X	Normal	27	77%	8	23%	0,332
	Alterado	22	88%	3	12%	
Aneuploidia	Normal	27	77%	8	23%	0,463
	Alterado com aneuploidia	8	89%	1	11%	
	Aneuploide	14	88%	2	13%	
Deleção 5q	Normal	27	77%	8	23%	0,336
	Alterado com 5q-	8	100%	0	0%	
	Alterado sem 5q-	14	88%	2	13%	
-7/7q	Normal	27	77%	8	23%	0,479
	Alterado com -7/7q	5	100%	0	0%	
	Alterado sem -7/7q	17	89%	2	11%	
Grupos Citogenéticos IPSS	Favorável	31	79%	8	21%	0,760
	Intermediário	12	80%	3	20%	
	Desfavorável	5	100%	0	0%	
Grupos Citogenéticos R-IPSS	Muito favorável	2	100%	0	0%	0,999
	Favorável	31	79%	8	21%	
	Intermediário	10	77%	3	23%	
	Desfavorável	1	100%	0	0%	
	Muito desfavorável	2	100%	0	0%	
Características da BMO						
Celularidade BMO	Hipocelular	6	86%	1	14%	0,137
	Normocelular	9	100%	0	0%	
	Hipercelular	31	69%	14	31%	
Diseritropoese BMO	Ausência	15	68%	7	32%	0,733
	Presença	21	72%	8	28%	
Dismegacariopose BMO	Ausência	19	61%	12	39%	0,070
	Presença	17	85%	3	15%	
Disgranulopose BMO	Ausência	11	73%	4	27%	0,781
	Presença	25	69%	11	31%	
Micromegacariocito BMO	Ausência	34	77%	10	23%	0,253
	Presença	10	63%	6	38%	

Continuação Tabela 25. Análise qualitativa da metilação da região promotora do gene *IRF7* de acordo com as variáveis clínicas dos pacientes com SMD.

Variáveis clínicas	Classes	<i>IRF7</i>				p-Valor
		Não Metilado		Metilado		
		N	%	N	%	
Citopenias						
HB (R-IPSS)	≥ 10	22	85%	4	15%	0,708
	8-<10	19	76%	6	24%	
	<8	31	79%	8	21%	
ANC (R-IPSS)	≥800	46	75%	15	25%	0,160
	<800	26	90%	3	10%	
Plaquetas (R-IPSS)	≥100	31	76%	10	24%	0,558
	50-<100	21	81%	5	19%	
	<50	20	87%	3	13%	
Número de Citopenias (IPSS)	0	9	75%	3	25%	0,589
	1	21	75%	7	25%	
	2	24	89%	3	11%	
	3	18	78%	5	22%	
Número de Citopenias (R-IPSS)	0	11	79%	3	21%	0,933
	1	27	77%	8	23%	
	2	18	82%	4	18%	
	3	16	84%	3	16%	
Sideroblastos em anel						
Sideroblastos em anel	Ausência	47	84%	9	16%	0,249
	Presença	19	73%	7	27%	
Porcentagem de sideroblastos em anel	0	47	84%	9	16%	0,070
	1-14%	6	100%	0	0%	
	Acima de 15%	13	65%	7	35%	
Blastos MO						
Porcentagem de blastos (R-IPSS)	Menor Igual a 2	47	76%	15	24%	0,683
	>2% - <5%	8	89%	1	11%	
	5%-10%	10	91%	1	9%	
	>10%	7	88%	1	13%	
Classificação de Risco						
Grupo de Risco (IPSS)	Baixo	12	75%	4	25%	0,622
	Intermediário I	23	77%	7	23%	
	Intermediário II	6	100%	0	0%	
	Alto	3	100%	0	0%	
Grupos de Risco (R-IPSS)	Muito baixo	8	80%	2	20%	0,849
	Baixo	24	77%	7	23%	
	Intermediário	5	71%	2	29%	
	Alto	3	100%	0	0%	
Grupo de Risco (WPSS)	Muito alto	5	100%	0	0%	0,562
	Muito baixo	3	100%	0	0%	
	Baixo	16	70%	7	30%	
	Intermediário	15	79%	4	21%	
Evolução	Alto	6	100%	0	0%	0,196
	Muito alto	2	100%	0	0%	
Dependência transfusional, evolução e óbito						
Dependência transfusional	Não	30	75%	10	25%	0,439
	Sim	37	82%	8	18%	
Evolução	Não	64	78%	18	22%	0,196
	Sim	9	100%	0	0%	

4.4.8 Gene *IRF8*

4.4.8.1 Expressão do gene *IRF8*

Menores níveis de expressão gene *IRF8* foi associado a pacientes com cariótipo com alterações estruturais ($p=0,043$) (**Figura 9. Tabela 26**). O *IRF8* foi 2.2 menos expresso em pacientes com cariótipo alterado sem alterações numéricas (**Figura 9**).

Quanto a citopenias periféricas, o maior nível de expressão do *IRF8* foi associado a pacientes com $ANC < 800$ ($p=0,002$); plaquetas < 100.000 ($p=0,0035$); 2/3 citopenias de acordo com os critérios do IPSS e R-IPSS ($p=0,019$ e $p=0,005$, respectivamente) (**Tabela 26**).

Quanto aos grupos de risco avaliados, o maior nível de *mIRF8* foi associado a pacientes de risco muito alto de acordo com o critério do R-IPSS ($p=0,017$) (**Tabela 26**). Para melhor avaliação os pacientes foram agrupados em baixo risco (muito baixo e baixo risco) e alto risco (intermediário, alto e muito alto risco) e verificou-se que o *IRF8* foi 2.5 vezes mais expresso em pacientes de alto risco quando comparado a pacientes de baixo risco ($p=0.0031$) (**Figura 10**).

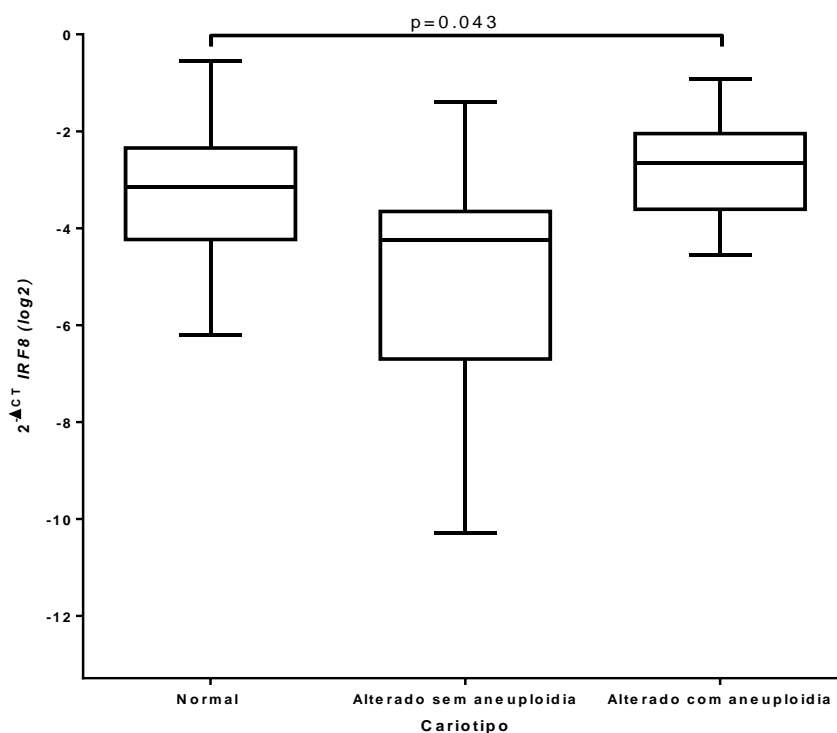


Figura 9. Comparação entre a expressão gênica do gene *IRF 8* em células de medula total entre pacientes com cariótipo normal, cariótipo alterado sem aneuploidia e cariótipo alterado com aneuploidia. O gene *IRF8* é hipoexpresso em indivíduos com cariótipo alterado sem aneuploidia. Considerar valor do p para o teste de Kruskal-Wallis (comparação do grupo), $p < 0,05$. Considerar significativo o p abaixo do valor da correção de Bonferroni ($p = 0,0166$), para o teste de Mann-Whitney U, realizado como pós teste. Observação. Considerar valor do p significativo para o teste de Mann-Whitney (comparação de entre dois grupos), $p < 0,05$.

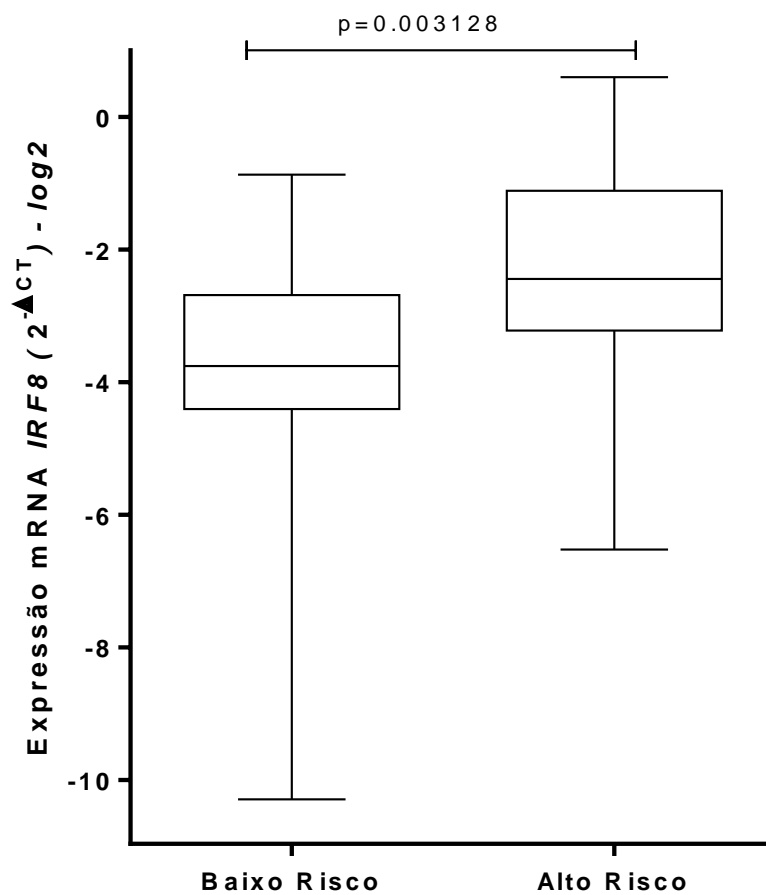


Figura 10. Expressão do gene *IRF8* de acordo com o risco dos pacientes com SMD. O *IRF8* foi 2.5 vezes mais expresso em pacientes de alto risco do que em pacientes de baixo risco. Baixo risco são os pacientes de muito baixo e baixo risco de acordo com o critério do R-IPSS e alto risco são pacientes de risco intermediário, alto e muito alto de acordo com o R-IPSS.

Tabela 26. Análise expressão do gene *IRF8* de acordo com as variáveis clínicas dos pacientes com SMD.

Variáveis clínicas	Classes	<i>IRF8</i>				p-Valor
		N	Median	Mínimo	Máximo	
Grupo	Controle	11	0,10882	0,00564	0,28224	0,460
	Caso	89	0,11542	0,00080	5,15153	
OMS	AR	11	0,06016	0,02005	1,09429	0,093
	ARSA	12	0,05975	0,01365	5,15153	
	CRDM	38	0,11909	0,00080	0,69737	
	AREBs	16	0,21663	0,00849	1,51572	
	LMMC	3	0,19278	0,15987	0,49655	
	RT-SMD	7	0,12763	0,05329	0,32421	
Cariótipo						
Cariótipo Normal X Alterado	Normal	31	0,11785	0,01365	1,51572	0,601
	Alterado	22	0,10157	0,00080	0,52668	
Aneuploidia	Normal	31	0,11785	0,01365	1,51572	0,043
	Alterado com aneuploidia	8	0,05301	0,00080	0,38024	
	Aneuploide	14	0,15796	0,04284	0,52668	
Deleção 5q	Normal	31	0,11785	0,01365	1,51572	0,594
	Alterado com 5q-	8	0,07214	0,00080	0,38024	
	Alterado sem 5q-	13	0,11227	0,00919	0,52668	
-7/7q	Normal	31	0,11785	0,01365	1,51572	0,142
	Alterado com -7/7q	5	0,22376	0,05831	0,52668	
	Alterado sem -7/7q	16	0,07307	0,00080	0,45063	
Grupos Citogenéticos IPSS	Favorável	36	0,11277	0,00080	1,51572	0,398
	Intermediário	12	0,07307	0,00919	0,45063	
	Desfavorável	5	0,11305	0,09087	0,52668	
Grupos Citogenéticos R-IPSS	Muito favorável	1	0,15987	0,15987	0,15987	0,838
	Favorável	36	0,08962	0,00080	1,51572	
	Intermediário	9	0,15987	0,01086	0,45063	
	Desfavorável	1	0,11305	0,11305	0,11305	
	Muito desfavorável	3	0,11227	0,09087	0,52668	
Características da BMO						
Celularidade BMO	Hipocelular	8	0,19307	0,05575	1,09429	0,378
	Normocelular	8	0,08962	0,04284	0,69737	
	Hipercelular	45	0,10769	0,00080	5,15153	
Diseritropoese BMO	Ausência	25	0,15604	0,00849	5,15153	0,140
	Presença	27	0,07407	0,00080	0,69737	
Dismegacariopese BMO	Ausência	35	0,10259	0,00080	0,69737	0,838
	Presença	17	0,11785	0,00849	5,15153	
Disgranulopese BMO	Ausência	15	0,07356	0,00849	0,52668	0,152
	Presença	37	0,14610	0,00080	5,15153	
Micromegacariocito BMO	Ausência	48	0,10514	0,00080	0,69737	0,826
	Presença	13	0,11785	0,00849	5,15153	

Continuação Tabela 26. Análise expressão do gene *IRF8* de acordo com as variáveis clínicas dos pacientes com SMD.

Variáveis clínicas	Classes	N	<i>IRF8</i>			p-Valor
			Mediana	Mínimo	Máximo	
Citopenias						
HB (R-IPSS)	>= 10	18	0,10154	0,03467	0,44907	0,596
	8-<10	28	0,10157	0,01086	1,09429	
	<8	40	0,14397	0,00080	5,15153	
ANC (R-IPSS)	>=800	56	0,08749	0,00080	5,15153	0,002
	<800	30	0,20877	0,00849	1,51572	
Plaquetas (R-IPSS)	>=100	41	0,06337	0,00080	5,15153	0,035
	50-<100	23	0,12763	0,00849	1,51572	
	<50	22	0,17770	0,00919	0,72951	
Número de Citopenias (IPSS)	0	10	0,05767	0,03467	0,32760	0,019
	1	26	0,06701	0,00080	5,15153	
	2	25	0,12807	0,00919	0,72951	
	3	25	0,17739	0,00849	1,51572	
Número de Citopenias (R-IPSS)	0	10	0,05767	0,03467	0,32760	0,005
	1	34	0,08268	0,00080	5,15153	
	2	22	0,15251	0,01086	1,09429	
	3	20	0,19981	0,00849	1,51572	
Sideroblastos em anel						
Sideroblastos em anel	Ausência	56	0,11909	0,00080	1,51572	0,126
	Presença	26	0,06123	0,00919	5,15153	
Porcentagem de sideroblastos em anel	0	56	0,11909	0,00080	1,51572	0,095
	1-14%	6	0,22811	0,04284	0,69737	
	Acima de 15%	20	0,05893	0,00919	5,15153	
Blastos MO						
Porcentagem de blastos (R-IPSS)	Menor Igual a 2	59	0,10259	0,00080	1,09429	0,009
	>2% - <5%	10	0,17632	0,04284	5,15153	
	5%-10%	9	0,09278	0,00849	0,20950	
	>10%	8	0,36713	0,05811	1,51572	
Classificação de Risco						
Grupos de Risco (R-IPSS)	Muito baixo	6	0,11671	0,03467	0,38024	0,017
	Baixo	26	0,06712	0,00080	0,54715	
	Intermediário	8	0,18508	0,08900	0,49655	
	Alto	5	0,11227	0,01086	0,68302	
	Muito alto	5	0,22376	0,09087	1,51572	
Grupo de Risco (WPSS)	Muito baixo	4	0,05382	0,03467	0,10769	0,138
	Baixo	17	0,07407	0,01365	0,54715	
	Intermediário	16	0,13460	0,00080	1,51572	
	Alto	6	0,10157	0,01086	0,45063	
	Muito alto	3	0,22376	0,19012	0,52668	
Dependência transfusional, evolução e óbito						
Dependência transfusional	Não	33	0,12371	0,03467	1,09429	0,762
	Sim	48	0,11909	0,00080	5,15153	
Evolução	Não	75	0,11785	0,00919	5,15153	0,156
	Sim	11	0,07938	0,00080	1,51572	

4.4.8.2 Metilação da região promotora do gene *IRF8*

A metilação do gene *IRF8* foi diferente em células da medula óssea de pacientes com SMD quando comparadas a células de medula óssea normais ($p < 0,002$) (**Tabela 27**). Entretanto foi observado que pacientes com SMD tinham uma menor frequência do gene *IRF8* metilado. (**Tabela 27**). Quanto a comparação da metilação entre os subtipos da OMS, observou-se que a maior frequência de pacientes metilados pertenciam ao grupo AREB (10/17 - 10%), RT-SMD (6/8 - 75%) e LMMC (3/3 - 100%) ($p < 0,001$) (**Tabela 27**).

