



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
DEPARTAMENTO DE PATOLOGIA E MEDICINA LEGAL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PATOLOGIA
MESTRADO EM PATOLOGIA**

GABRIELLE MELO CAVALCANTE

**ANÁLISE DO PERFIL GLOBAL DE METILAÇÃO DO DNA DE PACIENTES
COM SÍNDROME MIELODISPLÁSICA**

FORTALEZA

2020

GABRIELLE MELO CAVALCANTE

ANÁLISE DO PERFIL GLOBAL DE METILAÇÃO DO DNA DE PACIENTES
COM SÍNDROME MIELODISPLÁSICA

Defesa apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de mestrado em Patologia
Área de concentração: Medicina II

Orientador: Prof. Dr. Ronald Feitosa Pinheiro.
Coorientador: Prof. Dr. Howard Lopes Ribeiro Junior.

FORTALEZA

2020

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)

- C364 Cavalcante, Gabrielle Melo.
ANÁLISE DO PERFIL GLOBAL DE METILAÇÃO DO DNA DE PACIENTES COM SÍNDROME
MIELODISPLÁSICA / Gabrielle Melo Cavalcante. – 2020.
84 f. : il. color.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Patologia, Fortaleza, 2020.

Orientação: Prof. Dr. Ronald Feitosa Pinheiro.

Coorientação: Prof. Dr. Howard Lopes Ribeiro Junior.

1. Síndrome mielodisplásica. 2. metilação. 3. hidroximetilcitosina. 4. Metilcitosina. 5. imunohistoquímica.
I. Título.

CDD 571.9

GABRIELLE MELO CAVALCANTE

ANÁLISE DO PERFIL GLOBAL DE METILAÇÃO DO DNA DE PACIENTES
COM SÍNDROME MIELODISPLÁSICA

Defesa apresentada ao Programa de Pós-
Graduação em Patologia da Universidade
Federal do Ceará, como requisito parcial à
obtenção do título de mestrado em Patologia
Área de concentração: Medicina II

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Ronald Feitosa Pinheiro
Universidade Federal do Ceará

Prof.^a Dr.^a. Silva Maria Meira Magalhães
Universidade Federal do Ceará

Prof.^a.Dr Gilvan Pessoa Furtado
Fiocruz- CE

Dr. Francisco Dário Rocha Filho
Universidade federal do Ceará

AGRADECIMENTOS

A **Deus**, por ter permitido que eu chegasse até aqui e por ter me sustentado em todos os momentos.

Aos meus pais **Dianeide Melo Cavalcante** e **Nilton Cavalcante** pelo apoio, compreensão e amor incondicionais, por sempre acreditarem em mim, me incentivarem e quererem o meu melhor. Nunca terei como agradecer-los o suficiente.

Ao meu namorado **Hamilton Andrade Leite Junior**, que teve um papel importantíssimo durante toda essa etapa e espero que faça parte de muitas outras, e por quem tenho amor imenso.

Às minhas melhores amigas, **Suzana Pinheiro Gomes** e **Morgana Pio Fonseca**, com quem compartilho todos os momentos e pela amizade de sempre, por serem um apoio na vida.

Ao meu orientador **Dr. Ronald Feitosa Pinheiro**, por ter me dado a oportunidade de participar deste grupo, pelos conhecimentos compartilhados e pela confiança depositada.

Ao meu coorientador **Howard Lopes Ribeiro Jr**, por todas as orientações e estímulos, por sempre torcer pelo nosso sucesso.

Aos membros das bancas de qualificação e defesa, **Silva Maria Meira Magalhães**, **Cristiana Libardi Miranda Furtado** e **Gilvan Pessoa Furtado**, por terem aceitado o convite e pela boa vontade que sempre dispõem em ajudar e contribuir cientificamente.

Ao **Dr. Dário Filho**, pela disponibilidade, pela atenção e experiências doadas para a conclusão desse trabalho.

À **Daniela Borges**, cuja participação foi essencial para a conclusão desse trabalho. Pela disponibilidade em ajudar, pelo otimismo, por tornar a caminhada mais fácil e pela amizade.

Aos meus companheiros e amigos de dia a dia **Mayara Magna**, **João Victor Alves** e **Sharlene Monteiro**, compartilhando todos os momentos de desespero e de realizações, pelos momentos de amizade e de companheirismo.

Ao Laboratório Citogenômica do Câncer (**Roberta, Dani, Izabelle, Marília, Cris, Mayara, Manuela, Sharlene, Gabriel, Wesley, Caio, Victor, Leticia, Vanessa, Breno, Thayres e Gustavo**), por todos os momentos de companheirismo, brincadeiras, aprendizado, por fazerem parte da minha vida e por tornarem o meu dia-a-dia mais leve e mais alegre.

Um agradecimento especial a todos os integrantes do laboratório de Histopatologia (**Dayrine, Paulo e Alceu**) e a professora **Ana Paula Negreiros**, que me ajudaram em todos os procedimentos de imuno-histoquímica desse estudo, além de toda a disponibilidade para tirar qualquer dúvida.