Quanto a análise da metilação com as variáveis citogênicas foi observada uma associação da metilação do *IRF8* com pacientes com cariótipo desfavorável pelo critério do IPSS e R-IPSS ($p = 0,002$ e $p = 0,030$, respectivamente) (**Tabela 27**).

Quanto a citopenias, foi observado uma associação com o *IRF8* metilado com pacientes com $ANC < 800$ (13/29 - 45%) e plaquetas < 50.000 (13/23 - 57%) ($p = 0,009$ e $p = 0,005$, respectivamente) (**Tabela 27**).

De uma forma interessante, pacientes que não apresentavam sideroblastos em anel na medula óssea tiveram maior metilação do *IRF8*, do que em pacientes que não apresentavam sideroblastos ($p = 0,015$) (**Tabela 27**). Além disso, pacientes que apresentaram percentagem de blastos acima de 2% na medula óssea foram mais frequentemente metilados para o *IRF8* ($p = 0,001$) (**Tabela 27**).

Quanto a análise com grupos de risco, o *IRF8* foi mais metilado em pacientes com risco intermediário II e alto pelo critério do IPSS ($p = 0,036$) e mais frequentemente metilado em pacientes com risco alto e muito alto pelo critério do WPSS ($p = 0,019$) (**Tabela 27**).

Tabela 27. Análise qualitativa da metilação da região promotora do gene *IRF8* de acordo com as variáveis clínicas dos pacientes com SMD.

Variáveis clínicas	Classes	<i>IRF8</i>				<i>p</i> -Valor
		Não Metilado		Metilado		
		N	%	N	%	
Grupo	Controle	2	18%	9	82%	0,002
	Caso	62	68%	29	32%	
OMS	AR	9	100%	0	0%	<0,001
	ARSA	12	92%	1	8%	
	CRDM	32	78%	9	22%	
	AREBs	7	41%	10	59%	
	LMMC	0	0%	3	100%	
	RT-SMD	2	25%	6	75%	
Cariótipo						
Cariótipo Normal X	Normal	27	77%	8	23%	0,384
	Alterado	16	64%	9	36%	
Aneuploidia	Normal	27	77%	8	23%	0,086
	Alterado com aneuploidia	8	89%	1	11%	
	Aneuploide	8	50%	8	50%	
Deleção 5q	Normal	27	77%	8	23%	0,362
	Alterado com 5q-	6	75%	2	25%	
	Alterado sem 5q-	9	56%	7	44%	
-7/7q	Normal	27	77%	8	23%	0,202
	Alterado com -7/7q	2	40%	3	60%	
	Alterado sem -7/7q	13	68%	6	32%	
Grupos Citogenéticos IPSS	Favorável	31	79%	8	21%	0,002
	Intermediário	11	73%	4	27%	
	Desfavorável	0	0%	5	100%	
Grupos Citogenéticos R-IPSS	Muito favorável	2	100%	0	0%	0,030
	Favorável	31	79%	8	21%	
	Intermediário	8	62%	5	38%	
	Desfavorável	0	0%	1	100%	
	Muito desfavorável	0	0%	2	100%	
Características da BMO						
Celularidade BMO	Hipocelular	6	86%	1	14%	0,537
	Normocelular	6	67%	3	33%	
	Hipercelular	29	64%	16	36%	
Diseritropoese BMO	Ausência	15	68%	7	32%	0,543
	Presença	22	76%	7	24%	
Dismegacariopese BMO	Ausência	21	68%	10	32%	0,338
	Presença	16	80%	4	20%	
Disgranulopese BMO	Ausência	10	67%	5	33%	0,543
	Presença	27	75%	9	25%	
Micromegacariocito BMO	Ausência	31	70%	13	30%	0,899
	Presença	11	69%	5	31%	

Continuação Tabela 27. Análise qualitativa da metilação da região promotora do gene *IRF8* de acordo com as variáveis clínicas dos pacientes com SMD.

Variáveis clínicas	Classes	<i>IRF8</i>				<i>p</i> -Valor
		Não Metilado		Metilado		
		N	%	N	%	
Citopenias						
HB (R-IPSS)	≥ 10	18	69%	8	31%	0,215
	8-<10	20	80%	5	20%	
	<8	23	59%	16	41%	
ANC (R-IPSS)	≥800	45	74%	16	26%	0,009
	<800	16	55%	13	45%	
Plaquetas (R-IPSS)	≥100	34	83%	7	17%	0,005
	50-<100	17	65%	9	35%	
	<50	10	43%	13	57%	
Número de Citopenias (IPSS)	0	8	67%	4	33%	0,154
	1	23	82%	5	18%	
	2	18	67%	9	33%	
	3	12	52%	11	48%	
Número de Citopenias (R-IPSS)	0	10	71%	4	29%	0,158
	1	28	80%	7	20%	
	2	13	59%	9	41%	
	3	10	53%	9	47%	
Sideroblastos em anel						
Sideroblastos em anel	Ausência	32	57%	24	43%	0,015
	Presença	22	85%	4	15%	
Porcentagem de sideroblastos em anel	0	32	57%	24	43%	0,049
	1-14%	5	83%	1	17%	
	Acima de 15%	17	85%	3	15%	
Blastos MO						
Porcentagem de blastos (R-IPSS)	Menor Igual a 2	50	81%	12	19%	0,001
	>2% - <5%	4	44%	5	56%	
	5%-10%	3	27%	8	73%	
	>10%	4	50%	4	50%	
Classificação de Risco						
Grupo de Risco (IPSS)	Baixo	15	94%	1	6%	0,036
	Intermediário I	22	73%	8	27%	
	Intermediário II	3	50%	3	50%	
	Alto	1	33%	2	67%	
Grupos de Risco (R-IPSS)	Muito baixo	9	90%	1	10%	0,057
	Baixo	25	81%	6	19%	
	Intermediário	3	43%	4	57%	
	Alto	1	33%	2	67%	
Grupo de Risco (WPSS)	Muito alto	3	60%	2	40%	0,019
	Muito baixo	3	100%	0	0%	
	Baixo	22	96%	1	4%	
	Intermediário	13	68%	6	32%	
Evolução	Alto	3	50%	3	50%	0,459
	Muito alto	1	50%	1	50%	
	Muito baixo	3	100%	0	0%	
Dependência transfusional, evolução e óbito						
Dependência transfusional	Não	30	75%	10	25%	0,292
	Sim	29	64%	16	36%	
Evolução	Não	57	70%	25	30%	0,459
	Sim	5	56%	4	44%	

4.4.9 Gene *IRF9*

4.4.9.1 Expressão do gene *IRF9*

O gene *IRF9* foi mais expresso em células de pacientes com SMD do que em células de indivíduos normais ($p=0,016$) (**Tabela 28**). Outra associação foi observada em pacientes que possuíam alterações cromossômicas sem envolver o cromossomo 5, nesses pacientes o nível de expressão do *IRF9* foi maior quando comparadas a pacientes com cariotipo normal e com deleção do cromossomo 5 ($p=0,039$) (**Tabela 28**).

4.4.9.2 Metilação da região promotora do gene *IRF9*

A análise de metilação não foi realizada para o gene *IRF9*. Esse gene não apresenta ilhas CpGs definidas da região promotora do gene. Na tentativa de avaliar influência da metilação de CGs do *IRF9* na expressão do gene realizamos alguns testes com alguns iniciadores, mas não obtivemos sucesso. A sequência desse gene se interpõe com sequência de outros genes, sendo assim, ocasionando ligações inespecíficas com os iniciadores avaliados. Portanto, estudos que avaliem a regulação da expressão do *IRF9* precisam ser realizados em SMD.

Tabela 28. Análise expressão do gene *IRF9* de acordo com as variáveis clínicas dos pacientes com SMD.

Variáveis clínicas	Classes	<i>IRF9</i>			p-Valor	
		N	Mediana	Mínimo		Máximo
Grupo	Controle	11	0,02711	0,01132	0,07966	0,016
	Caso	89	0,05059	0,00028	0,62633	
OMS	AR	11	0,04870	0,00028	0,32534	0,611
	ARSA	12	0,04036	0,01478	0,10013	
	CRDM	38	0,06038	0,01423	0,62633	
	AREBs	16	0,04913	0,01728	0,28519	
	LMMC	3	0,04435	0,02012	0,06228	
	RT-SMD	7	0,03384	0,02778	0,10584	
Cariótipo						
Cariótipo Normal X Alterado	Normal	31	0,03928	0,00028	0,26152	0,149
	Alterado	22	0,06133	0,01423	0,36476	
Aneuploidia	Normal	31	0,03928	0,00028	0,26152	0,352
	Alterado com aneuploidia	8	0,05626	0,01423	0,28519	
	Aneuploide	14	0,06133	0,02005	0,36476	
Deleção 5q	Normal	31	0,03928	0,00028	0,26152	0,039
	Alterado com 5q-	8	0,03931	0,02005	0,09440	
	Alterado sem 5q-	13	0,08717	0,01423	0,36476	
-7/7q	Normal	31	0,03928	0,00028	0,26152	0,194
	Alterado com -7/7q	5	0,06584	0,03504	0,14260	
	Alterado sem -7/7q	16	0,05644	0,01423	0,36476	
Grupos Citogenéticos IPSS	Favorável	36	0,04198	0,00028	0,26152	0,396
	Intermediário	12	0,04964	0,01423	0,36476	
	Desfavorável	5	0,08717	0,02956	0,14260	
Grupos Citogenéticos R-IPSS	Muito favorável	1	0,10013	0,10013	0,10013	0,08
	Favorável	36	0,04198	0,00028	0,26152	
	Intermediário	9	0,06037	0,02846	0,36476	
	Desfavorável	1	0,02956	0,02956	0,02956	
	Muito desfavorável	3	0,09087	0,08717	0,14260	
Características da BMO						
Celularidade BMO	Hipo celular	8	0,08584	0,03504	0,32534	0,172
	Normo celular	8	0,06951	0,02005	0,62633	
	Hiper celular	45	0,05059	0,01478	0,36476	
Diseritropoese BMO	Ausência	25	0,05237	0,01478	0,26152	0,769
	Presença	27	0,06228	0,01728	0,62633	
Dismegacariopese BMO	Ausência	35	0,05237	0,01478	0,62633	0,755
	Presença	17	0,06584	0,02005	0,28519	
Disgranulopese BMO	Ausência	15	0,04688	0,02005	0,14260	0,262
	Presença	37	0,06228	0,01478	0,62633	
Micromegacariocito BMO	Ausência	48	0,05103	0,00028	0,62633	0,867
	Presença	13	0,06816	0,01478	0,21539	

Continuação Tabela 28. Análise expressão do gene *IRF9* de acordo com as variáveis clínicas dos pacientes com SMD.

Variáveis clínicas	Classes	N	<i>IRF9</i>			p-Valor
			Mediana	Mínimo	Máximo	
Citopenias						
HB (R-IPSS)	>= 10	18	0,03276	0,02005	0,09773	0,140
	8-<10	28	0,06241	0,02005	0,62633	
	<8	40	0,05103	0,00028	0,36476	
ANC (R-IPSS)	>=800	56	0,04663	0,00028	0,32534	0,081
	<800	30	0,06310	0,01728	0,62633	
Plaquetas (R-IPSS)	>=100	41	0,04836	0,00028	0,21539	0,411
	50-<100	23	0,04435	0,02005	0,36476	
	<50	22	0,06090	0,01423	0,62633	
Número de Citopenias (IPSS)	0	10	0,03953	0,02264	0,07179	0,153
	1	26	0,04523	0,00028	0,32534	
	2	25	0,05292	0,01423	0,21539	
	3	25	0,06037	0,01728	0,62633	
Número de Citopenias (R-IPSS)	0	10	0,03953	0,02264	0,07179	0,266
	1	34	0,06017	0,00028	0,13870	
	2	22	0,04704	0,02005	0,32534	
	3	20	0,06379	0,01728	0,62633	
Sideroblastos em anel						
Sideroblastos em anel	Ausência	56	0,04853	0,01728	0,36476	0,597
	Presença	26	0,04561	0,00028	0,62633	
Porcentagem de sideroblastos em anel	0	56	0,04853	0,01728	0,36476	0,196
	1-14%	6	0,06479	0,02005	0,62633	
	Acima de 15%	20	0,03716	0,00028	0,28519	
Blastos MO						
Porcentagem de blastos (R-IPSS)	Menor Igual a 2	59	0,04836	0,00028	0,62633	0,789
	>2% - <5%	10	0,06881	0,02005	0,26152	
	5%-10%	9	0,05059	0,02592	0,28519	
	>10%	8	0,04814	0,01728	0,14260	
Classificação de Risco						
Grupos de Risco (R-IPSS)	Muito baixo	6	0,04583	0,02264	0,10013	0,376
	Baixo	26	0,04206	0,00028	0,13870	
	Intermediário	8	0,04389	0,02012	0,36476	
	Alto	5	0,09087	0,02956	0,28519	
	Muito alto	5	0,06037	0,03071	0,14260	
Grupo de Risco (WPSS)	Muito baixo	4	0,03690	0,02264	0,06381	0,177
	Baixo	17	0,03928	0,00028	0,10224	
	Intermediário	16	0,04351	0,02005	0,26152	
	Alto	6	0,08902	0,02956	0,36476	
	Muito alto	3	0,06037	0,05059	0,14260	
Dependência transfusional, evolução e óbito						
Dependência transfusional	Não	33	0,04870	0,02012	0,32534	0,821
	Sim	48	0,05103	0,00028	0,62633	
Evolução	Não	75	0,05933	0,00028	0,62633	0,684
	Sim	11	0,04109	0,01728	0,10083	

4.4.10 Análise da expressão dos genes *IRFs* no seguimento de pacientes com SMD

A partir da avaliação do seguimento dos pacientes com SMD foi observado que os níveis de expressão do gene *IRF2* foi menor nas amostras de seguimento quando comparadas a amostras ao diagnóstico ($p=0.046$) (Tabela 29, Figura 11). Associando aos dados de metilação descritos anteriormente, observamos que os níveis de metilação do *IRF2* foram maiores nas amostras de seguimentos quando comparadas a amostras ao diagnóstico. É provável que a expressão do gene *IRF2* tenha suprimida durante a evolução da doença nesses pacientes.

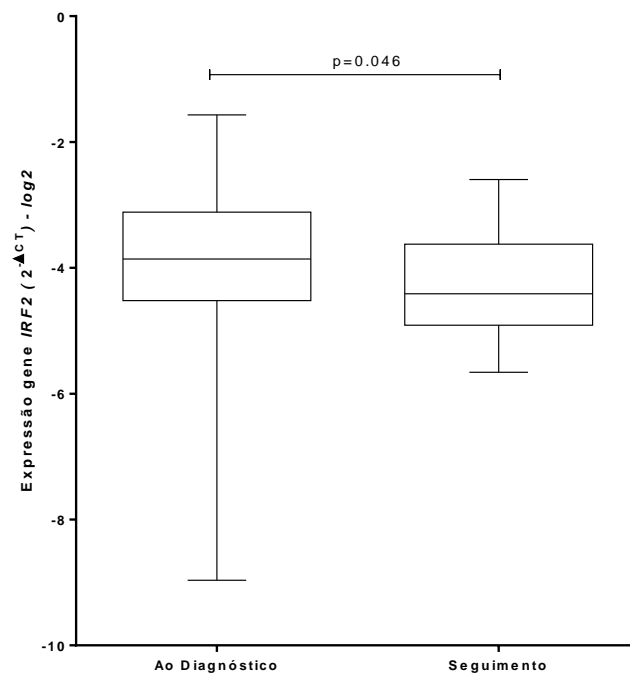


Figura 11. Expressão do gene *IRF2* em amostras de pacientes com SMD ao diagnóstico e ao seguimento.

Tabela 29. Nível de expressão dos genes *IRF*s nos pacientes ao diagnóstico e ao seguimento dos pacientes com síndrome mielodisplásica.

Amostras	Expressão gênica <i>IRF1</i> (2- Δ Ct)				Expressão gênica <i>IRF2</i> (2- Δ Ct)				Expressão gênica <i>IRF3</i> (2- Δ Ct)				Expressão gênica <i>IRF4</i> (2- Δ Ct)				Expressão gênica <i>IRF5</i> (2- Δ Ct)			
	Mediana	Mínimo	Máximo	<i>P</i> Valor	Mediana	Mínimo	Máximo	<i>P</i> Valor	Mediana	Mínimo	Máximo	<i>p</i> Valor	Mediana	Mínimo	Máximo	<i>P</i> Valor	Mediana	Mínimo	Máximo	<i>P</i> Valor
Ao diagnóstico	0,58439	0,12718	2,45377	p=0.075	0,06887	0,00200	0,33681	p=0.046	0,06382	0,00002	0,27168	p=0.0152	0,02134	0,00068	0,32874	p=0.463	0,02328	0,00379	0,15822	p=0.972
Seguimento	0,32650	0,09740	0,93952		0,04698	0,01978	0,16551		0,05923	0,01606	0,23651		0,00867	0,00138	0,38555		0,01330	0,00347	0,04053	

Continuação Tabela 29. Nível de expressão dos genes *IRF*s nos pacientes ao diagnóstico e ao seguimento dos pacientes com síndrome mielodisplásica.

Amostras	Expressão gênica <i>IRF6</i> (2- Δ Ct)				Expressão gênica <i>IRF7</i> (2- Δ Ct)				Expressão gênica <i>IRF8</i> (2- Δ Ct)				Expressão gênica <i>IRF9</i> (2- Δ Ct)			
	Mediana	Mínimo	Máximo	<i>P</i> Valor	Mediana	Mínimo	Máximo	<i>P</i> Valor	Mediana	Mínimo	Máximo	<i>P</i> Valor	Mediana	Mínimo	Máximo	<i>p</i> Valor
Ao diagnóstico	0,00056	0,00000	0,00692	p=0.972	0,08808	0,00678	2,96905	p=0.972	0,11424	0,00080	5,15153	p=0.972	0,04930	0,00028	0,62633	p=0.701
Seguimento	0,00064	0,00004	114104,80340		0,07936	0,01499	0,28126		0,06967	0,01584	0,37501		0,04239	0,01618	0,21242	

4.4.11 Regressão logística para risco de transformação para LMA

O risco de transformação para LMA, foi determinada em relação a comparação das variáveis clínicas e moleculares (expressão gênica e metilação) utilizando a regressão lógica para essa análise.

Analises univariadas

Variáveis Clínicas

Para a análise univariada foi utilizado o teste de exato de Fisher. Das variáveis clínicas analisadas, aquelas que estavam relacionadas a evolução para LMA foram sexo e fumo ($p=0.009$ e $p=0.037$, respectivamente) (**Tabela 30**). Os pacientes do sexo masculino evoluíram mais para LMA do que pacientes do sexo feminino e pacientes que fumaram em alguma fase da vida evoluíram mais do que aqueles que não fumaram (**Tabela 30**).

Variáveis moleculares

A análise das variáveis moleculares mostrou que os genes *IRF5* e *IRF7* estavam mais relacionadas com evolução para LMA ($p= 0.024$ e $p=0.032$, respectivamente) (**Tabela 31**). Pacientes com o nível de expressão acima do valor 0.00232 (*cutoff*) evoluíram mais do que pacientes que possuíam expressão do *IRF5* abaixo desse valor. Assim como, pacientes com a expressão do *IRF7* acima do valor do *cutoff* (0.00604) também evoluíram mais do que aquelas que apresentaram expressão abaixo desse valor (**Tabela 31**).

Análise multivariada

A partir destes dados foi realizada a regressão logística para avaliar as variáveis relacionadas ao risco de transformação para LMA (*OD ration*). Para essa análise foi considerado as variáveis com $p < 0.2$ na análise univariada. As variáveis clínicas e moleculares selecionadas foram: sexo, fumo, deleção 5q, ANC, percentagem de blastos, classes da OMS, formas da SMD, mRNA *IRF5*, mRNA *IRF7*, metilação do *IRF6* e metilação do *IRF7*. Porém a expressão genica do gene *IRF5* se sobrepôs a todas outras variáveis analisadas.

Pacientes com a superexpressão (≥ 0.0232) do *IRF5* tem 5.4 mais chances de evoluir para LMA do que pacientes com expressão mais baixa ($p=0.000$; EXP(B)=5.429; IC95%=1.098-26.829). Portanto, no presente estudo, pacientes que tinham a expressão do gene *IRF5* acima do valor de ≥ 0.0232 apresentavam pior prognóstico estando relacionado a um maior risco de evolução para LMA.

Tabela 30. Análise univariada das variáveis clínicas relacionada a evolução para LMA.

Variáveis	Classes	Evolução para LMA		p valor
		Não (N)	Sim (N)	
Sexo	Feminino	55	2	p=0.009
	Masculino	49	12	
Idade	<60	27	3	p=0.763
	≥60	77	11	
Origem	Urbana	61	9	p=0.764
	Rural	37	4	
Fumo	Sim	22	0	p=0.037
	Não	9	3	
Álcool	Sim	24	0	p=0.052
	Não	22	5	
Fibrose	Presença	11	1	p=0.946
	Ausência	24	2	
ALIPS	Presença	46	7	p=0.877
	Ausência	15	2	
Diseritropoese	Presença	27	4	p=0.941
	Ausência	32	5	
Dismegacariopoese	Presença	39	6	p=0.973
	Ausência	20	3	
Disgranulopoese	Presença	16	2	p=0.756
	Ausência	43	7	
Micromegacariocito	Presença	52	8	p=0.722
	Ausência	20	2	
HB	≤10	31	1	p=0.202
	8-<10	28	4	
	>8	44	9	
ANC	≥800	71	7	p=0.226
	<800	32	7	
PLAQ	≥100	48	6	p=0.763
	50-<100	29	3	
	<50	26	5	
N Citopenias IPSS	0	14	0	p=0.313
	1	33	3	
	2	28	6	
	3	28	5	
N Citopenias R-IPSS	0	16	1	p=0.281
	1	42	3	
	2	24	5	
Sideroblastos em Anel	3	21	5	p=0.215
	Ausência	66	11	
	Presença	29	2	
Porcentagem de Blastos	≤2%	77	8	p=0.141
	>2%-<5%	10	1	
	5%-10%	10	2	
	>10%	6	3	
Cariótipo normal x alterado	Normal	44	4	p=0.725
	Alterado	32	5	
Aneuploidia	Normal	44	4	p=0.161
	Alterado sem aneuploidia	17	4	
	Aneuploidia	20	1	
Deleção 5q	Normal	44	4	p=0.097
	Alterado com 5q-	15	4	
	Alterado com 5q-	21	1	
Monossomia 7/del7q	Normal	44	4	p=0.524
	Alterado com 7q-	9	2	
	Alterado com 7q-	27	3	
CARIOTIPO IPSS	Favorável	45	7	p=0.522
	Intermediário	16	2	
	Desfavorável	10	0	
	Muito favorável	2	0	

Continuação Tabela 30. Análise univariada das variáveis clínicas relacionada a evolução para LMA.

Variáveis	Classes	Evolução para LMA		p valor
		Não (N)	Sim (N)	
Cariótipo R-IPSS	Favorável	45	8	p=0.631
	Intermediário	16	1	
	Desfavorável	2	0	
	Muito desfavorável	4	0	
OMS	AR	13	0	p=0.078
	ARSA	14	0	
	CRDM	51	8	
	AREB	15	4	
	LMMC	3	2	
	RT-SMD	8	0	
Formas SMD	Iniciais	79	8	p=0.109
	Avançadas	15	4	
Grupo Risco IPSS	Baixo	19	2	p=0.883
	Intermediário I	37	6	
	Intermediário II	7	1	
	Alto	4	0	
Grupo Risco R-IPSS	Muito baixo	2	0	p=0.799
	Baixo	45	8	
	Intermediário	16	1	
	Alto	2	0	
	Muito alto	4	0	
Grupo Risco WPSS	Muito baixo	6	0	p=0.506
	Baixo	24	1	
	Intermediário	21	4	
	Alto	11	2	
	Muito alto	3	0	
Dependência transfusional	Não	44	5	p=0.808
	Sim	53	7	
Resposta ao tratamento com eritropoetina	Com resposta	17	0	p=0.143
	Sem resposta	25	5	
Resposta ao tratamento com hipometilante	Com resposta	4	1	p=0.424
	Sem resposta	4	3	

Tabela 31. Análise univariada das variáveis moleculares relacionada a evolução para LMA.

Variáveis	Classes	Evolução para LMA		p Valor
		Não (N)	Sim (N)	
Metilação IRFS				
<i>IRF1</i>	Não Metilado	42	6	0.378
	Metilado	40	3	
<i>IRF2</i>	Não Metilado	68	6	0.235
	Metilado	14	3	
<i>IRF3</i>	Não Metilado	43	4	0.649
	Metilado	39	5	
<i>IRF5</i>	Não Metilado	45	3	0.219
	Metilado	37	6	
<i>IRF6</i>	Não Metilado	39	2	0.147
	Metilado	43	7	
<i>IRF7</i>	Não Metilado	64	9	0.117
	Metilado	18	0	
<i>IRF8</i>	Não Metilado	57	5	0.394
	Metilado	25	4	
Expressão IRFs				
<i>IRF1</i>	Menos expresso	37	5	0.778
	Mais expresso	37	6	
<i>IRF2</i>	Menos expresso	9	1	0.768
	Mais expresso	65	10	
<i>IRF3</i>	Menos expresso	17	2	0.738
	Mais expresso	58	9	
<i>IRF4</i>	Menos expresso	40	7	0.551
	Mais expresso	34	4	
<i>IRF5</i>	Menos expresso	41	2	0.024
	Mais expresso	34	9	
<i>IRF6</i>	Menos expresso	36	6	0.685
	Mais expresso	39	5	
<i>IRF7</i>	Menos expresso	23	0	0.032
	Mais expresso	52	11	
<i>IRF8</i>	Menos expresso	36	7	0.333
	Mais expresso	39	4	
<i>IRF9</i>	Menos expresso	12	3	0.358
	Mais expresso	63	8	

4.4.12 Análise de sobrevida em relação as características clínicas, perfil de metilação e expressão dos genes *IRF's*

Análise univariada – Kaplan Meier

A análise de sobrevida global (SG) foi determinada em relação a comparação das variáveis clínicas e moleculares (expressão gênica e metilação), considerando o evento óbito por qualquer causa. O tempo de seguimento do paciente foi calculado da data de diagnóstico até a data do óbito ou até a data do último atendimento. A probabilidade de sobrevida foi determinada em 6, 12 e 24 meses (**Tabela 32**). Pacientes que fizeram uso de agentes modificadores (lenalidomida, hipometilantes, quimioterapia e TMO) foram excluídos dessa análise.

Variáveis Epidemiológicas e Clínicas

Em relação as variáveis epidemiológicas, a sobrevida foi diferente para sexo, origem e álcool (**Tabela 32**).

Para as variáveis clínicas relacionadas as características obtidas pela biopsia de medula óssea dos pacientes, não houve diferença de sobrevida entre os grupos analisados (**Tabela 32**). Para as variáveis relacionadas a citopenias e percentagem de blastos, todas foram significantes (**Tabela 32**).

A despeito de variáveis relacionadas a cariótipo, a população avaliada apresentou diferença de sobrevida entre os grupos relacionados a cariótipo normal e alterado, 5q-, 7q-/7 e cariótipo classificado de acordo com os critérios do R-IPSS. Pacientes com cariótipo alterado tiveram estimativa de sobrevida global de 36.4% aos 24 meses, enquanto indivíduos para cariótipo normal tinha 58.4% para o mesmo período. Na

comparação de pacientes com cariótipo normal, cariótipo alterado sem deleção do cromossomo 5 e cariótipo alterado com deleção do cromossomo 5, os indivíduos que tinham cariótipo alterado sem deleção do cromossomo 5 tiveram menor sobrevida. Já pacientes com deleção/monossomia do cromossomo 7 apresentaram a pior sobrevida (**Tabela 32**). Podemos destacar que pacientes com cariótipo normal tinham 90% estimativa de sobrevida global, enquanto pacientes com cariótipo muito desfavorável, classificados de acordo com a classificação do R-IPSS, tiveram apenas 25% de estimativa em seis meses de seguimento (**Tabela 32**).

As análises de sobrevida dos grupos estabelecidos pela OMS. Enquanto pacientes dos subtipos AR, ARSA e CRDM tinham cerca de 80 a 100% de estimativa de sobrevida global aos seis meses após o diagnóstico, pacientes do subtipo AREB tinham somente 36,4% de estimativa de sobrevida global nesse mesmo período (**Tabela 32**). Para as classificações de risco, IPSS, R-IPSS e WPSS, os grupos de alto risco apresentaram pior sobrevida como era esperado, 50%, 28% e 33% de estimativa de sobrevida global, respectivamente já nos seis meses iniciais.

Quanto a análise de sobrevida relacionada a resposta a tratamento e evolução, pacientes dependentes transfusionais tinham somente 33% de probabilidade de sobrevida, frente a 84.7% estimativa dos pacientes não dependentes, em 24 meses (**Tabela 32**). Com relação resposta a eritropoietina - EPO (EPREX®), os pacientes com resposta tinham 100% de estimativa de sobrevida aos 24 meses, enquanto os que não respondiam a EPO tinham somente 48.5% de chances de sobrevida (**Figura 32**).

Tabela 32. Estimativas de sobrevida global em 6, 12 e 24 meses em relação a variáveis epidemiológicas e clínicas.

Variáveis	Classes	Casos (N)	Eventos (óbitos) (N)	Probabilidade de sobrevida (%)			Log Rank
				6 meses	12 meses	24 meses	
EPIDEMIOLOGICAS							
SEXO	Feminino	36	13	83.2	80.2	67.2	p=0.033
	Masculino	47	26	91.4	76.0	55.0	
IDADE	≤60	24	12	82.9	63.2	33.8	p=0.733
	>60-70	24	13	82.9	55.7	55.7	
	>70-80	19	9	62.3	56.7	48.4	
ORIGEM	Urbana	49	18	91.7	82.7	70.0	p=0.004
	Rural	31	20	80.6	64.2	36.7	
FUMO	Não	12	2	82.5	82.5	82.5	p=0.201
ALCOOL	Sim	9	5	40.0	40.0	40.0	p=0.017
	Não	15	4	79.4	63.6	63.6	
	Sim	20	13	70.0	47.4	47.4	
	Não						
CARACTERÍSTICAS DA MEDULA ÓSSEA							
CELULARIDADE	Hipocecular	9	3	88.9	77.8	58.3	p=0.592
	Normocelular	9	5	88.9	76.2	40.6	
	Hipercecular	39	19	86.8	64.7	52.6	
FIBROSE	Ausência	8	5	87.5	75.0	75.9	P=0.254
	Presença	20	6	89.4	67.1	67.1	
ALIPS	Ausência	36	17	85.9	68.7	48.8	p=0.608
	Presença	11	6	80.8	69.3	51.9	
DISETROPOISES BMO	Ausência	22	8	76.6	65.2	65.2	p=0.093
	Presença	24	15	78.6	52.4	28.8	
DISMEGACARIOPOISE BMO	Ausência	30	16	80.0	60.0	43.8	p=0.737
	Presença	16	7	79.3	38.2	38.2	
DISGRANULOPOIESE BMO	Ausência	10	4	77.8	77.8	77.8	p=0.777
	Presença	36	19	86.0	68.8	45.2	
MICROMEGA BMO	Ausência	39	20	84.6	71.8	50.5	p=0.775
	Presença	16	7	77.9	44.5	44.5	
CITOPENIAS, SIDEROBLASTOS E BLASTOS							
HB	≤10	25	6	91.2	75.2	62.7	p=0.000
	8-<10	25	13	79.8	62.1	31.9	
	>8	32	20	81.3	68.1	35.4	
ANC	≥800	52	22	88.5	80.6	67.9	p=0.015
	<800	30	17	75.6	51.3	27.4	
PLAQ	≥100	36	10	97.1	83.9	72.6	p=0.000
	50-<100	23	12	77.6	58.3	33.3	
	<50	23	17	73.9	47.8	26.2	
N CITOPENIA IPSS	0	10	1	90.0	90.0	90.0	p=0.000
	1	25	10	86.7	70.0	32.7	
	2	25	10	80.0	70.3	44.2	
	3	22	18	57.4	28.7	12.8	
N CITOPENIA R-IPSS	0	12	2	91.7	91.7	91.7	p=0.000
	1	29	10	93.0	76.4	71.9	
	2	22	12	72.4	66.9	55.2	
	3	19	15	61.3	33.4	22.3	
SIDEROBLASTOS EM ANEL	0	55	26	89.1	81.7	66.2	p=0.057
	1-14%	8	6	62.5	31.3		
BLASTOS	≥15	14	4	92.3	75.5	62.9	p=0.000
	≤2%	51	21	89.3	77.5	68.2	
	>2%-<5%	8	5	75.0	62.5	33.3	
	5%-10%	10	6	57.1	42.9	42.9	
	>10%	7	7	14.3	0.0	0.0	

Continuação Tabela 32. Estimativas de sobrevida global em 6, 12 e 24 meses em relação a variáveis epidemiológicas e clínicas.

Variáveis	Classes	Casos (N)	Eventos (óbitos) (N)	Probabilidade de sobrevida (%)			Log Rank
				6 meses	12 meses	24 meses	
CARIÓTIPO							
NORMAL E ALTERADO	Normal	30	10	83.1	71.4	58.4	p=0.049
	Alterado	28	17	82.0	59.4	36.4	
ANEUPLOIDIA	Normal	30	10	83.1	71.4	58.4	p=0.142
	Alterado sem aneuploidia	11	7	80.0	70.0	45.0	
5q	Aneuploide	17	10	70.6	39.7	39.7	p=0.047
	Normal	30	10	83.1	71.4	58.4	
7q	Alterado sem 5q-	13	8	68.4	32.1	32.1	p=0.023
	Alterado com 5q-	14	8	85.7	64.3	56.3	
	Normal	30	10	83.1	71.4	58.4	
CARIOTIPO IPSS	Alterado sem 7q-	20	10	70.0	64.6	64.6	p=0.023
	Alterado com 7q-	7	6	53.6	53.6	53.6	
	Favorável	35	14	88.6	76.5	65.4	
CARIOTIPO R-IPSS	Intermediário	14	7	78.6	63.5	54.4	p=0.118
	Desfavorável	8	5	46.9	31.3	31.3	
CARIOTIPO R-IPSS	Favorável	37	17	91.9	77.8	65.6	p=0.001
	Intermediário	12	6	73.3	45.8	45.8	
	Desfavorável	2	0	-	-	-	
Muito desfavorável	Muito desfavorável	4	4	25.0	0.0	0.0	
CLASSIFICAÇÃO DA SMD							
WHO_CATEGORY	AR	9	1	100	85.7	85.7	P=0.000
	ARSA	6	1	83.3	83.3	83.3	
	CRDM	44	23	90.9	74.8	58.7	
	AREB	15	12	36.4	36.4	21.8	
FORMAS_SMD	Iniciais	60	26	91.7	75.9	64.1	p=0.000
	Avançadas	13	9	50.8	50,8	30.5	
GRUPOS DE RISCO							
GRUPO RISCO IPSS1997	Muito baixo	16	6	93.8	80.4	63.3	p=0.000
	Baixo	28	13	85.4	69.8	61.3	
	Intermediário I	6	6	16.7	0.0	0.0	
	Intermediário II	4	2	50.0	50.0	50.0	
GRUPO RISCO IPSS2012	Muito baixo	11	3	90.9	90.9	80.8	p=0.000
	Baixo	25	9	91.8	62.6	50.1	
	Intermediário	7	6	57.1	42.9	42.9	
	Alto	5	3	40.0	40.0	40.0	
	Muito alto	7	6	28.6	14.3	14.3	
GRUPO RISCO WPSS	Muito baixo	4	0	100	100	100	p=0.010
	Baixo	16	5	100	86.7	78.8	
	Intermediário	17	10	88.2	61.6	23.1	
	Alto	11	8	63.6	45.5	27.3	
	Muito alto	3	2	33.3	33.3	33.3	
TRATAMENTO E EVOLUÇÃO							
DEPENDENCIA TRANSFUSIONAL	Não	35	10	97.1	91.3	84.7	p=0.000
	Sim	42	29	68.9	50.9	33.0	
TRATAMENTO EPREX	Sem resposta	20	12	85.0	70.0	48.5	p=0.005
	Com resposta	11	1	100	100	100	
TRATAMENTO HIPOMETILANTE	Sem resposta						
	Com resposta						
EVOLUÇÃO LMA	Não	70	28	85.6	76.5	66.1	p=0.000
	Sim	13	11	67.7	10.2	0.0	

Variáveis Moleculares

Em relação a metilação da região promotora dos genes *IRFs*, a hipermetilação do gene *IRF2* está associada a piores estimativas de sobrevida global (36,9%, IC 95%: 11.077% - 39.616%) quando comparado a pacientes não metilados (63.6%, IC 95%: 38.766%-5) em 24 meses (**Tabela 33 e Figura 12**), portanto sendo a hipermetilação do gene *IRF2* associado a pior sobrevida em SMD.