Ao **CNPq** e à **CAPES** pelo apoio financeiro a essa pesquisa.

“A dor e a emoção pela fé e o amor, até encontrar o nosso caminho neste ciclo, neste ciclo sem-fim.”

O rei leão

RESUMO

A síndrome mielodisplásica (SMD) caracteriza-se por um grupo heterogêneo de doenças clonais da célula progenitora hematopoiética caracterizada por citopenias, displasias de uma ou mais linhagens celulares, hematopoese ineficaz e risco de progressão para leucemia mieloide aguda. A patogênese da SMD envolve alterações epigenéticas, citogenéticas e/ou mutações gênicas em até 80% dos casos e acredita-se que estas alterações sejam decorrentes de lesões no DNA, após exposição a agentes endógenos, exógenos/ambientais, físicos, químicos e biológicos, que causam instabilidade genômica. A metilação do DNA alterada aparece como participante na fisiopatologia molecular da doença, ativando ou inativando os genes envolvidos no crescimento, diferenciação e apoptose. Os objetivos desse estudo foram avaliar o perfil global de metilação e hidroximetilação do DNA (5-metilcitosina e 5-hidroximetilcitosina) em pacientes portadores de síndrome mielodisplásica (SMD) e correlacionar os níveis de 5-hidroximetilcitosina e 5-metilcitosina com os níveis de expressão gênica dos genes relacionados ao ciclo celular e fuso mitótico (*AURKA*, *AURKB*, *MAD2*, *CDC20*, *TPX2*), ao reparo do DNA (*ATM*, *RAD51*, *LIG 4*, *BRCA1*, *BRCA2*, *XRCC5*, *XRCC6*, *XPA*, *XPC*, *XPG*, *CSA* e *CSB*) e polimerases com atividade de translesão (*REV3L*, *REV1*, *POLI*, *POLH*, *POLL*, *POLK*, *POLQ*, *POLN* e *PCNA*). Foram avaliados 73 pacientes com SMD diagnosticados em hospital terciário de referência e 10 controles. Para o estudo citogenético foi realizado o exame de cariótipo por Banda-G e para a análise de metilação global do DNA foi feita a imuno-histoquímica dos marcadores de metilação global 5-metilcitosina (5mC) e 5-hidroximetilcitosina (5hmC), em biopsia de medula (BM). Foi realizada a avaliação de escore de células hematopoiéticas da medula óssea marcadas e feita a associação da metilação global do DNA com os achados de alterações cromossômicas, variáveis clínico-laboratoriais, expressões gênicas e à sobrevida dos pacientes, buscando novos biomarcadores e/ou possíveis alvos terapêuticos para a SMD. Identificamos aumento dos níveis de 5mC em pacientes com cariótipo alterado ($p = 0,022$) e uma diminuição de 5hmC em pacientes com mais de 60 anos ($p = 0,044$) com um aumento do ratio 5mC/5hmC ($p = 0,017$). Comparando pacientes com SMD e controles saudáveis, observamos um aumento do ratio de 5mC/5hmC no grupo com SMD ($p = 0,039$). Adicionalmente, os pacientes com SMD foram divididos em formas inicial (SMD-DU, SMD-DM e SMD-SA) e avançada (SMD-EB 1 e 2) com base na classificação da OMS de 2016 e observamos que o ratio de 5mC/5hmC apresentou-se maior nos pacientes classificados nas formas avançadas ($p = 0,040$). Com relação a celularidade da medula óssea verificamos que pacientes com medula hipercelular apresentavam aumento do ratio de 5hmC/5mC ($p=0.011$). Ao realizar as correlações de expressão gênica e os níveis de metilação global, verificamos que os genes das polimerases com atividade de translesão (TLS) foram encontradas moderadas correlações para os genes *REV1* ($p = 0.049$), *POLK* ($p = 0.036$), *POLQ* ($p = 0.001$) e *PCNA* ($p=0.020$) onde verificamos que quando os padrões de metilcitosina estavam altos quando a expressão apresentava-se diminuída. Estes resultados suportam a importância da regulação da metilação global do DNA como participante na manutenção da estabilidade genômica das células tronco hematopoiéticas promovendo um melhor entendimento da etiologia, estratificação diagnóstica e prognóstica da Síndrome Mielodisplásica, demonstrando que a desregulação nesse processo pode estar envolvida na patogênese e evolução da doença.

Palavra-chave: Síndrome mielodisplásica. Metilação. Metilcitosina. Hidroximetilcitosina. Imuno-histoquímica.