A respeito da expressão gênica dos *IRFs*, o gene *IRF5* apresentou também uma associação com pior sobrevida em SMD ($p=0.050$) (**Tabela 333**). Quando o gene está com um perfil mais expresso (valores de expressão acima do *cutoff* - ≥ 0.0232), estes pacientes tinham 57.6% de estimativa sobrevida global, enquanto os pacientes com valores de expressão < 0.0232 tinham uma sobrevida mais longa (**Figura 13**).

Tabela 33. Estimativas de sobrevida global em 6, 12 e 24 meses em relação a variáveis moleculares, expressão gênica e metilação da região promotora dos *IRFs* de células de medula total de pacientes com SMD.

Variáveis	Classes	Casos (N)	Eventos (óbitos) (N)	Probabilidade de sobrevida (%)			Classes
				6 meses	12 meses	24 meses	
METILAÇÃO							
<i>IRFS</i>							
<i>IRF1</i>	Não metilado	30	13	90.0	72.2	60.3	p=0.507
	Metilado	32	15	71.1	71.1	54.9	
<i>IRF2</i>	Não metilado	49	20	87.7	78.7	63.6	p=0.042
	Metilado	13	8	53.8	46.2	36.9	
<i>IRF3</i>	Não metilado	30	12	86.7	79.9	68.5	p=0.217
	Metilado	32	16	74.5	64.0	52.2	
<i>IRF5</i>	Não metilado	29	10	78.7	78.7	69.4	p=0.179
	Metilado	33	18	81.8	66.1	48.7	
<i>IRF6</i>	Não metilado	29	11	86.7	78.9	66.1	p=0.135
	Metilado	33	17	75.2	65.2	49.9	
<i>IRF7</i>	Não metilado	53	23	77.0	73.0	60.9	p=0.882
	Metilado	9	5	100	66.7	44.4	
<i>IRF8</i>	Não metilado	43	18	86.0	73.9	62.5	p=0.248
	Metilado	19	10	66.6	66.6	44.4	
EXPRESSÃO GÊNICA DOS <i>IRFS</i>							
<i>IRF1</i>	Menos expresso	27	11	74.1	61.6	56.9	p=0.570
	Mais expresso	31	17	90.1	76.1	40.0	
<i>IRF2</i>	Menos expresso	7	3	85.7	71.4	71.4	p=0.703
	Mais expresso	51	25	82.1	69.3	57.6	
<i>IRF3</i>	Menos expresso	11	8	81.8	72.7	43.6	p=0.173
	Mais expresso	48	20	83.0	69.2	64.1	
<i>IRF4</i>	Menos expresso	33	18	75.8	66.3	49.7	p=0.350
	Mais expresso	25	10	91.5	74.1	74.1	
<i>IRF5</i>	Menos expresso	29	11	96.4	85.4	72.9	p=0.050
	Mais expresso	30	17	69.7	57.4	46.9	
<i>IRF6</i>	Menos expresso	33	17	75.8	69.6	58.8	p=0.429
	Mais expresso	26	11	92.1	70.5	61.1	
<i>IRF7</i>	Menos expresso	17	5	94.1	82.4	64.7	p=0.064
	Mais expresso	42	23	78.0	64.9	56.1	
<i>IRF8</i>	Menos expresso	29	13	89.4	74.3	54.2	p=0.642
	Mais expresso	30	15	76.5	66.1	66.1	
<i>IRF9</i>	Menos expresso	13	4	76.2	76.2	63.5	p=0.455
	Mais expresso	46	24	84.7	71.1	58.6	

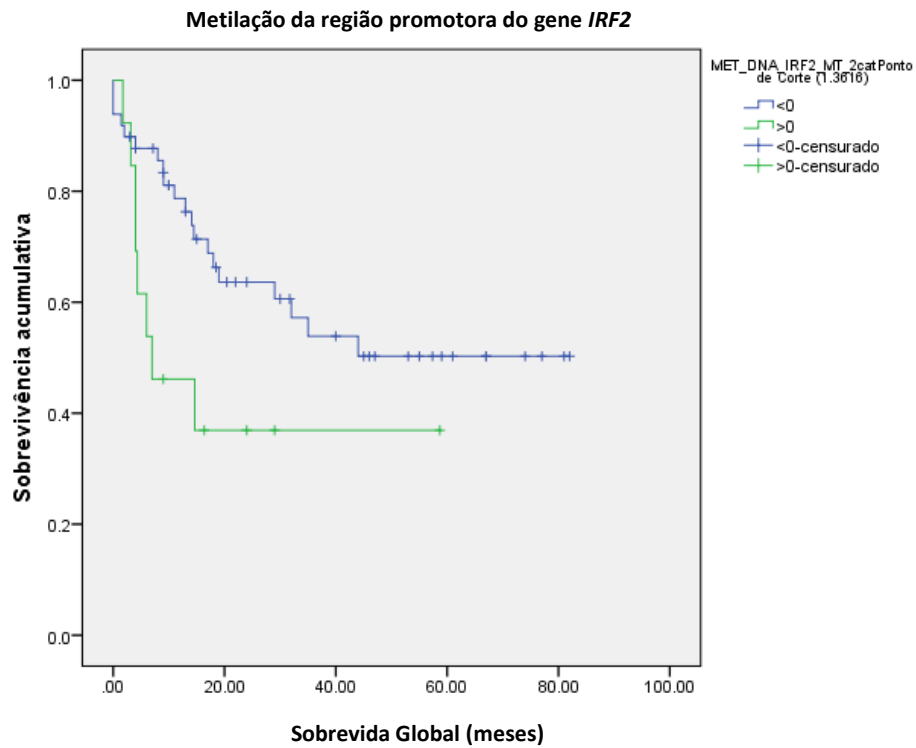


Figura 12. Análise de sobrevida global de acordo com variáveis moleculares, metilação da região promotora dos *IRF*s, de células de medula total de pacientes com SMD. Na curva de Kaplan Meier pacientes com hipermetilação do gene *IRF2* (verde) e a de pacientes não metilados (azul). Pacientes com SMD com hipermetilação do gene *IRF2* apresentam pior sobrevida $p=0.042$.

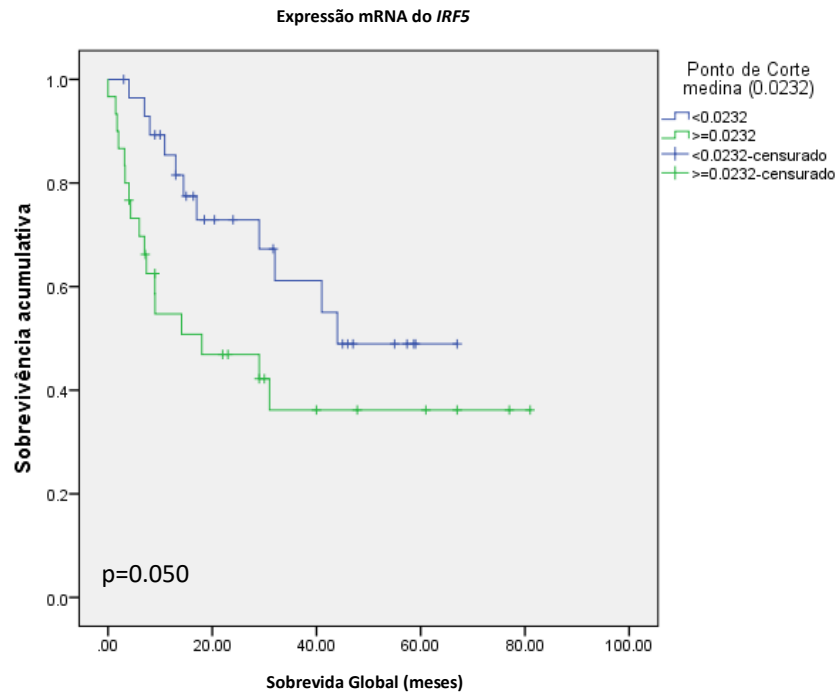


Figura 13. Análise de sobrevida global de acordo com variáveis moleculares, expressão do mRNA dos *IRFs* de células de medula total de pacientes com SMD. Curva de Kaplan Meier de pacientes com baixa e super expressão dos do mRNA do *IRF5*, a superexpressão do gene *IRF5* está associada a pior sobrevida (curva verde) (B) de pacientes com baixa e super expressão dos do mRNA do *IRF5*.

4.4.13 Regressão múltipla de COX para análise de sobrevida global

A partir dessas análises foi realizada uma regressão de COX múltipla considerando as variáveis com $p < 0.2$ na análise univariada. As variáveis selecionadas para a regressão de COX foram: sexo; origem, álcool, cariótipo normal e alterado, cariótipo 5q, cariótipo 7q, grupos citogenéticos R-IPSS, níveis de hemoglobina, ANC, número absoluto de plaquetas, número de citopenias pelo IPSS, número de citopenias pelo R-, percentagem de blastos, grupos de risco IPPS, R-IPSS e WPSS, classes da OMS, formas da SMD, dependência transfusional, reposta a eritropetina, evolução para LMA. mRNA *IRF3*, mRNA *IRF5*, mRNA *IRF7*, metilação *IRF2*, metilação do *IRF6*. As covariáveis que tiveram efeitos para o modelo de COX estão representados na Tabela XX.

A partir das covariáveis que tiveram efeitos na regressão de COX, primeiramente, podemos observar uma associação de maior a risco de óbito para indivíduos dependentes transfusionais. Pacientes com dependência transfusional possuem 12 vezes de mais chance do paciente vir a óbito do que pacientes não dependentes transfusionais (**Tabela 34**). Pacientes que com formas avançadas de SMD (AREBs), tinham também mais chance de vir a óbito (6 vezes), quando comparada a pacientes com formas iniciais das doenças (AR, ARSA, CRDM).

A superexpressão do gene *IRF3* está associada a um fator protetor em SMD. Pacientes que apresentam expressão acima 0.0373 apresentam um risco menor de vir a óbito do que pacientes com baixa expressão. Pacientes com baixa expressão do gene *IRF3* possui nove vezes mais chance de vir a óbito do que indivíduos com alta expressão (**Tabela 34**). Dessa forma, a superexpressão do gene *IRF3* pode estar relacionada a um menor risco em SMD e a prognóstico favorável.

Por outro lado, a superexpressão do gene *IRF5* está correlacionada a um maior

risco de óbito em SMD. Pacientes com níveis de expressão gênica do *IRF5* acima de 0.0232 tem quase 9 vezes mais chance de evolução a óbito do que pacientes com valores abaixo desse nível de expressão (**Tabela 34**). Essa variável confere um maior risco para doença, sendo dessa forma, a supexpressão do gene *IRF5*, pode estar relacionada a prognóstico desfavorável.

Por último, a metilação da região promotora também do gene *IRF5* em células de medula total configura um perfil de maior risco a óbito em pacientes com SMD. Pacientes com hipermetilação do *IRF5* apresentam quatro vezes mais de chance de o paciente vir a óbito do que indivíduos com o *IRF5* não metilado (Tabela 37).

Tabela 34. Regressão múltipla de COX para a sobrevida global.

Variáveis	Classes	Exp(B)	IC 95,0% para Exp(B)		p Valor
			Limite Inferior	Limite Superior	
Dependência Transfusional	Não dependentes transfusional	1	-	-	0,003
	Dependentes transfusional	12,127	2,405	61,138	
Formas SMD	Formas Iniciais*	1	-	-	0,004
	Formas Avançadas**	6,908	1,843	25,888	
Expressão mRNA <i>IRF3</i>	Perfil menos expresso <0.0373	1	-	-	0,000
	Perfil mais expresso ≥0.0373	0,105	,030	,373	
Expressão mRNA <i>IRF5</i>	Perfil menos expresso <0.0232	1	-	-	0,001
	Perfil mais expresso ≥0.0232	8,819	2,379	32,694	
Metilação da região promotora do gene <i>IRF5</i>	Perfil de metilação não tumoral ≤0	1	-	-	0,041
	Perfil de metilação tumoral >0	4,640	1,066	20,192	

*Formas iniciais. AR, ARSA, CRDM; ** Formas avançadas. AREBs

4.5 NÍVEIS DE METILAÇÃO E EXPRESSÃO EM CÉLULA CD34+ E MEDULA TOTAL DE PACIENTES COM SMD

A avaliação comparativa dos níveis de metilação entre a subpopulação de CD34+ isolada da medula óssea entre a medula óssea total revelou que a metilação do gene *IRF6* é maior em medula óssea total ($p=0.0002$). Em consequência, a metilação do gene *IRF6* é menor em células tronco hematopoiéticas isoladas do que quando comparadas ao *pool* de células da medula total. Entretanto, a avaliação da expressão dos *IRFs* entre esses dois tipos de amostras mostrou que o gene *IRF6* é 3.2 vezes mais expresso em células CD34+ quando comparadas a medula total ($p=0.046$). A partir desses dados, é possível sugerir que a metilação é um fenômeno que pode estar envolvido na regulação da expressão do *IRF6* em células CD34+ de pacientes com SMD. Sugerindo que é provável que o *IRF6* tenha uma importante função nas células tronco hematopoiéticas de pacientes com SMD.

Além do gene *IRF6*, níveis mais altos de expressão do gene *IRF5* estavam relacionadas a células progenitoras CD34+ ($p=0.006$) quando comparados a medula total. Nenhuma diferença foi relacionada a metilação do gene *IRF5*.

5. DISCUSSÃO

IRF1

Expressão do *IRF1*

Pela análise da expressão do gene *IRF1* foi observada uma associação de um maior nível de expressão deste gene com pacientes que apresentam medula óssea hipocelular. Sabe-se que hipocelularidade medular encontrada em alguns pacientes com SMD pode estar associada a mecanismos imunomediados (Maciejewski et al., 2007; Kastrinaki et al., 2013; Serio et al., 2014). Esses fenômenos foram relatados em células progenitoras hematopoéticas da medula de pacientes com SMD hipocelular ou hipoplásica e na medula de pacientes de baixo risco. Dentre esses fenômenos imunomediados, podemos citar a expansão de linfócitos T citotóxicos, indução de apoptose, liberação de citocinas, tais como TNF- α e o interferon gama (IFN- γ) (Maciejewski et al., 2007). O IFN- γ tem sido frequentemente encontrado com superexpressão na medula e em células do sangue periférico de pacientes com SMD de baixo risco e em pacientes com SMD hipocelular (Ganan-Gomez et al., 2015). Entretanto, o IFN- γ pode ser inibido pela inativação do IRF1 (Murtas et al., 2013). Pinheiro et al. 2009 identificaram que altos níveis de IRF1 estavam associados com um prognóstico favorável e um aumento de fenômenos autoimune em SMD. Sendo assim, é provável que os altos níveis de expressão de *IRF1* em pacientes com medula hipocelular, encontrados no presente trabalho, podem estar relacionadas a mecanismos mediados pelo sistema imune.

Metilação do IRF1

Diversas alterações, tanto de origem genética ou epigenética, têm sido implicadas nos múltiplos processos que dão origem a SMD e sua transformação para LMA. A fisiopatologia da SMD é complexa e isso é um reflexo da heterogeneidade da doença. Dentre os genes avaliados no presente trabalho, o IRF1 pode ser um fator que contribui para o melhor entendimento da patogênese da SMD (Willman et al, 1993).

O IRF1 foi originalmente identificado como regulador de interferon e subsequentemente foi reconhecido como um fator de transcrição envolvido no controle do crescimento celular e indução de apoptose (Tamura et al., 2008). As funções do IRF1 também abrangem, dentre outras, atividade supressora tumoral e diferenciação de células mielóides. As deleções e mutações somáticas do gene IRF1 têm sido implicados na SMD (Papemmanuil et al., 2001 e 2013) e posterior evolução para LMA (Willman et al., 1993). Maratheftis et al. 2006 identificaram que a inativação funcional do gene *IRF1* resultante de *splicing* aberrante pode ser um evento crítico que contribui para o fenótipo odisplásico. Esse fenótipo é ocasionado pela inativação da atividade supressora tumoral e de diferenciação mielóide do IRF1.