ABSTRACT

Myelodysplastic syndrome (MDS) is characterized by a heterogeneous group of hematopoietic progenitor cell clonal diseases, identified by insufficient bone marrow and increased apoptosis, which leads to inefficient hematopoiesis and cytopenia in the peripheral blood of one or more strains. The pathogenesis of MDS involves epigenetic, cytogenetic and / or gene mutations in up to 80% of cases and it is believed that these changes are due to DNA damage, after exposure to endogenous, exogenous / environmental, physical, chemical and biological agents, that cause genomic instability. The altered DNA methylation appears as a participant in the molecular pathophysiology of the disease, activating or inactivating the genes involved in growth, differentiation and apoptosis. The objectives of this study were to evaluate the global profile of DNA methylation and hydroxymethylation (5-methylcytosine and 5-hydroxymethylcytosine) in patients with myelodysplastic syndrome (MDS) and to correlate the levels of 5-hydroxymethylcytosine and 5-methylcytosine with the levels of expression of genes related to the cell cycle and mitotic spindle (AURKA, AURKB, MAD2, CDC20, TPX2), DNA repair (ATM, RAD51, LIG 4, BRCA1, BRCA2, XRCC5, XRCC6, XPA, XPC, XPG, CSA and CSB) and polymerases with translesion activity (REV3L, REV1, POLI, POLH, POLL, POLK, POLQ, POLN and PCNA). 73 patients with MDS diagnosed at a tertiary referral hospital and 10 controls were evaluated. For the cytogenetic study, the karyotype exam was performed by G-Band and for the global DNA methylation analysis, immunohistochemistry of the global methylation markers 5-methylcytosine (5mC) and 5-hydroxymethylcytosine (5hmC) was performed, in biopsy of marrow (BM). The scoring of marked bone marrow hematopoietic cells was performed and the association of global DNA methylation with the findings of chromosomal changes, clinical and laboratory variables, gene expressions and patient survival was made, looking for new biomarkers and / or possible targets treatments for MDS. We identified an increase in levels of 5mC in patients with altered karyotype ($p = 0.022$) and a decrease of 5hmC in patients older than 60 years ($p = 0.044$) with an increase in the 5mC / 5hmC ratio ($p = 0.017$). Comparing patients with MDS and healthy controls, we observed an increase in the ratio of 5mC / 5mC in the group with MDS ($p = 0.039$). Additionally, patients with MDS were divided into initial (SMD-CRDU, SMD-CRDM and SMD-SA) and advanced (SMD-EB 1 and 2) forms based on the 2016 WHO classification and we observed that the ratio of 5mC / 5hmC was higher in patients classified as advanced forms ($p = 0.040$). Regarding bone marrow cellularity, we found that patients with hypercellular marrow had an increase in the ratio of 5hmC / 5mC ($p = 0.011$). When carrying out gene expression correlations and global methylation levels, we found that the polymerase genes with translesion activity (TLS) were found to have moderate correlations for the REV1 ($p = 0.049$), POLK ($p = 0.036$), POLQ ($p = 0.001$) and PCNA ($p = 0.020$) where we found that when methylcytosine standards were high when expression was reduced. These results support the importance of the regulation of global DNA methylation as a participant in maintaining the genomic stability of hematopoietic stem cells, promoting a better understanding of the etiology, diagnostic and prognostic stratification of the Myelodysplastic Syndrome, demonstrating that deregulation in this process may be involved in the pathogenesis and evolution of the disease.

Keywords: Myelodysplastic syndrome. Methylation. Methylcytosine. Hydroxymethylcytosine. Immunohistochemistry.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Processo de Metilação do DNA pela enzima DNA metiltransferase.	17
Figura 2: Mecanismos metabólitos associados ao processo de metilação e hidroxilação do DNA.	18
Figura 3: Mecanismos de Patogênese da SMD.....	22
Figura 4: Classificação prognóstica do IPSS-R de acordo com as categorias citogenéticas	23
Figura 5: Categorias de risco e escores prognósticos segundo o IPSS-R	23
Figura 6: Mecanismo de ação do gene p15 quando alterado	26
Figura 7: Função da proteína IDH1 na fisiologia normal e na doença..	28
Figura 8: Representação esquemática da metodologia de <i>tissue microarray</i>	34
Figura 9: Exposição da metodologia realizada	34
Figura 10: Delineamento experimental do projeto.....	36
Figura 11: Compilado de imagens de marcação dos anticorpos 5hmC e 5mC em biopsias de pacientes com SMD	37
Figura 12: Achados de resultados de cariótipo da população do estudo.....	43
Figura 13: Níveis de M-score 5hmC frente a variável idade..	49
Figura 14: Níveis de M-score 5mC frente a variável citogenética.....	50
Figura 15: Níveis de relação 5hmC/5mC frente a variável grupos.....	51
Figura 16: Níveis de relação 5hmC/5mC frente a variável celularidade..	52
Figura 17: Níveis de relação 5mC/5hmC frente as variavel formas iniciais e avançadas.....	53
Figura 18: Níveis de relação 5mC/5hmC frente a variável idade	54
Figura 19: Níveis de relação 5mC/5hmC frente a variável celularidade..	55
Figura 20: Níveis de relação 5mC/5hmC frente a variável diseritropoiese.	56
Figura 21: Níveis de relação 5mC/5hmC frente a variável hemoglobina	57
Figura 22: Níveis de relação 5mC/5hmC frente a variável contagem absoluta de neutrófilo	57
Figura 23: Níveis de relação 5mC/5hmC frente a variável contagem de plaquetas..	58
Figura 24: Representação esquememática dos resultados encontrados	59
Figura 24: Gráfico de correlação de pearson entre a expressão das polimerases com atividade de translesão, POLH e REV3L e a relação 5mC/5hmC.	60
Figura 25: Gráfico de correlação de spearman entre a expressão das polimerases com atividade de translesão, PCNA e POLK e a relação 5mC/5hmC.....	60
Figura 26: Gráfico de correlação de pearson entre a expressão das polimerases com atividade de translesão, POLH e REV3L, e a relação 5mC/5hmC.....	61

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Frequência de metilação dos principais genes relacionadas à síndrome mielodisplásica.	25
Tabela 2: Frequência das variáveis clínicas dos pacientes.....	41
Tabela 3: Caracterização dos pacientes segundo a classificação da OMS 2016.....	42
Tabela 4: Caracterização citogenética e prognósticas IPSS.....	44
Tabela 5: Descrição clínica dos pacientes	45
Tabela 6: Caracterização da expressão gênica do estudo.....	60

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

2HG	<i>Hidroxietoglutarato</i>
5CAC	<i>5-Carboxilcitosina</i>
5FC	<i>5-Formilcitosina</i>
5HMC	<i>5-Hidroximetilcitosina</i>
5MC	<i>5-Metilcitosina</i>
ANC	<i>Contagem de leucocitos</i>
AR	<i>Anemia refratária.</i>
AREB I	<i>Anemia refratária com excesso de blastos tipo 1.</i>
AREB II	<i>Anemia refratária com excesso de blastos tipo 2.</i>
ARSA	<i>Anemia refrataria com excesso de sideroblasto em anel.</i>
ATP	<i>Trifosfato de adenosina</i>
CD34	<i>Receptor de Célula progenitora hematopoiética</i>
CDH1	<i>Caderina-1</i>
CH ₃	<i>Grupamento metil.</i>
CMV	<i>Citomegalovírus</i>
CpG	<i>Regiões do DNA de citosinas seguidas de guaninas.</i>
CRDM	<i>Citopenias refratárias com displasias em múltiplas linhagens.</i>
CRDU	<i>Citopenias refratarias com displasia em única linhagem.</i>
CT	<i>Calcitonina</i>
CTNNA1	<i>Proteína associada à caderina</i>
DAPK	<i>Proteína kinase associada a apoptose</i>
DNA	<i>Ácido dioxorribonucleico</i>
DNMT	<i>DNA metiltransferase</i>
FAB	<i>Grupo franco-britânico-americano</i>
FHIT	<i>tríade histidina frágil</i>
HIV	<i>Vírus da imunodeficiência</i>
HPN	<i>Hemoglobinúria</i>
IDH.	<i>Desidrogenase do isocitrato.</i>
LMA	<i>Leucemia mieloide aguda.</i>
LMMC	<i>Leucemia mielomonocítica.</i>
MO	<i>Medula Óssea.</i>

ncRNA	<i>RNA não-codificante</i>
NOR	<i>Neuron-derived orphan receptor 1</i>
-OH	<i>Grupamento hidroxila.</i>
OLIG2	<i>Fator de transcrição de oligodentrocitos</i>
OMS	<i>Organização Mundial da Saúde.</i>
PCNA	<i>Antígeno nuclear de proliferação celular.</i>
PCR	<i>Reação em Cadeia da Polimerase.</i>
PCR	<i>Reação em cadeia de polimerase.</i>
PGRA e PGRB	<i>Receptor de progesterona</i>
POLH	<i>DNA polymerase eta.</i>
POLI	<i>DNA polymerase iota.</i>
POLK	<i>DNA polymerase kappa.</i>
POLL	<i>DNA polymerase lambda.</i>
POLN	<i>DNA polymerase nu.</i>
POLQ	<i>DNA polymerase theta.</i>
POLZ	<i>DNA polymerase zeta.</i>
qPCR	<i>Reação em cadeia da polimerase quantitativa.</i>
RASSF1	<i>Domínio de associação de ras-1</i>
RIL	<i>Interleucina humana recombinada purificada-2</i>
RNA	<i>Ácido ribonucleico</i>
RNA _m	<i>RNA mensageiro</i>
SAM	<i>s-adenosilmetionina</i>
SF3B	<i>fator de splicing</i>
SMD	<i>Síndrome mielodisplásica</i>
TET	<i>Ten-eleven-translocation dioxygenase</i>
TMA	<i>Tissue Microarray.</i>
TLS	<i>Translesão.</i>
TSG	<i>Supressores de tumores.</i>
α-KG	<i>Alfa-cetogluturato.</i>
IHC	<i>Imunohistoquímica.</i>
MAD2	<i>Mitotic arrest defective type 2</i>
Hb	<i>Hemoglobina</i>
Wb	<i>Neutrófilos</i>