O presente estudo é o primeiro trabalho que avalia a metilação e expressão do gene *IRF1* em SMD. A metilação do *IRF1* foi associada a SMD de alto risco (AREBs). O gene *IRF1* foi metilado em 82% dos pacientes de SMD de alto risco, entretanto somente 22% dos pacientes com AR e nenhum paciente com ARSA possuíam o gene *IRF1* metilado (AR e ARSA - SMD de baixo risco).

Corroborando com esse dado, diversos estudos têm demonstrado que a hipermetilação da região promotora de vários genes é associada com a progressão da SMD (Issa 2013; Fan et al., 2014; Qian et al., 2014; Wong et al., 2014; Kang 2015). Jiang et al. 2009 demonstraram que pacientes com SMD de alto risco (AREB) possuíam

um maior nível de metilação do que em pacientes de SMD de baixo risco ou controles normais.

Outra associação importante, demonstrada no presente trabalho, foi o aumento da metilação do *IRF1* associada a pacientes com maior percentagem de blastos na medula óssea. Pacientes com blastos >2% apresentaram maior frequência do *IRF1* metilado. Esse dado sugere que a metilação pode estar inibindo atividade apoptótica do IRF1, favorecendo proliferação e o acúmulo de células progenitoras danificadas na medula óssea desses pacientes.

Além disso, a avaliação comparativa da metilação do *IRF1* entre amostras de seguimento e amostras ao diagnóstico mostrou que o gene *IRF1* foi 434 vezes mais metilado no seguimento do que em amostras ao diagnóstico. Esse dado nos sugere que o nível de metilação do *IRF1* em células de medulas óssea de pacientes com SMD aumenta durante a progressão da doença.

Uma associação importante observada, no presente trabalho, foi que a metilação do gene *IRF1* foi associada a categorias de risco do R-IPSS. Uma alta frequência de pacientes com o *IRF1* metilado foi associada aos grupos de risco intermediário, alto e muito alto (71%, 100% e 80%, respectivamente). Esse achado sugere que a metilação do *IRF1* pode estar relacionada a um prognóstico desfavorável em SMD.

Portanto, nossos dados sugerem que a metilação aberrante do *IRF1* pode possuir um papel importante na patogênese e progressão da SMD.

IRF2

Expressão do gene IRF2

O IRF2 é geralmente reconhecido como uma oncoproteína (Harada et al., 1993), e seu efeito tem sido pouco explorado no câncer. Entretanto, a expressão do *IRF2* tem sido associada a câncer de mama (Connett et al., 2005), câncer esofágico (Wang et al., 2007) e pontos de mutação no gene *IRF2* têm sido associados a câncer de pâncreas (Xi e Blanck 2000).

Observamos que os genes *IRF1* e *IRF2* apresentaram uma correlação positiva em SMD, ou seja, quando a expressão do *IRF1* aumenta a do *IRF2* também aumenta. Entretanto, diversos trabalhos têm demonstrado que o IRF2 atua como antagonista para o IRF1 (Harada et al., 1993, Choo et al., 2006, Wang et al., 2007, Ren et al., 2015). O IRF2 pode se ligar as mesmas sequências de DNA que o IRF1, sendo assim, ele regula negativamente ou bloqueia a transcrição de genes alvo do IRF1 (Harada et al., 1993). IRF2 é geralmente sintetizado depois de IRF1 após exposição celular ao IFN- γ , além disso, o IRF-2 tem uma maior estabilidade proteica. Por esse motivo o IRF-2 desempenha um papel na inibição dos efeitos de IFN- γ mediados pelo IRF1 (Tamura et al., 2008). Wang et al. 2006 demonstraram que o balanço do IRF1 e IRF2 são importantes para o desenvolvimento e progressão de câncer esofágico e Choo et al. 2006 mostraram associação desse balanço na leucemogênese. Esses trabalhos evidenciam o IRF1 e IRF2 com potenciais antioncogênico e oncogênico, respectivamente.

Entretanto, Connett et al., 2005 relataram que a expressão do IRF1 e IRF2 são positivamente correlacionadas em câncer de mama e que essas alterações da expressão podem diminuir os mecanismos de controle imuno-mediado nos tumores. Como o

nosso trabalho é o primeiro a avaliar concomitantemente os níveis de expressão de IRF-1 e IRF-2, podemos especular que na SMD há uma cooperação destes genes no processo patológico.

Metilação do gene IRF2

Não há trabalhos que mostrem a relação da metilação do gene *IRF2* com neoplasias. Yamashita et al. 2010 avaliariam a metilação dos genes dos nove membros da família dos IRFs e não observaram nenhuma associação da metilação do *IRF2* com câncer gástrico. No presente estudo, foi observado uma baixa frequência de metilação do *IRF2* em SMD. Entretanto, entre os subtipos da OMS, essa frequência de metilação foi diferente entre os grupos, sendo maior no subtipo AREB.

A metilação do gene *IRF2* foi associada com variáveis de maior risco em SMD, tais como cariótipo desfavorável (IPSS), neutrófilo abaixo de 800/ μ L, plaquetas abaixo de 50.000/ μ L, 3 citopenias (IPSS e R-IPSS), blastos acima de 5% e com categorias de alto risco estabelecidas pelo IPSS, R-IPSS e WPSS. Portanto, nossos resultados apontam que o gene *IRF2* é pouco metilado em SMD, porém, quando o *IRF2* está metilado é associado a características de prognóstico desfavorável.

IRF3

Expressão do gene IRF3

O IRF3 é um fator de transcrição que tem uma importante função na regulação de interferon e diversos autores têm demonstrado sua importância na regulação do ciclo celular (Takaoka et al., 2008; Tamura et al., 2008). Karpova et al., 2002 demonstram que IRF3 é um alvo da DNA-K, uma quinase dependente de DNA que está envolvida no ponto de checagem do ciclo celular e que ativa o IRF3 em resposta a danos no DNA.

Em resposta a danos de fita dupla, o complexo ATM-IKK α/β ativa o IRF3 e este estimula expressão de IFN- β promovendo apoptose, senescência e inibição das funções de células tronco (Yu et al., 2015). Portanto, o *IRF3* tem sido relatado por diversos autores como um gene supressor tumoral (Kim et al., 1999, 2003 e 2007; Takunaga et al., 2010). Maiores níveis do IRF3 foram relatados no controle do crescimento de células de melanoma (Moore et al., 2014) e Oshita et al. 2006 detectaram um maior nível de expressão do IRF3 em casos de prognóstico favorável em câncer de pulmão.

O presente trabalho é o primeiro estudo a detectar importantes associações do gene *IRF3* em SMD. Um maior nível de expressão do *IRF3* está associado à células de pacientes com SMD quando comparada a células de medula óssea normal. Ademais, maiores níveis de expressão do gene *IRF3* foi também associada a citopenias periféricas. O gene foi mais expresso em pacientes com níveis de hemoglobina abaixo de 10g/dL e em pacientes com o número de neutrófilos abaixo de 800/ μ L, assim como também em pacientes com 3 citopenias de acordo com os critérios do R-IPSS. A associação do IRF3 com as citopenias periféricas pode estar relacionada ao aumento de apoptose induzida pelo gene em resposta as células com danos no DNA, corroborando a idéia de gene pró-apoptótico descrita por Karpova et al., 2002 e Yu et al., 2015. Essa relação do IRF3 com a indução da apoptose está relacionada a um prognostico favorável nas neoplasia estudadas, como por exemplo, em carcinoma de pulmão (Oshita et al., 2006).

O aumento de expressão do gene *IRF3* em SMD foi relacionada a um prognóstico favorável (sobrevida global) pela análise multivariada de regressão de COX, conferindo ao IRF3 o papel de fator de proteção em SMD.

Metilação do gene IRF3

O presente estudo é o primeiro relato da associação da metilação de *IRF3* com câncer. A metilação do gene *IRF3* foi associada a pacientes com SMD e foi diferente entre os subtipos da OMS. Pacientes com formas mais agressivas da doença como RT-SMD e AREB tiveram maior frequência do gene metilado. Além disso, a metilação está relacionado a pacientes com percentagem de blastos $\geq 5\%$.

Não há estudos acerca da metilação do *IRF3* como fenômeno regulador de sua expressão e sua importância prognóstica com câncer. Entretanto, Kim, et al. 2003 e Li et al., 2001 demonstraram que o gene *IRF3* pode sofrer *splicing* aberrante e gerar isoformas protéicas, IRF3a, IRF3e e IRF3 que regulam negativamente o IRF3, bloqueando a expressão de seus genes alvos. Tokunaga et al. 2010 avaliaram formas ativas e inativas do IRF3 e observaram que formas inativas do IRF3 podem contribuir para a progressão do carcinoma de pulmão. Dessa forma, a inativação do IRF3 pode favorecer ao crescimento e progressão tumoral.

A metilação do DNA é um mecanismo relacionado com silenciamento gênico (Bailey et al., 2005). É provável que a ausência ou menores níveis do IRF3 estejam relacionados à progressão tumoral devido a inibição de sua atividade como supressor de tumor. Formas avançadas de SMD possuem uma diminuição da taxa de apoptose e aumento da proliferação de células progenitoras hematopoéticas (Corey et al., 2007). Portanto, é provável que a metilação do gene *IRF3* esteja favorecendo a diminuição das taxas de apoptose e aumentando a taxa de proliferação em SMD (pois encontramos metilação do IRF3 com $>5\%$ blastos).

IRF4

Expressão do gene IRF4

O IRF4 é estruturalmente relacionado com o IRF8 e ambos regulam cooperativamente a diferenciação de células dendríticas e células B (Tamura et al., 2008). Yamamoto et al., 2011 demonstraram que o IRF4 tem atividades semelhantes a *IRF8* na regulação do desenvolvimento de células mielóides. A expressão ectópica do *IRF4*, em cooperação com o *IRF8*, em células progenitoras mielóides, inibe o crescimento celular e impede a diferenciação de células granulocíticas. No presente trabalho, encontramos uma associação de maiores níveis de expressão do *IRF4 e IRF8* em pacientes com neutrófilos abaixo de 800/ μ L. É provável que estes genes atuem cooperativamente em SMD com objetivo de inibir a diferenciação granulocítica, promovendo a diferenciação monocítica.

IRF5

Expressão do gene IRF5

O IRF5 desempenha um papel essencial na regulação de genes induzidos por infecção viral, crescimento celular, oncogênese e apoptose (Tamura et al., 2008). O IRF5 foi identificado como um regulador de interferon do Tipo I, porém estudos mostram que IRF5 possui propriedade supressora tumoral relacionadas a indução do p21, Bak, Bax e caspase 8 (Mori et al., 2002). Embora já se saiba que o gene *IRF5* pode ser induzido por p53 (Mori et al., 2002), o IRF5 promove uma atividade pró-apoptótica e a superexpressão do *IRF5* suprime o crescimento de células tumorais de um modo

independente de p53 (Hu et al, 2005). Diversos autores observaram tais relações em diversos tipos de neoplasias (Garaud e Gallo, 2015; Pimenta et al., 2015). Massmino et al., demonstraram que a expressão ectópica do *IRF5* reduz a proliferação de células de leucemia mielóide crônica *in vitro*. Yamashita et al., observaram uma perda de expressão do *IRF5* em câncer gástrico e Bi et al., correlacionaram a perda de expressão do *IRF5* com a progressão e metástase em câncer de mama.

Contrariamente, a partir dos nossos resultados, observamos que o aumento da expressão do *IRF5* está associado a pacientes que evoluíram para LMA. Pela análise de regressão logística, foi observado que o aumento de expressão do *IRF5* na medula óssea de pacientes com SMD está associado a um maior risco (5.4 vezes mais chance) de evolução para LMA (sendo essa a variável de maior peso na regressão logística). Pela análise de regressão de COX, observou-se também que níveis mais altos de expressão do gene *IRF5* em pacientes com SMD aumentam em quase 9 vezes o risco de o paciente vir a óbito. Sendo assim, o aumento de expressão do *IRF5* em medula óssea de pacientes com SMD aumenta o risco de evolução para LMA e diminui a sobrevida global dos pacientes.

Corroborando com nossos achados, Massimino et al. 2012, mostrou pela primeira vez, que o *IRF5* promove tumorigênese em câncer de tireóide. Nesse estudo, foi observado que altos níveis de expressão do *IRF5* aumentam a taxa de proliferação e o potencial clonogênico de células de tireóide tumorais. Foi observado que esse efeito proliferativo do *IRF5* pode estar relacionado com a ativação de um proto-oncogene, o *B-RAF*, envolvido no crescimento celular. Além disso, observou-se também que o aumento da expressão do *IRF5* protege as células neoplásicas de tireoide dos efeitos citotóxicos de agentes causadores de danos no DNA (Massimino et al., 2012).

Tais diferenças na função *IRF5* pode ser atribuída a papéis específicos do tipo de

células que o *IRF5* está expresso e a diferentes origens genéticas das neoplasias estudadas (Ryzhakov et al., 2014).

Portanto, no presente trabalho, a superexpressão do gene *IRF5* em SMD está associada à promoção tumoral e não a atividade supressora tumoral. Níveis mais altos da expressão do *IRF5* estão associados a um maior risco de evolução para LMA e pior prognóstico em SMD.

Metilação do gene IRF5

O *IRF5* tem diversas funções que incluem a indução de interferons do tipo I e citocinas pró-inflamatórias após a infecção viral ou por receptores *Toll-like* (TLR) (Tamura et al., 2008). O *IRF5* está envolvido em vias apoptóticas induzida por infecção viral e danos no DNA. A característica apoptótica do *IRF5* lhe confere uma atividade supressora tumoral e tem sido evidenciada em diversas neoplasias (Tamura et al., 2008).

A metilação do gene *IRF5* tem sido reportada em diversas neoplasias como câncer gástrico (Yamashita et al., 2010), carcinoma hepatocelular (Shin et al., 2010), pulmão (Li e Tainsky 2011) e em geral essa metilação está relacionada com o silenciamento gênico (Shin et al., 2010; Yamashita et al., 2010).

O presente trabalho mostrou uma associação da metilação da região promotora do gene *IRF5* com SMD. O gene *IRF5* foi metilado em 47% (43/91) dos pacientes com SMD, enquanto 100% dos indivíduos saudáveis analisados apresentaram o *IRF5* não metilado. Não encontramos uma correlação entre metilação e expressão do gene *IRF5*, porém a metilação do gene *IRF5* pode estar relacionada com o silenciamento gênico em algumas células de pacientes de SMD.

Podemos observar que em SMD a metilação do gene *IRF5* está associada a

pacientes com níveis mais baixos de neutrófilos e plaquetas. A profundidade das citopenias é importante clinicamente e níveis mais baixos neutrófilos ($ANC < 800/\mu L$) e plaquetas (plaquetas $< 50.000/\mu L$) estão relacionados a pior prognóstico em SMD (Greenberg et al., 2012).

O gene *IRF5* participa do processo de diferenciação granulocítica (Jeffrey et al., 2014) e megacariocítica. Finkielstein et al. 2015 demonstraram que progenitores megacariocíticos exibem altos níveis de expressão de mRNA do *IRF5*. Podemos especular que a metilação do *IRF5* estaria relacionada a perda de função deste gene nos precursores granulocíticos e megacariocíticos, gerando neutropenia e plaquetopenia respectivamente.

A partir da análise de regressão de COX foi observado que a metilação o gene *IRF5* está associada a maior risco (4,64 vezes) do paciente vir a óbito do que em pacientes que não possuem o gene *IRF5* metilado.

IRF6

Expressão do IRF6

No presente trabalho foi observado que pacientes com cariótipo com algum tipo de alteração cromossômica possuíam menores níveis de expressão do *IRF6* quando comparados a pacientes com cariótipo normal. Estudos têm demonstrado que o *IRF6* tem sido associado ao controle do ciclo celular (Bayley et al., 2008, Botti et al., 2011). Portanto, baseados nos nossos resultados, é provável que baixos níveis de expressão do *IRF6* em pacientes com cariótipo alterado estejam associados a uma desordem no controle do ciclo celular ocasionando o aumento da instabilidade genômica.

Metilação do *IRF6*

No presente trabalho a metilação do *IRF6* foi associada a pacientes com AR. Segundo Xu et al. 2012 altos níveis de expressão do *IRF6* estão correlacionados com a eritropoese adulta normal. Essa associação entre metilação do *IRF6* e pacientes com AR pode estar relacionada a desregulação do *IRF6* ocasionando defeitos na eritropoese desses pacientes.

O *IRF6* também tem sido descrito por participar de vias que controlam a decisão entre a progressão do ciclo celular e saída do ciclo celular. Como essas vias são geralmente comprometidas na maioria das neoplasias humanas, tem se sugerido que o *IRF6* tenha um papel no desenvolvimento e progressão do câncer (Bailey e Hendrix 2008). Bailey et al., indicaram que níveis de mRNA e proteína do *IRF6* são significativamente reduzidos em linhagens humanas de células neoplásicas menos agressivas e completamente ausente em linhagens mais agressivas e metastáticas de células neoplásicas de mama. Bailey et al. especularm que a perda do *IRF6* seria um passo importante no desenvolvimento do câncer talvez permitindo a proliferação celular descontrolada.

Botti et al., 2011 demonstraram que o *IRF6* pode funcionar como um potencial gene supressor tumoral em células de carcinoma escamoso. O *IRF6* interage com uma rede de genes envolvidos na diferenciação, adesão celular e contato célula-célula que contribui para a regulação da capacidade de invasão e proliferação de células neoplásicas (Botti et al., 2011). Botti et al. encontraram baixos níveis de *IRF6* correlacionados com o estado invasivo do tumor e observaram que baixos níveis de expressão do *IRF6* em linhagens celulares de tumores primários de carcinoma escamoso estão correlacionados com a metilação em uma ilha CpG localizado em sua região promotora.