TPX2

Xenopus kinesin-like protein 2

CDC20

Cell division cycle 20

SUMÁRIO

RESUMO	6
ABSTRACT	8
LISTA DE FIGURAS	10
LISTA DE TABELAS	11
LISTA DE ABREVIATURAS.....	12
SUMÁRIO.....	14
1. INTRODUÇÃO	16
1.1. Epigenética.....	16
1.2. Metilação do DNA.....	17
1.3. Reversão da metilação do DNA por hidroxilação	20
1.4. Alterações nos padrões de metilação e neoplasia	22
1.5. A Síndrome Mielodisplásica.....	23
1.6. A metilação do DNA como processo neoplásico na Síndrome Mielodisplásica	26
2. OBJETIVOS.....	33
3. MATERIAIS E METÓDOS	34
3.1. Seleção de Amostras	34
3.2. Aspectos Éticos.....	34
3.3. Coleta de Amostras	34
3.4. Cariótipo por Banda G.....	35
3.5. Coleta de biópsias	35
3.6. Técnica de Tissue-Microarray (TMA).....	35
3.6. Imuno-histoquímica (IHC)	37
3.7. Interpretação da Imuno-histoquímica	38
3.8. Análise Estatística.....	40
3.8.1. Análise da associação da imunexpressão e a sobrevida dos pacientes	40
3.9. Variáveis Análisadas.....	41
4. RESULTADOS	43
4.1. Caracterização da população.....	43
4.2. Análise do nível de metilação e hidroximetilação global por imuno-histoquímica em pacientes com SMD	51
4.3. Análise da expressão gênica da população do estudo.....	60
5. DISCUSSÃO.....	63

6. CONCLUSÃO	67
7. REFERÊNCIAS	68
ANEXO.....	79
Apendice.....	82

1. INTRODUÇÃO

1.1. Epigenética

O termo “epigenética” foi definido pelo biólogo e embriologista, Conrad Waddington, no início da década de 1940 (BIRD, 2007). Naquela época havia duas visões predominantes sobre desenvolvimento embrionário, ambas derivadas do século XVII: a pré-formação, que afirmava que todas as características humanas estavam presentes no embrião e precisavam simplesmente crescer ou multiplicar; e a epigênese, que postulava que novos tecidos seriam criados a partir de interações sucessivas de constituintes de um zigoto sem diferenciação já determinada (WADDINGTON, 1957; VAN SPEYBROECK, 2002).

Waddington acreditava que tanto a pré-formação quanto a epigênese poderiam ser complementares, a pré-formação representando a natureza estática do gene e a epigênese representando a natureza dinâmica da expressão do gene. (DEANS, 2015). Então, nos seus estudos sobre a “canalização” do desenvolvimento, teoria de que o genótipo de um organismo responde ao ambiente de uma forma organizada, em uma interação genótipo-genótipo e genótipo-ambiente, essa resposta ocorreria independente de efeitos mutacionais (WADDINGTON, 1942; HAIG, 2004).

Ao longo das décadas de 1980 e 1990, a definição de epigenética se afastou dos processos de desenvolvimento e tornou-se mais generalizado. Por exemplo, em 1982 a epigenética foi descrita como “pertencente à interação de fatores genéticos e processos de desenvolvimento através do qual o genótipo é expresso no fenótipo” (LINCOLN et al. 1982).

Atualmente, a epigenética é definida como mudanças na expressão do gene que não alteram a sequência do DNA, mas que são herdáveis pela mitose ao longo das gerações. Existem algumas características que distinguem a epigenética dos mecanismos da genética: a reversibilidade, os efeitos de posicionamento e a habilidade de agir em distâncias aleatórias maiores do que em um único gene (TANG, HO, 2007).

Os mecanismos de regulação epigenética descritos são: modificações pós-traducionais de histonas, ação de ncRNA (RNA não-codificante) e metilação do DNA. As proteínas de maior importância na estrutura da cromatina, as histonas, podem sofrer modificações químicas como a inclusão de grupos acetil, metil, fosforil, ubiquitina etc. Da mesma forma, a ação de ncRNA intervêm na estabilidade do RNAm (RNA mensageiro), na tradução de RNAm e na conformação da cromatina (TURNER, 2015).

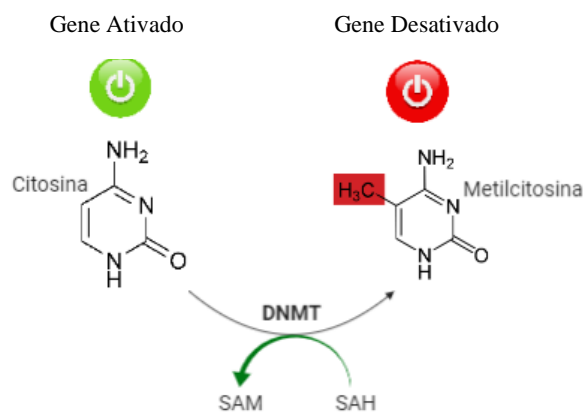
Durante as últimas décadas, muitas pesquisas têm investigado como os mecanismos epigenéticos estão relacionados na reorganização da cromatina, regulando importantes processos no desenvolvimento como, por exemplo, a diferenciação celular. Nesse sentido, chegou-se à conclusão de que a genética e a epigenética funcionam em conjunto nas várias etapas do desenvolvimento humano, bem como nas doenças de caráter neoplásico (DEANS, 2015; THOMSON, 2017).

1.2. Metilação do DNA

Um dos eventos epigenéticos mais estudado até o momento é a metilação do DNA, devido ao papel que desempenha na regulação da expressão de genes essenciais ao organismo e em fenômenos como o *imprinting* genômico, inativação do cromossomo X e no silenciamento de retrotransposons e retrovírus endógenos (KIEFER, 2007; KURIHARA et al., 2008).

A Metilação do DNA é caracterizada por uma modificação covalente na base nitrogenada citosina, na qual um grupamento metil (CH_3) é inserido através de um doador de metil chamado s-adenosilmetionina (SAM) para o carbono 5 de citosinas seguidas de guanina pela ação da família de enzimas que recebem o nome de DNA metiltransferases (DNMT), dando origem a metilcitosina (5-mC) (figura 1) (PAUL e TOLLEFSBOL, 2015; WU e ZHANG, 2017).

Figura 1: Processo de Metilação do DNA pela enzima DNA metiltransferase.



Fonte: Adaptado de Meaney, M (2007).

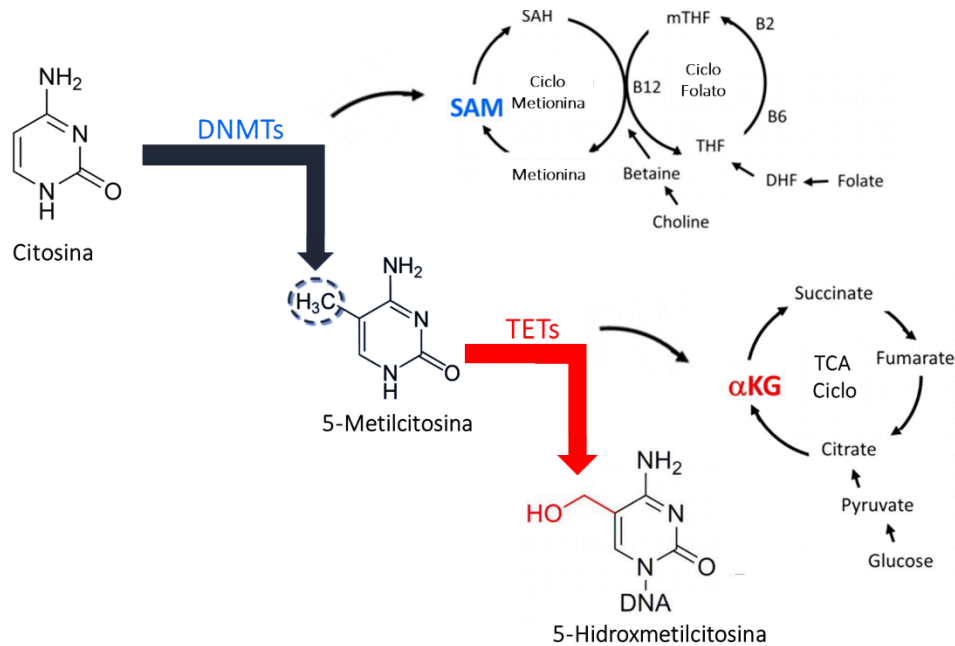
A regulação da expressão gênica por metilação do DNA ocorre devido à inibição direta da ligação dos fatores de transcrição em sequências específicas do DNA, onde se encontram os sítios de ligação e reconhecimento destes mecanismos de metilação (GEIMAN e MUEGGE, 2010).

Essas regiões específicas são as ilhas CpGs ou sítios CpGs, que são definidas como sequências de citosinas seguidas de guaninas assimetricamente distribuídas. Estima-se que as ilhas CpGs estejam presentes em cerca de 50 a 70% de todos os promotores de genes humanos, já as regiões com poucas ilhas CpGs geralmente são localizadas em porções intergênicas e intrônicas (SAXONOV, 2006; TAKAI and JONES, 2002).

Nas células somáticas, especificamente em um gene promotor, a metilação de uma ilha CpG interfere diretamente com a ligação de certos reguladores da transcrição às suas sequências de DNA ou pode também permitir o recrutamento de ligações metil-CpG aos nucleossomos criando um ambiente de cromatina reprimida (BIRD, 2002).