Nossos resultados demonstraram uma associação da metilação da região promotora do gene *IRF6* em SMD. Essa metilação está mais associada a pacientes com AREB, RT-SMD (formas de alto risco) e LMMC. Além disso, o *IRF6* metilado foi associado a pacientes com blastos na medula óssea. Portanto, a metilação do *IRF6* foi associada a pacientes com formas mais agressivas da doença, caracterizadas por terem uma perda gradativa da diferenciação celular com aumento da capacidade proliferativa das células progenitoras hematopoéticas. É provável, apesar de não termos encontrado correlações em metilação e expressão, que a hipermetilação do *IRF6* esteja inibindo as funções de controle do ciclo celular do *IRF6* em SMD.

IRF7

Expressão do *IRF7*

Assim como *IRF2* e *IRF4*, o *IRF7* possui propriedades oncogênicas (Tamura et al., 2008). O *IRF7* é superexpresso em linfomas, leucemia linfocítica aguda, leucemia linfocítica crônica, leucemia mielode aguda e leucemia de células T. Além disso, *IRF7* induz a formação de tumor em células NIH3T3 (Ning et al., 2011).

Por outro lado, o *IRF7* tem efeitos anti-tumorais em macrófagos, através da indução de apoptose (Romieu-Mourez et al., 2006). O *IRF7* pode ser induzido por *BRCA1*, um gene supressor tumoral, em linhagens celulares de câncer da mama inibindo o seu crescimento (Andrews et al., 2002). Além disso, o silenciamento do *IRF7* por hipermetilação é associado a linhagens de câncer de pulmão (Fukasawa et al., 2006). Bidwell et al., 2012 demonstraram que o silenciamento do *IRF7* em células de câncer de mama promove metástase óssea através de escape imunológico. Portanto, a regulação da oncogênese pelo *IRF7* pode ser tipo celular dependente (Ning et al., 2011).

No presente trabalho maiores níveis de expressão do gene *IRF7* foram associados a pacientes com SMD. Além disso, maiores níveis de expressão foram associados a pacientes com $HB < 10\text{g/dL}$, $ANC < 800/\mu\text{L}$ e plaquetas $< 50.000/\mu\text{L}$. Pacientes que apresentaram três citopenias periféricas pelos critérios do IPSS e R-IPSS também apresentaram maior nível de expressão do *IRF7*. É provável que o aumento da expressão do gene *IRF7* em SMD esteja associado ao aumento de apoptose na tentativa de eliminar células com danos no DNA, ocasionado as citopenias periféricas. Mais estudos devem ser realizados para se entender a função do *IRF7* em SMD, mas nossos resultados apontam que o *IRF7* pode estar associado a uma atividade supressora tumoral em SMD.

IRF8

Expressão do IRF8

O *IRF8* tem um papel decisivo para a diferenciação de macrófagos derivados de progenitores de granulócitos-macrófagos (Tamura et al., 2000; Rosenbauer et al., 2007). Perdas heterozigotas e homozigotas do *Irf8* desregulam a hematopoese e induzem uma síndrome semelhante à leucemia mielóide crônica humana em ratos (Holtschke et al., 1996). Pacientes com leucemia mielóide crônica têm baixos níveis de *IRF8* em células que expressam o BCR-ABL (Schmidt et al. 1998; Hao et al. 2001). O *IRF8* tem atividade pró-apoptótica (Gabriele et al., 1999) e modula a proliferação de células leucêmicas. Muitos autores caracterizam o *IRF8* como gene supressor tumoral (Otto 2011; Shiavoni et al., 2013; Zhang et al., 2014; Sharma et al., 2015).

Demonstramos que maiores níveis de expressão do *IRF8* foi associada $ANC < 800$, plaquetas < 100.000 e pacientes com 2/3 citopenias de acordo com os critérios do IPSS e R-IPSS. É provável que o aumento da expressão do gene *IRF8* em

SMD esteja associado ao aumento de apoptose.

Entretanto, o aumento da expressão do *IRF8* foi também associado pacientes com cariótipo com alterações estruturais e pacientes com alto risco (IPSS). Esses dados sugerem que o aumento de expressão do *IRF8* pode estar relacionado a um pior prognóstico em SMD e um aumento de instabilidade genômica. Esses dados vão de encontro com as atividades supressoras tumorais do *IRF8*.

Metilação do *IRF8*

A avaliação da metilação do *IRF8* foi avaliada em diversas neoplasias, tais como, câncer de pulmão (Suziki et al., 2014), carcinoma renal (Zhang et al., 2014), SMA/LMA (Otto et al., 2011) e a hipermetilação relacionadas a um pior prognóstico nas neoplásicas estudadas.

A metilação do gene *IRF8* foi diferente em células da medula óssea de pacientes com SMD quando comparadas a células de medula óssea normais. Entretanto foi observado que pacientes com SMD tinham uma menor frequência do gene *IRF8* metilado. Quando o *IRF8* se apresentou metilado, foi associado a pacientes que pertenciam ao grupo AREB, RT-SMD, LMMC, a pacientes com cariótipo desfavorável pelo critério do IPSS e R-IPSS, pacientes com ANC < 800, plaquetas < 50.000, risco intermediário II e alto (IPSS) risco alto e muito alto pelo critério do WPSS. Sendo assim, a metilação do *IRF8* estava associada a fatores de maior risco da doença, conferindo um marcador de prognóstico desfavorável para SMD

IRF9

Expressão do IRF9

Maiores níveis de expressão do *IRF9* foram relacionados a medula de pacientes com SMD. Pellagati et al. 2010, avaliaram o perfil de expressão de células CD34+ isoladas da medula óssea de 183 pacientes com SMD e observaram que dos 39.000 genes avaliados o gene *IRF9* está dentre os cinco genes mais expressos relacionados com a vias de sinalização de interferon. Sendo assim, podemos sugerir que o IRF9 é importante para o desenvolvimento da SMD, porém mais estudos devem ser realizados para entender o papel do IRF9 na patogênese da doença.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O presente trabalho mostrou que todos os membros da família dos IRFs possuem uma importância em SMD, sendo que os genes *IRF1*, *IRF3*, *IRF5*, *IRF6*, *IRF7* e *IRF8* têm uma maior relevância para a patogênese dessa doença. Baseados nos nossos resultados, podemos propor que alterações na expressão dos genes *IRF1*, *IRF3*, *IRF6*, *IRF7* e *IRF8* podem gerar uma desregulação no perfil inflamatório e imunológico da medula óssea de pacientes com SMD. Essa desregulação, ocasionada pelo aumento da expressão desses genes, geralmente está associada a hematopoese ineficaz causada pela anormal diferenciação e maturação dos precursores hematopoiéticos e pelo aumento de apoptose intramedular. Essas características foram observadas através das associações das expressões dos genes entre variáveis como medula hipocelular, níveis de citopenias e número de citopenias (Figura Resumo).

Por outro lado, a metilação desses genes pode estar associada a modulação da expressão dos IRFs, porém não comprovadas por esse estudo. Entretanto nossos resultados apontam que a metilação dos IRFs está associada a formas mais avançadas da doença e ao aumento da proliferação de progenitores hematopoiéticos. Essa hipótese pode ser comprovada pela associação da metilação com o subtipo AREB e maior percentagem de blastos. Baseado nisso, podemos propor que a metilação pode ser um mecanismo utilizado pela célula neoplásica da SMD para escapar dos efeitos supressores de tumor dirigidos pelo sistema imunológico, diminuindo a taxa de apoptose e aumentando a taxa de proliferação que proporciona a progressão da doença (Figura Resumo).

Muitos autores têm utilizado como estratégia a re-expressão desses genes nas neoplásicas estudadas a fim de se ativar as vias de sinalização imune como ferramenta

terapêutica de controle da progressão da doença (Sharma et al., 2015). Sendo assim, os IRFs podem ser importantes alvos terapêuticos em SMD.

Por fim, a expressão e a metilação dos IRFs podem ter grande impacto prognóstico na SMD. Como é o caso do aumento de expressão do gene *IRF3* que está associada a maior sobrevida global, caracterizando um prognóstico favorável em SMD. E contrariamente, o aumento da expressão do gene *IRF5* está associado a maior risco de evolução para LMA e menor sobrevida global. Portanto, podemos propor que os genes *IRF3* e *IRF5* são importantes marcadores prognósticos em SMD.

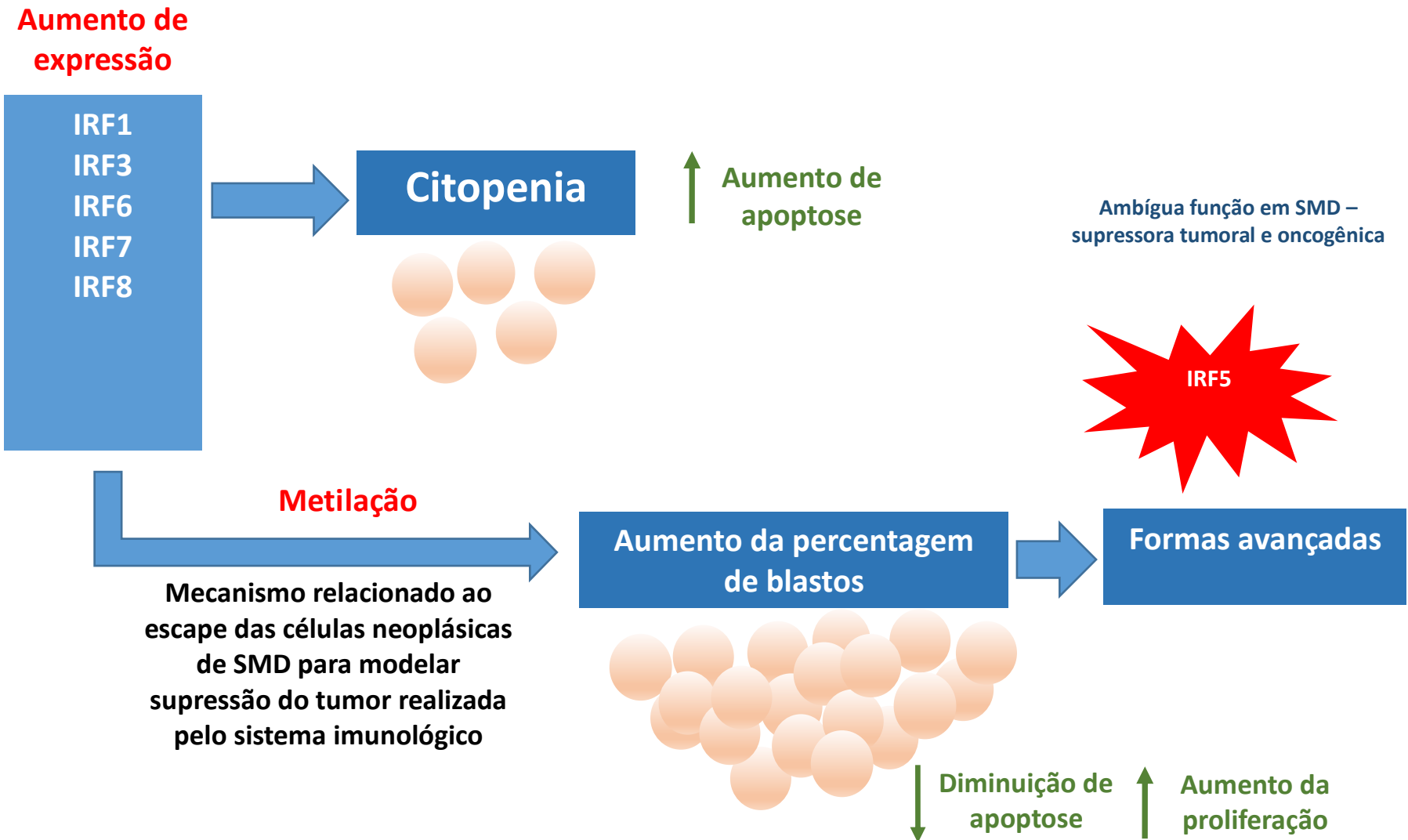


Figura Resumo- Hipótese do papel dos IRFS na patogênese da SMD.

7. CONCLUSÕES

- I. O desbalanco nos níveis de expressão gênica dos *IRFs* é determinante para o desenvolvimento da SMD.
- II. A expressão alterada dos genes *IRF7*, *IRF8* e *IRF9* geram maior instabilidade genômica em SMD.
- III. A expressão alterada dos genes *IRF3*, *IRF7* e *IRF8* está relacionada a citopenias periféricas provavelmente por meio de mecanismo imunoregulatório para controlar a progressão da SMD.
- IV. A supreexpressão do *IRF6* é um marcador de prognóstico favorável em SMD.
- V. A expressão alterada do *IRF5* aumenta o risco de evolução para LMA e está relacionada a menor sobrevida em SMD. A supressão do *IRF5* é um marcador de prognóstico desfavorável em SMD.
- VI. A metilação do *IRF1*, *IRF2*, *IRF3*, *IRF6* e *IRF8* está associada a progressão da SMD.
- VII. A metilação do *IRF1*, *IRF2* e *IRF6* está associada a maior risco em SMD.
- VIII. A metilação do gene *IRF5* não está associada a progressão da doença, mas está associada a uma pior sobrevida em SMD. Sendo também um marcador de prognóstico desfavorável em SMD.
- IX. Os genes *IRF1*, *IRF3*, *IRF6* e *IRF7* foram identificados como prováveis genes supressores tumorais e o gene *IRF5* foi associada a atividade oncogênica em SMD.
- X. Maiores níveis de expressão dos genes *IRF5* e *IRF6* estão associadas a células tronco hematopoiéticas CD34+.

8. REFERENCIAS

Andrews HN, Mullan PB, McWilliams S, Sebelova S, Quinn JE, Gilmore PM, et al. BRCA1 regulates the interferon gamma-mediated apoptotic response. *J Biol Chem.* 2002; 277:26225–26232.

Bailey CM, Abbott DE, Margaryan NV, Khalkhali-Ellis Z, Hendrix MJ. Interferon regulatory factor 6 promotes cell cycle arrest and is regulated by the proteasome in a cell cycle-dependent manner. *Mol Cell Biol* 2008; 28:2235–43

Bailey CM, Hendrix MJC, IRF6 in Development and Disease: A Mediator of Quiescence and Differentiation *Cell Cycle.* 2008; 7(13): 1925–1930.

Barnes BJ, Kellum MJ, Pinder KE, Frisancho JA, Pitha PM. Interferon regulatory factor 5, a novel mediator of cell cycle arrest and cell death. *Cancer Res.* 2003; 63(19):6424-31.

Baylin SB. Stem cells, cancer, and epigenetics. In: *StemBook* [Internet]. Cambridge (MA): Harvard Stem Cell Institute; 2008-2009.

Bejar R. Clinical and genetic predictors of prognosis in myelodysplastic syndromes. *Haematologica.* 2014;99(6):956-64.

Bejar R. Prognostic models in myelodysplastic syndromes. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program.* 2013;2013:504-10.

Bejar, R.; Ebert, B. L. The genetic basis of myelodysplastic syndromes. *Hematol.Oncol.Clin.North Am.*, v. 24, n. 2, p. 295-315, 2010.

Bennett JM, Catovsky D, Daniel MT, et al. Proposals for the classification of the myelodysplastic syndromes. *Br J Haematol* 1982; 51:189-99.

Bernasconi P, Klersy C, Boni M, Cavigliano PM, Calatroni S, Giardini I, Rocca B, Zappatore R, Caresana M, Quarna J, Lazzarino M, Bernasconi C. Incidence and prognostic significance of karyotype abnormalities in de novo primary myelodysplastic syndromes: a study on 331

patients from a single institution. *Leukemia*. 2005;19 (8):1424-31.

Bernasconi P, Klersy C, Boni M, Cavigliano PM, Calatroni S, Giardini I, Rocca B, Zappatore R, Caresana M, Quarna J, Lazzarino M, Bernasconi C. Incidence and prognostic significance of karyotype abnormalities in de novo primary myelodysplastic syndromes: a study on 331 patients from a single institution. *Leukemia*. 2005;19 (8):1424-31.

Bernasconi P. Molecular pathways in myelodysplastic syndromes and acute myeloid leukemia: relationships and distinctions – a review. *Br J Haematol* 2008; 142:695-708.

Bidwell BN¹, Slaney CY, Withana NP, Forster S, Cao Y, Loi S, Andrews D, Mikeska T, Mangan NE, Samarajiwa SA, de Weerd NA, Gould J, Argani P, Möller A, Smyth MJ, Anderson RL, Hertzog PJ, Parker BS. Silencing of Irf7 pathways in breast cancer cells promotes bone metastasis through immune escape. *Nat Med*. 2012;18(8):1224-31.

Borgonovo T.; Ribeiro EMSF; cornelio d.a.; schmid-braz a.t.; jamur v.r.; wuicik l.; veiga l.b.a.; ehmke n.a.m.; pasquini r.; cavalli i.j.; Cytogenetic study of Brazilian patients with myelodysplastic syndrome (MDS), 2005.

Brunning RD, Orazi A, Germing U, et al. Myelodysplastic syndromes/neoplasms, overview. In: Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, Jaffe ES, Pileri SA, Stein H, Thiele J, Vardiman JW. WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. 4th. Lyon: IARC Press; 93.

Caleb M. Bailey e Mary J.C. Hendrix. IRF6 in Development and Disease: A Mediator of Quiescence and Differentiation. *Cell Cycle*. 2008 July 1; 7(13): 1925–1930.