Como já exposto, a reação que resulta na formação da 5-metilcitosina (5mC) será catalisada pela família de enzimas DNA metiltransferases (DNMTs), que são as responsáveis por estabelecer e manter o padrão de metilação. Nas células de mamíferos, podemos encontrar três DNMTs diferentes: DNMT1, DNMT3a e DNMT3b (BESTOR, 2000). As DNMT3A e DNMT3B, atuam metilando preferencialmente DNA não-metilado, portanto estão relacionadas à geração de padrões de metilação *de novo* durante o desenvolvimento embrionário inicial e na gametogênese (OKANO et al., 1999).

Figura 2: Mecanismos metabólitos associados ao processo de metilação e hidroxilação do DNA.



Legenda: Adição de um grupamento metil (H_3C) a extremidade 5' da pirimidina da cadeia da citosina de uma ilha CpG. Essa adição será mediada pela enzima DNA metiltransferase (DMNT). A hidroximetilação da cadeia da citosina metilada, efetuada pela ação do grupo de proteína TETs, que por sua vez irá usar como substratos de reação os metabólitos alfa-cetoglutarato, citrato, succinato.

Fonte: Adaptado de Kim (2019).

A 5-metilcitosina, foco desse estudo, constitui cerca de 1% de todo o DNA e é encontrada quase exclusivamente na metilação de regiões das ilhas CpGs. A maioria das sequências de ilhas CpGs metiladas são encontradas em elementos repetitivos do DNA, sugerindo que a metilação da citosina evoluiu como defesa contra transposons e outros elementos parasitas no nosso DNA. Além disso, os padrões de metilação também mudam dinamicamente na embriogênese, quando a metilação da CpG é essencial para a inativação do cromossomo X e expressão de genes inativos (TAHILIANI, 2009).

1.3. Reversão da metilação do DNA por hidroximetilação

A metilação do DNA tem sua distribuição influenciada pelos processos de demetilação do DNA, que podem ocorrer passivamente, por diluição após replicação do DNA em cada divisão celular sem a ação de enzimas, ou através de um processo ativo iniciado pela família de enzimas *Ten-Eleven-Translocation* 1-3 (TET). Essas enzimas são responsáveis pela conversão catalítica da 5-metilcitosina (5mC) em 5-hidroximetilcitosina (5hmC) e outros produtos de oxidação, incluindo 5-formilcitosina (5fC) e 5-carboxilcitosina (5caC) (MORGAN, 2004; TAHILIANI, 2009; ITO, 2010).

Embora o significado biológico desses derivados de oxidação da 5mC ainda precise ser elucidado, várias linhas de evidência determinaram sua importância na regulação transcricional. De fato, são intermediários nos processos de demetilação do DNA e modificam os padrões de ligação de vários reguladores de cromatina e fatores de transcrição, influenciando assim a transcrição (SPRUIJT, 2013).

A hidroximetilcitosina (5-hmC), também foco desse estudo, é gerada a partir da oxidação da 5-mC pela proteína TET2, ou seja, a adição de um grupamento -OH. Para que essa reação ocorra de forma eficiente, depende da presença de Fe (II), oxigênio molecular e α -KG como co-substratos. A vitamina C e o ATP também atuam aumentando a atividade enzimática do TET (figura 2) (YIN, 2016; FIGUEROA et al., 2010).

Para a obtenção do α -KG, há a necessidade de participação de um grupo composto por cinco proteínas enzimáticas: as isocitrato desidrogenases (IDHs), do qual fazem parte a IDH-1 e a IDH-2. Ambas participam do metabolismo oxidativo do organismo, na produção de NADPH no ciclo de Krebs, a partir da descarboxilação oxidativa do isocitrato à α -cetoglutarato (α KG). Ou seja, o α -KG obtém-se de um isocitrato num processo de catalização pela proteína desidrogenase do isocitrato 1 (IDH1) no citoplasma e pela IDH2 na mitocôndria (FUJII et al, 2016).

1.4. Alterações no perfil de metilação e demetilação: implicações na patogênese de neoplasias

Nas neoplasias, ocorre uma desregulação nos padrões de metilação do DNA que, juntamente com alterações genéticas, atuam na tumorigênese e na manutenção do tumor. A metilação pode atuar tanto inativando genes supressores de tumor como ativando oncogenes (THOMSON, 2017; GAL-YAM, 2008).

Estima-se que 5 a 10% dos promotores estejam hipermetilados nas neoplasias, levando ao silenciamento dos genes (BIRD, 2002). Esse processo acontece, principalmente, em genes supressores de tumores (TSG). O primeiro TSG que foi descrito como silenciado por hipermetilação foi o retinoblastoma (Rb) (GREGER et al., 1989), que está envolvido no controle do ciclo celular. Em seguida, verificou-se que diversos genes hipermetilados estavam envolvidos em processos cruciais, como reparo do DNA (*BRCA1*) (ESTELLER et al., 2000), proliferação celular (*CDKN2A*) (MERLO et al., 1995), adesão celular (*CDH1*) (GRAFF et al., 1995), angiogênese (*BVS*) (HERMAN et al., 1994) e outras funções essenciais.