Challen GA, Sun D, Jeong M, et al. Dnmt3a is essential for hematopoietic stem cell differentiation. *Nat Genet*. 2012;44(1):23-31

Chen B, Zhao WL, Jin J, et al. Clinical and cytogenetic features of 508 Chinese patients with myelodysplastic syndrome and comparison with those in Western countries. *Leukemia* 2005; 19:767-75.

Choo A, Palladinetti P, Holmes T, Basu S, Shen S, Lock R., O'Brien T, Symonds G, Dolnikov

A. siRNA targeting the IRF2 transcription factor inhibits leukaemic cell growth. *International Journal of Oncology*. 2008; 33:175-183.

Choo A, Palladinetti P, Passioura T, Shen S, Lock R, Symonds G, Dolnikov A. The Role of IRF1 and IRF2 Transcription Factors in Leukaemogenesis. *Current Gene Therapy*, 2006; 6: 543-550.

Coccia EM, Stellacci E, Valtieri M, Masella B, Feccia T, Marziali G, Hiscott J, Testa U, Peschle C, Battistini A. Ectopic expression of interferon regulatory factor-1 potentiates granulocytic differentiation. *Biochem J*. 2001;360:285-94.

Connett JM, Badri L, Giordano TJ, Connett WC, Doherty GM. Interferon regulatory factor 1 (IRF-1) and IRF-2 expression in breast cancer tissue microarrays. *J Interferon Cytokine Res*. 2005;25(10):587-94.

Corey J, Minden M, Barber DL, Kantarjian H, Wang JCY, Schimmer AD. Myelodysplastic syndromes: the complexity of stem-cell diseases. *Leukemia* 2007;7:118-129.

Delhommeau F, Dupont S, Della Valle V, James C, Trannoy S, Massé A, Kosmider O, Le Couedic JP, Robert F, Alberdi A, Lécluse Y, Plo I, Dreyfus FJ, Marzac C, Casadevall N, Lacombe C, Romana SP, Dessen P, Soulier J, Viguié F, Fontenay M, Vainchenker W, Bernard OA. Mutation in TET2 in myeloid cancers. *N Engl J Med*. 2009 28;360(22):2289-301.

Porta PMG, Tuechler H, Malcovati L, Schanz J, Sanz G, Garcia-Manero G, Solé F, Bennett JM, Bowen D, Fenaux P, Dreyfus F, Kantarjian H, Kuendgen A, Levis A, Cermak J, Fonatsch C, Le Beau MM, Slovak ML, Krieger O, Luebbert M, Maciejewski J, Magalhaes SM, Miyazaki Y, Pfeilstöcker M, Sekeres MA, Sperr WR, Stauder R, Tauro S, Valent P, Vallespi T, van de Loosdrecht AA, Germing U, Haase D, Greenberg PL, Cazzola M. Validation of WHO classification-based Prognostic Scoring System (WPSS) for myelodysplastic syndromes and comparison with the revised International Prognostic Scoring System (IPSS-R). A study of the International Working Group for Prognosis in Myelodysplasia (IWG-PM). *Leukemia*. 2015;29(7):1502-13

Epling-burnette, P. K. et al. Dysregulated NK receptor expression in patients with lymphoproliferative disease of granular lymphocytes. *Blood*, v. 103, n. 9, p. 3431-3439, 2004.

Fan R, Zhao XL, Wang H, He HY, Peng ZP, Yang B, Han T, Wang W, Wang XQ, Lin GW. Abnormal methylation of the sex-determining region Y-box 17 (SOX17) promoter predicts poor prognosis in myelodysplastic syndrome. *Clin Lab*. 2014;60(9):1465-74.

Friedman AD. Transcriptional control of granulocyte and monocyte development. *Oncogene*. 2007; 15;26(47):6816-28.

Fukasawa M, Kimura M, Morita S, Matsubara K, Yamanaka S, Endo C, et al. Microarray analysis of promoter methylation in lung cancers. *J Hum Genet*. 2006; 51:368–374.

Gambara G, Desideri M, Stoppacciaro A, Padula F, De Cesaris P, Starace D, Tubaro A, Del Bufalo D, Filippini A, Ziparo E, Riccioli A. TLR3 engagement induces IRF-3-dependent apoptosis in androgen-sensitive prostate cancer cells and inhibits tumour growth in vivo. *J Cell Mol Med*. 2015;19(2):327-39.

Gañán-Gómez I, Wei Y, Starczynowski DT, Colla S, Yang H, Cabrero-Calvo M, Bohannon ZS, Verma A, Steidl U, Garcia-Manero G. Dereglulation of innate immune and inflammatory signaling in myelodysplastic syndromes. *Leukemia*. 2015 Jul;29(7):1458-69. doi: 10.1038/leu.2015.69. Epub 2015 Mar 12. Review.

Gao J, Senthil M, Ren B, Yan J, Xing Q, Yu J, Zhang L, Yim JH. IRF-1 transcriptionally upregulates PUMA, which mediates the mitochondrial apoptotic pathway in IRF-1-induced apoptosis in cancer cells. *Cell Death Differ*. 2009

Graud S, Willard-Gallo K¹. IRF5: a rheostat for tumor-infiltrating lymphocyte trafficking in breast cancer? *Immunol Cell Biol*. 2015 May;93(5):425-6.

Gilliland DG. Hematologic malignancies. *Curr Opin Hematol*. 2001;8(4):189-91.

Greenberg P, Cox C, LeBeau MM, Fenaux P, Morel P, Sanz G, Sanz M, Vallespi T, Hamblin T, Oscier D, Ohyashiki K, Toyama K, Aul C, Mufti G, Bennett J. International scoring system for evaluating prognosis in myelodysplastic syndromes. *Blood*. 1997 15;89(6):2079-88.

Greenberg PL, Tuechler H, Schanz J, Sanz G, Garcia-Manero G, Solé F, Bennett JM, Bowen D, Fenaux P, Dreyfus F, Kantarjian H, Kuendgen A, Levis A, Malcovati L, Cazzola

M, Cermak J, Fonatsch C, Le Beau MM, Slovak ML, Krieger O, Luebbert M, Maciejewski J, Magalhaes SM, Miyazaki Y, Pfeilstöcker M, Sekeres M, Sperr WR, Stauder R, Tauro S, Valent P, Vallespi T, van de Loosdrecht AA, Germing U, Haase D. Revised international prognostic scoring system for myelodysplastic syndromes. *Blood*. 2012 20;120(12):2454-65

Hanaoka, N. et al. NKG2D-mediated immunity underlying paroxysmal nocturnal haemoglobinuria and related bone marrow failure syndromes. *Br.J.Haematol.*, v. 146, n. 5, p. 538-545, 2009.

Hao SX, Ren R. Expression of interferon consensus sequence binding protein (ICSBP) is downregulated in Bcr-Abl-induced murine chronic myelogenous leukemia-like disease, and forced coexpression of ICSBP inhibits Bcr-Abl-induced myeloproliferative disorder. *Mol Cell Biol* 2000; 20: 1149–1161.

Harada H, Kitagawa M, Tanaka N, Yamamoto H, Harada K, Ishihara M, Taniguchi T. Anti-oncogenic and oncogenic potentials of interferon regulatory factors-1 and -2. *Science*. 1993; 259(5097):971-4.

Hida S, Tadachi M, Saito T, Taki S. Negative control of basophil expansion by IRF-2 critical for the regulation of Th1/Th2 balance. *Blood*. 2005; 106(6):2011-7.

Holtshke T, Lohler J, Kanno Y, Fehr T, Giese N, Rosenbauer F et al. Immunodeficiency and chronic myelogenous leukemia-like syndrome in mice with a targeted mutation of the ICSBP gene. *Cell* 1996; 87: 307–317.

Hu G, Barnes BJ. IRF-5 is a mediator of the death receptor-induced apoptotic signaling pathway. *J Biol Chem*. 2009; 284(5):2767-77.

Hu G, Mancl ME, Barnes BJ. Signaling through IFN regulatory factor-5 sensitizes p53-deficient tumors to DNA damage-induced apoptosis and cell death. *Cancer Res*. 2005 Aug 15;65(16):7403-12.

– Huang W, Zhou W, Saberwal G, Konieczna I, Horvath E, Katsoulidis E, Plataniias LC, Eklund EA. Interferon consensus sequence binding protein (ICSBP) decreases beta-catenin

activity in myeloid cells by repressing GAS2 transcription. *Mol Cell Biol.* 2010;30(19):4575-94.

Huntly BJ, Gilliland DG. Leukaemia stem cells and the evolution of cancer-stem-cell research. *Nat Rev Cancer.* 2005;5(4):311-21.

Jaenisch R, Bird A. Epigenetic regulation of gene expression: how the genome integrates intrinsic and environmental signals. *Nat Genet.* 2003; 33:245-54

Jaffe ES, Harris NL, Stein H, et al. WHO classification of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues. Lyon: IARC Press; 2001. (IARC WHO Classification of Tumours, n.2).

Jiang Y, Dunbar A, Gondek LP, Mohan S, Rataul M, O'Keefe C, Sekeres M, Sauntharajah Y, Maciejewski JP. Aberrant DNA methylation is a dominant mechanism in MDS progression to AML. *Blood.* 2009;113(6):1315-25

Jonas BA, Greenberg PL. MDS prognostic scoring systems – past, present, and future. *Best Pract Res Clin Haematol.* 2015; 28(1):3-13.

Kang H, Wang X, Gao L, Cen J, Li M, Wang W, Wang N, Li Y, Wang L, Yu L. Clinical implications of the quantitative detection of ID4 gene methylation in myelodysplastic syndrome. *Eur J Med Res.* 2015;20:16.

Karpova AY, Trost M, Murray JM, Cantley LC, Howley PM. Interferon regulatory factor-3 is an in vivo target of DNA-PK. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002;99(5):2818-23.

Kasner MT¹, Luger SM. Update on the therapy for myelodysplastic syndrome. *Am J Hematol.* 2008;84(3):177-86.

Kastrinaki MC, Pavlaki K, Batsali AK, Kouvidi E, Mavroudi I, Pontikoglou C, Papadaki HA. Mesenchymal stem cells in immune-mediated bone marrow failure syndromes. *Clin Dev Immunol.* 2013; 2013:265608.

Kerbaui, DB ; Deeg HJ. Apoptosis and antiapoptotic mechanisms in the progression of myelodysplastic syndrome. *Exp.Hematol.*, v. 35, n. 11, p. 1739-1746, 2007.

Kim T, Kim TY, Song YH, Min IM, Yim J, Kim TK. Activation of interferon regulatory factor 3 in response to DNA-damaging agents. *J Biol Chem*. 1999; 274(43):30686-9.

Kim TK, Lee JS, Jung JE, Oh SY, Kwak S, Jin X, Lee SY, Lee JB, Chung YG, Choi YK, You S, Kim H. Interferon regulatory factor 3 activates p53-dependent cell growth inhibition. *Cancer Lett*. 2006; 242(2):215-21.

Kim TK, Lee JS, Oh SY, Jin X, Choi YJ, Lee TH, Lee Eh, Choi YK, You S, Chung YG, Lee JB, DePinho RA, Chin L, Kim H. Direct transcriptional activation of promyelocytic leukemia protein by IFN regulatory factor 3 induces the p53-dependent growth inhibition of cancer cells. *Cancer Res*. 2007;67(23):11133-40.

Knudson AG Jr. Overview: genes that predispose to cancer. *Mutat Res*. 1991;247(2):185-90.

Ko M, Rao A. TET2: epigenetic safeguard for HSC. *Blood*. 2011 27;118(17):4501-3.

Komrokji RS¹, Padron E, Lancet JE, List AF. Prognostic factors and risk models in myelodysplastic syndromes. *Clin Lymphoma Myeloma Leuk*. 2013;13 Suppl 2:S295-9.

Lane SW, Gilliland DG. Leukemia stem cells. *Semin Cancer Biol*. 2010;20(2):71-6.

Li Y, Hu X, Song Y, Lu Z, Ning T, Cai H, Ke Y. Identification of novel alternative splicing variants of interferon regulatory factor 3. *Biochim Biophys Acta*. 2011;1809(3):166-75.

Liebermann DA, Hoffman B. Myeloid differentiation (MyD) primary response genes in hematopoiesis. *Oncogene*. 2002;21(21):3391-402.

Liebermann DA, Hoffman B. Good and bad IRF-1: role in tumor suppression versus autoimmune disease. *Leuk Res*. 2009; 33(10):1301-2.

Lohoff M, Mak TW. Roles of interferon-regulatory factors in T-helper-cell differentiation. *Nat Rev Immunol*. 2005;5(2):125-35.

Lopez-Pelaez M, Lamont DJ, Pegg M, Shpiro N, Gray NS, Cohen P. Protein kinase IKK β -catalyzed phosphorylation of IRF5 at Ser462 induces its dimerization and nuclear

translocation in myeloid cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2014;111(49):17432-7.

Maciejewski JP, O'Keefe C, Gondek L, Tiu R. Immune-mediated bone marrow failure syndromes of progenitor and stem cells: molecular analysis of cytotoxic T cell clones. *Folia Histochem Cytobiol*. 2007;45(1):5-14.

– Majeti R, Becker MW, Tian Q, Lee TL, Yan X, Liu R, Chiang JH, Hood L, Clarke MF, Weissman IL. Dysregulated gene expression networks in human acute myelogenous leukemia stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009;106(9):3396-401

Malcovati L, Della Porta MG, Strupp C, et al. Impact of the degree of anemia on the outcome of patients with myelodysplastic syndrome and its integration into the WHO classification-based Prognostic Scoring System (WPSS). *Haematologica* 2011; 96:1433-40.

Malcovati L, Porta MG, Pascutto C, et al. Prognostic factors and life expectancy in MDS classified according to WHO criteria: a basis for clinical decision making. *J Clin Oncol* 2005; 23:7594-603.

Mamane Y, Heylbroeck C, Genin P, Algarte M, Servant MJ, et al. 1999. Interferon regulatory factors: the next generation. *Gene* 237:1–14.

Massimin M, Vigneri V, Fallica M, Fidilio A, Aloisi A, Frasca F, Manzella L. IRF5 promotes the proliferation of human thyroid cancer cells. *Mol Cancer*. 2012; 11: 21.

Masumi A, Hamaguchi I, Kuramitsu M, Mizukami T, Takizawa K, Momose H, Naito S, Yamaguchi K. Interferon regulatory factor-2 induces megakaryopoiesis in mouse bone marrow hematopoietic cells. *FEBS Lett*. 2009; 583(21):3493-500.

Masumi A, Yamakawa Y, Fukazawa H, Ozato K, Komuro K. Interferon Regulatory Factor-2 Regulates Cell Growth through Its Acetylation. *The Journal of Biological Chemistry*. 2003; 278:25401–25407.

Miranda MB, Johnson DE. Signal transduction pathways that contribute to myeloid differentiation. *Leukemia*. 2007;21(7):1363-77.

– Mizutani T, Tsuji K, Ebihara Y, Taki S, Ohba Y, Taniguchi T, Honda K. Homeostatic erythropoiesis by the transcription factor IRF2 through attenuation of type I interferon signaling. *Exp Hematol.* 2008 ;36(3):255-64.

Moore TC, Kumm PM, Brown DM, Petro TM. Interferon response factor 3 is crucial to poly-I:C induced NK cell activity and control of B16 melanoma growth. *Cancer Lett.* 2014 28;346(1):122-8.

Mori T, Anazawa Y, Iizumi M, Fukuda S, Nakamura Y, Arakawa H. Identification of the interferon regulatory factor 5 gene (IRF-5) as a direct target for p53. *Oncogene.* 2002 25;21(18):2914-8.

Morrison SJ, Uchida N, Weissman IL. The biology of hematopoietic stem cells. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 1995;11:35-71.

Mufti GJ. Pathobiology, classification, and diagnosis of myelodysplastic syndrome. *Best Pract Res Clin Haematol.* 2004;17(4):543-57.

Murtas D, Maric D, De Giorgi V, Reinboth J, Worschech A, Fetsch P, Filie A, Ascierto ML, Bedognetti D, Liu Q, Uccellini L, Chouchane L, Wang E, Marincola FM, Tomei S. IRF-1 responsiveness to IFN- γ predicts different cancer immune phenotypes. *Br J Cancer.* 2013;109(1):76-82.

Nehyba J, Hrdlicková R, Bose HR. Dynamic evolution of immune system regulators: the history of the interferon regulatory factor family. *Mol Biol Evol.* 2009; 26(11):2539-50.

Nelson N, Marks MS, Driggers PH, Ozato K. Interferon consensus sequence-binding protein, a member of the interferon regulatory factor family, suppresses interferon-induced gene transcription. *Mol Cell Biol.* 1993; 13(1):588-99.

Nguyen H, Hiscott J and Pitha PM. The growing family of interferon regulatory factors. *Cytokine Growth factor Rev.* 1997;8(4): 293-312.

Ning S, Pagano JS, Barber GN. IRF7: activation, regulation, modification and function. *Genes Immun.* 2011;12(6):399-414.

Ogawa M. Differentiation and proliferation of hematopoietic stem cells. *Blood*. 1993;81(11):2844-53.

Orkin SH. Diversification of haematopoietic stem cells to specific lineages. *Nat Rev Genet*.2000;1(1):57-64.

Osawa M, Hanada K, Hamada H, Nakauchi H. Long-term lymphohematopoietic reconstitution by a single CD34-low/negative hematopoietic stem cell. *Science*. 1996; 273(5272):242-5.

Ozato K, Yailor P, Kubota T. The interferon regulatory factor in host defense: mechanism action. *The Journal of Biological Chemistry*. 2007; 282:20065-20069.

Papaemmanuil E, Cazzola M, Boultonwood J, Malcovati L, Vyas P, Bowen D, Pellagatti A, Wainscoat JS, Hellstrom-Lindberg E, Gambacorti-Passerini C, Godfrey AL, Rapado I, Cvejic A, Rance R, McGee C, Ellis P, Mudie LJ, Stephens PJ, McLaren S, Massie CE, Tarpey PS, Varela I, Nik-Zainal S, Davies HR, Shlien A, Jones D, Raine K, Hinton J, Butler AP, Teague JW, Baxter EJ, Score J, Galli A, Della Porta MG, Travaglino E, Groves M, Tauro S, Munshi NC, Anderson KC, El-Naggar A, Fischer A, Mustonen V, Warren AJ, Cross NC, Green AR, Futreal PA, Stratton MR, Campbell PJ; Chronic Myeloid Disorders Working Group of the International Cancer Genome Consortium. Somatic SF3B1 mutation in myelodysplasia with ring sideroblasts. *N Engl J Med*. 2011;13;365(15):1384-95.

Papaemmanuil E, Gerstung M, Malcovati L, Tauro S, Gundem G, Van Loo P, Yoon CJ, Ellis P, Wedge DC, Pellagatti A, Shlien A, Groves MJ, Forbes SA, Raine K, Hinton J, Mudie LJ, McLaren S, Hardy C, Latimer C, Della Porta MG, O'Meara S, Ambaglio I, Galli A, Butler AP, Walldin G, Teague JW, Quek L, Sternberg A, Gambacorti-Passerini C, Cross NC, Green AR, Boultonwood J, Vyas P, Hellstrom-Lindberg E, Bowen D, Cazzola M, Stratton MR, Campbell PJ; Chronic Myeloid Disorders Working Group of the International Cancer Genome Consortium. Clinical and biological implications of driver mutations in myelodysplastic syndromes. *Blood*. 2013;122(22):3616-27;

PFAFFL, M. W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res.*, 29: 45, 2001.

Pimenta EM, Barnes BJ. A conserved region within interferon regulatory factor 5 controls breast cancer cell migration through a cytoplasmic and transcription-independent mechanism. *Mol Cancer*. 2015;14(1):32

Pinheiro RF, Chauffaille ML. Comparison of I-FISH and G-banding for the detection of chromosomal abnormalities during the evolution of myelodysplastic syndrome. *Braz J Med Biol Res* 2009; 42:1110-2.

Pinheiro RF, Chauffaille MLLF. Síndrome mielodisplásica secundária à quimio ou radioterapia – SMD relacionada a tratamento. *Rev Bras Hematol Hemoter* 2006; 28:201-3.

– Pinheiro RF, Metze K, Silva MR, Chauffaille M de L. The ambiguous role of interferon regulatory factor-1 (IRF-1) immunoexpression in myelodysplastic syndrome. *Leuk Res*. 2009 ;33(10):1308-12.

Qian J, Chen XX, Qian W, Yang J, Wen XM, Ma JC, Deng ZQ, Qian Z, Zhang YY, Lin J. Aberrant hypermethylation of CTNNA1 gene is associated with higher IPSS risk in patients with myelodysplastic syndrome. *Clin Chem Lab Med*. 2014;52(12):1859-65.

RAZA, A. et al. The biology of myelodysplastic syndromes: unity despite heterogeneity. *Hematol.Reports* v.2:e4, p.28-31, 2010.

Ren G, Cui K , Zhang1 Z, Zhao K. Division of labor between IRF1 and IRF2 in regulating different stages of transcriptional activation in cellular antiviral activities Ren et al. *Cell & Bioscience* (2015) 5:17

Romeo M, Chauffaille Mde L, Silva MR, Bahia DM, Kerbaux J. Comparison of cytogenetics with FISH in 40 myelodysplastic syndrome patients. *Leuk Res* 2002; 26:993-6.

Romieu-Mourez R, Solis M, Nardin A, Goubau D, Baron-Bodo V, Lin R, et al. Distinct roles for IFN regulatory factor (IRF)-3 and IRF7 in the activation of antitumor properties of human macrophages. *Cancer Res*. 2006; 66:10576–10585.

Rosenbauer F, Tenen DG. Transcription factors in myeloid development: balancing differentiation with transformation. *Nat Rev Immunol*. 2007; 7(2):105-17.

Ryzhakov G, Eames HL, Udalova IA.
Activation and function of interferon regulatory factor 5. J Interferon Cytokine
Res. 2015;35(2):71-8.

Schiavoni G, Gabriele L, Mattei F. The dual role of IRF8 in cancer immunosurveillance.
Oncoimmunology. 2013;2(8):e25476.

Schmidt M, Hochhaus A, Nitsche A, Hehlmann R, Neubauer A. Expression of nuclear
transcription factor interferon consensus sequence binding protein in chronic myeloid
leukemia correlates with pretreatment risk features and cytogenetic response to interferon-
alpha. Blood. 2001;97(11):3648-50.

Schmidt M, Nagel S, Proba J, Thiede C, Ritter M, Waring JF et al. Lack of interferon
consensus sequence binding protein (ICSBP) transcripts in human myeloid leukemias. Blood
1998; 91: 22–29

Schutte BC, Hendrix MJ. Mammary serine protease inhibitor (Maspin) binds directly to
interferon regulatory factor 6: identification of a novel serpin partnership. J Biol
Chem. 2005;280(40):34210-7

Shen L, Kantarjian H, Guo Y, Lin E, Shan J, Huang X, Berry D, Ahmed S, Zhu W, Pierce S,
Kondo Y, Oki Y, Jelinek J, Saba H, Estey E, Issa JP. DNA methylation predicts survival and
response to therapy in patients with myelodysplastic syndromes. J Clin Oncol. 2010
;28(4):605-13.

Shin SH, Kim BH, Jang JJ, Suh KS, Kang GH. Identification of novel methylation markers in
hepatocellular carcinoma using a methylation array. J Korean Med Sci. 2010;25(8):1152-9.

Sloand, E. M. ; Barrett, A. J. Immunosuppression for myelodysplastic syndrome: how bench
to bedside to bench research led to success. Hematol.Oncol.Clin.North Am., v. 24, n. 2, p.
331-341, 2010.

Solé F, Luno E, Sanzo C, Espinet B, Sanz GF, Cervera J, Calasanz MJ, Cigudos JC, Milla F,
Ribera JM, Bureo E, Martin ML, Arranz E, Florensa L. Identification o novel cytogenetic
markers with prognostic significance in a series of 968 patients with primary myelodysplastic

syndromes. *Haematologica*. 2005;90(9):1168-78.

Stellacci E, Testa U, Petrucci E, Benedetti E, Orsatti R, et al. Interferon regulatory factor-2 drives megakaryocytic differentiation. *Biochem. J*. 2004; 377:367–78.

Suzuki M, Ikeda K, Shiraishi K, Eguchi A, Mori T, Yoshimoto K, Shibata H, Ito T, Baba Y, Baba H. Aberrant methylation and silencing of IRF8 expression in non-small cell lung cancer. *Oncol Lett*. 2014;8(3):1025-1030. Epub 2014 Jun 11.

Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, et al. WHO classification of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues. Lyon: IARC Press; 2008. (IARC WHO Classification of Tumours, n° 2).

Tahiliani, M. et al. Conversion of 5 -methylcytosine to 5-hydroxymethylcytosine in mammalian DNA by MLL partner TET1. *Science* 324 , 930–935 (2009).

Takaoka A, Tamura T, Taniguchi T. Interferon regulatory factor family of transcription factors and regulation of oncogenesis. *Cancer Sci*. 2008; 99(3):467-78.

Tamura T, Nagamura-Inoue T, Shmeltzer Z, Kuwata T, Ozato K. ICSBP directs bipotential myeloid progenitor cells to differentiate into mature macrophages. *Immunity*

Tanaka N, Ishihara M, Lamphier MS, Nozawa H, Matsuyama T, Mak TW, Aizawa S, Tokino T, Oren M, Taniguchi T. Cooperation of the tumour suppressors IRF-1 and p53 in response to DNA damage. *Nature*. 1996; 382(6594):816-8.

Taniguchi T, Ogasawara K, Takaoka A, Tanaka N. IRF family of transcription factors as regulators of host defense. *Annu. Rev. Immunol*. 2001;19:623–55.

Tefferi A, Vardiman JW. Myelodysplastic syndromes. *N Engl J Med*. 2009;361(19):1872-85.

Tenen DG, Hromas R, Licht JD, Zhang DE. Transcription factors, normal myeloid development, and leukemia. *Blood*. 1997;90(2):489-5

Tenen DG. Disruption of differentiation in human cancer: AML shows the way. *Nat Rev Cancer*. 2003;3(2):89-101.

Testa U, Stellacci E, Pelosi E, Sestili P, Venditti M, et al. 2004. Impaired myelopoiesis in mice devoid of interferon regulatory factor 1. *Leukemia* 18:1864–71.

Tokunaga T, Naruke Y, Shigematsu S, Kohno T, Yasui K, Ma Y, Chua KJ, Katayama I, Nakamura T, Hishikawa Y, Koji T, Yatabe Y, Nagayasu T, Fujita T, Matsuyama T, Hayashi H. Aberrant expression of interferon regulatory factor 3 in human lung cancer. *Biochem Biophys Res Commun.* 2010;397(2):202-7.

Tormo, M; Marugan, I; Calabuig, M. Myelodysplastic syndromes: an update on molecular pathology. *Clin.Transl.Oncol.*, v. 12, n. 10, p. 652-661, 2010.

Trost D, Hildebrandt B, Muller N, Germing U, Royer-Pokora B. Hidden chromosomal aberrations are rare in primary myelodysplastic syndromes with evolution to acute myeloid leukaemia and normal cytogenetics. *Leuk Res.* 2004;28(2):171-7.

Voulgarelis, M. et al. Myelodysplasia-associated autoimmunity: clinical and pathophysiologic concepts. *Eur.J.Clin.Invest*, v. 34, n. 10, p. 690-700, 2004.

Wang H, Lee CH, Qi C, Taylor P, Feng J, Abbasi S, Atsumi T, Morse HC 3rd. IRF8 regulates myeloid and B lymphoid lineage diversification. *Immunol Res.* 2009;43(1-3):109-17.

Wang H, Lee CH, Qi C, Taylor P, Feng J, Abbasi S, Atsumi T, Morse HC 3rd. IRF8 regulates myeloid and B lymphoid lineage diversification. *Immunol Res.* 2009;43(1-3):109-17.

Wang H, Morse HC 3rd. IRF8 regulates myeloid and B lymphoid lineage diversification. *Immunol Res.* 2009;43(1-3):109-17.

Wang H, Morse HC 3rd. IRF8 regulates myeloid and B lymphoid lineage diversification. *Immunol Res.* 2009;43(1-3):109-17.

Wang JC, Dick JE. Cancer stem cells: lessons from leukemia. *Trends Cell Biol.* 2005;15(9):494-501.

Wang JC, Dick JE. Cancer stem cells: lessons from leukemia. *Trends Cell Biol.* 2005;15(9):494-501.

Wang L, Yao ZQ, Moorman JP, Xu Y, Ning S. Gene expression profiling identifies IRF4-associated molecular signatures in hematological malignancies. *PLoS One*. 2014 10;9(9):e106788.

Wang Y, Liu D, Chen P, Koeffler HP, Tong X, Xie D. Involvement of IFN Regulatory Factor (IRF)-1 and IRF-2 in the Formation and Progression of Human Esophageal Cancers. *Cancer Res*. 2007;67(6):2535-43.

Wang Y, Liu DP, Chen PP, Koeffler HP, Tong XJ, Xie D. Involvement of IFN regulatory factor (IRF)-1 and IRF-2 in the formation and progression of human esophageal cancers. *Cancer Res*. 2007; 67(6):2535-43.

Wang Y, Liu DP, Chen PP, Koeffler HP, Tong XJ, Xie D. Involvement of IFN regulatory factor (IRF)-1 and IRF-2 in the formation and progression of human esophageal cancers. *Cancer Res*. 2007; 67(6):2535-43.

Watowich SS, Wu H, Scolovsky M, Klimgmuller U, Constantinescu SN, Lodish HF. Cytokine receptor signal transduction and the control of hematopoietic cell development. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol*. 1996; 12:91-128.-

Watowich SS, Wu H, Scolovsky M, Klimgmuller U, Constantinescu SN, Lodish HF. Cytokine receptor signal transduction and the control of hematopoietic cell development. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol*. 1996; 12:91-128.-

Weilemann A, Grau M, Erdmann T, Merkel O⁴, Sobhiafshar U, Anagnostopoulos I, Hummel M, Siegert A, Hayford C, Madle H, Wollert-Wulf B, Fichtner I, Dörken B, Dirnhofer S, Mathas S, Janz M, Emre NC, Rosenwald A, Ott G, Lenz P, Tzankov A, Lenz G. Essential role of IRF4 and MYC signaling for survival of anaplastic large cell lymphoma. *Blood*. 2015 Jan 1;125(1):124-32.

Weissman IL, Anderson DJ, Gage F. Stem and progenitor cells: origins, phenotypes, lineage commitments, and transdifferentiations. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 2001;17:387-403. Review.

Weissman IL, Anderson DJ, Gage F. Stem and progenitor cells: origins, phenotypes, lineage commitments, and transdifferentiations. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 2001;17:387-403. Review.

Weisz A, Marx P, Sharf R, Appella E, Driggers PH, Ozato K, Levi BZ. Human interferon consensus sequence binding protein is a negative regulator of enhancer elements common to interferon-inducible genes. *J Biol Chem.* 1992; 267(35):25589-96.

Weisz A, Marx P, Sharf R, Appella E, Driggers PH, Ozato K, Levi BZ. Human interferon consensus sequence binding protein is a negative regulator of enhancer elements common to interferon-inducible genes. *J Biol Chem.* 1992; 267(35):25589-96.

Willman CL, Sever CE, Pallavicini MG, Harada H, Tanaka N, Slovak ML, Yamamoto H, Harada K, Meeker TC, List AF, et al. Deletion of IRF-1, mapping to chromosome 5q31.1, in human leukemia and preleukemic myelodysplasia. *Science.* 1993;259(5097):968-71.

Willman CL, Sever CE, Pallavicini MG, Harada H, Tanaka N, Slovak ML, Yamamoto H, Harada K, Meeker TC, List AF, et al. Deletion of IRF-1, mapping to chromosome 5q31.1, in human leukemia and preleukemic myelodysplasia. *Science.* 1993;259(5097):968-71.

Willman CL, Sever CE, Pallavicini MG, Harada H, Tanaka N, Slovak ML, Yamamoto H, Harada K, Meeker TC, List AF, et al. Deletion of IRF-1, mapping to chromosome 5q31.1, in human leukemia and preleukemic myelodysplasia. *Science.* 1993;259(5097):968-71.

Wong YF, Micklem CN, Taguchi M, Itonaga H, Sawayama Y, Imanishi D, Nishikawa S, Miyazaki Y, Jakt LM. Longitudinal Analysis of DNA Methylation in CD34+ Hematopoietic Progenitors in Myelodysplastic Syndrome. *Stem Cells Transl Med.* 2014;3(10):1188-98..

Xi, H. and Blanck, G. (2000) Interferon regulatory factor-2 point mutations in human pancreatic tumors. *Inter. J. Cancer,* 87: 803-808.

Xu J, Shao Z, Glass K, Bauer DE, Pinello I, Handel BV, Hou S, Stamatoyannopoulos JA, Mikkola KKA, Yuan G, Stuart H, Orkin SH. Combinatorial Assembly of developmental Stage-Specific Enhancers Controls Gene Expression Programs during Human Erythropoiesis *Dev Cell.* 2012; 16; 23(4): 796–811

Yamamoto M, Kato T, Hotta C, Nishiyama A, Kurotaki D, Yoshinari M, Takami M, Ichino M, Nakazawa M, Matsuyama T, Kamijo R, Kitagawa S, Ozato K, Tamura T. Shared and

distinct functions of the transcription factors IRF4 and IRF8 in myeloid cell development. PLoS One. 2011;6(10):e25812

Young, N. S.; Abkowitz, J. L.;Luzzatto, L. New Insights into the Pathophysiology of Acquired Cytopenias. Hematology.Am.Soc.Hematol.Educ.Program., p. 18-38, 2000.

Yu Q, Katlinskaya YV, Carbone CJ, Zhao B, Katlinski KV, Zheng H, Guha M, Li N, Chen Q, Yang T, Lengner CJ, Greenberg RA,Johnson FB, Fuchs SY. DNA Damage induced Type I Interferon Promotes Senescence and Inhibits Stem Cell Function. Cell Rep. 2015;11(5):785-97.

Zardo G, Cimino G, Nervi C. Epigenetic plasticity of chromatin in embryonic and hematopoietic stem/progenitor cells: therapeutic potential of cell reprogramming. Leukemia. 2008 22(8):1503-18.

Zardo G, Cimino G, Nervi C. Epigenetic plasticity of chromatin in embryonic and hematopoietic stem/progenitor cells: therapeutic potential of cell reprogramming. Leukemia. 2008 22(8):1503-18.

Zhang Q, Zhang L, Li L, Wang Z, Ying J, Fan Y, Xu B, Wang L, Liu Q, Chen G, Tao Q, Jin J. Interferon regulatory factor 8 functions as a tumor suppressor in renal cell carcinoma and its promoter methylation is associated with patient poor prognosis. Cancer Lett. 2014 28;354(2):227-34.

Zon LI. Intrinsic and extrinsic control of haematopoietic stem-cell self-renewal. Nature. 2008 15;453(7193):306-13.

Zon LI. Intrinsic and extrinsic control of haematopoietic stem-cell self-renewal. Nature. 2008 15;453(7193):306-13