Cada neoplasia tem um perfil de metilação do DNA que pode ser usado como assinatura para desenvolver biomarcadores de diagnóstico e perspectivas de terapêuticas (COSTELLO et al., 2000; ESTELLER et al., 2001; PAZ et al., 2003). Os padrões de metilação aumentados nas neoplasias conferem às células tumorais uma vantagem proliferativa, que mantém o tumor susceptível a mutações. No entanto, estudos apontam também que a hipermetilação do DNA no câncer pode ser um mecanismo de evento inicial da formação do tumor (ISSA, 2004; FEINBERG et al., 2006; TROYER et al., 2009). Muitos parâmetros, como por exemplo a localização gênica, a sequência do promotor e a atividade de transcrição, são importantes para definir se um promotor será submetido à metilação do DNA durante a tumorigênese (THOMPSON, 2017).

Assim como o aumento da metilação ocorre em variados tipos de neoplasias, as células tumorais também podem ter como característica a diminuição global na metilação do DNA. Sequências hipometiladas desencadeiam a reativação transcricional de sequências de DNA parasitárias ao longo de milhares de anos, como por exemplo os retrovírus endógenos humanos (HERVs), que podem ser aleatoriamente integradas ao genoma, contribuindo para a alta instabilidade genética das células cancerígenas (DANTE et al., 1992; ALVES et al., 1996).

Além disso, foram relatados exemplos de perda de metilação do DNA em genes promotores, levando à sua re-expressão. É o caso da família de genes *MAGE* que normalmente é hipoexpressa em todos os tipos de células, exceto nas células testiculares (DE SMET et al., 1999). Oncogenes como *R-RAS*, *RHOB* e *ELK1* também foram descritos como re-expressos em cânceres gástricos após demetilação de seus promotores (NISHIGAKI et al., 2005). Todos esses eventos participam da tumorigênese nas etapas iniciais e avançadas das neoplasias.

1.5. A Síndrome Mielodisplásica

A síndrome mielodisplásica (SMD), é uma neoplasia hematológica caracterizada por distúrbios originados na célula tronco da medula óssea e apresentam-se como um grupo heterogêneo de doenças hematopoiéticas. Por ser um grupo bastante complexo de doenças, possuem variados tipos de manifestações clínicas e patológicas, que se caracterizam por alterações morfológicas displásias em uma ou mais linhagens, medula óssea hiper proliferativa, citopenias no sangue periférico e risco aumentado para transformação leucêmica (MATOS et al., 2016; GREENBERG et al., 2012; PFEILSTOCKER et al., 2016; SPERLING et al., 2017).

Tais achados em SMD são manifestações secundárias a anormalidades em células clonais (em expansão), que podem ser modificadas por fatores extrínsecos, como o sistema imune e o

microambiente medular (BEJAR, 2014). Além disso, a hematopoese ineficaz na doença se faz presente devido à susceptibilidade anormal das células progenitoras à apoptose e limitada resposta destas aos fatores de crescimento (TEFFERI e VARDIMAN, 2009).

As citopenias (anemia, leucopenia e plaquetopenia), devido a medula óssea ineficiente, são as principais complicações relacionadas a SMD, podendo levar os pacientes a necessidades frequentes de transfusões de hemocomponentes, sangramentos e infecções recorrentes. A transformação em leucemia aguda ocorre em aproximadamente 30% dos pacientes (GREENBERG et al, 2016; VARDIMAN et al, 2009; BEJAR, 2014).

Das manifestações clínicas associadas a SMD, a anemia isolada é a apresentação clínica e laboratorial mais frequente, sendo macrocítica em 80% dos casos, normocítica ou, raramente, microcítica. Cerca de 50% dos casos apresentam outras citopenias associadas (neutropenia e/ou plaquetopenia) e, menos de 5% dos casos se apresentam com neutropenia ou plaquetopenia isoladas (NGUYEN, 2009), essa última relacionada a risco aumentado de sangramentos. A neutropenia leva a um aumento na susceptibilidade a infecções, sendo um importante fator associado a complicações fatais (DAYYANI et al., 2010).

A SMD é dividida em dois tipos, de acordo com sua etiologia: primária ou *de novo*, que ocorre sem exposição prévia e não possui uma etiologia totalmente esclarecida, e secundária, que ocorre após exposição a quimioterapia e/ou radioterapia. (MACEDO et al., 2016).

Por se tratar de um defeito clonal das células progenitoras, o diagnóstico é baseado nos achados citológicos do hemograma, análise da medula óssea por mielograma, biópsia e cariótipo (MATOS et al., 2016). O critério morfológico para o diagnóstico da SMD é a presença de displasia em 10% ou mais das células em uma ou mais linhagens hematopoiéticas (SWERDLOW et al., 2014; TEFFERI e VARDIMAN, 2009).

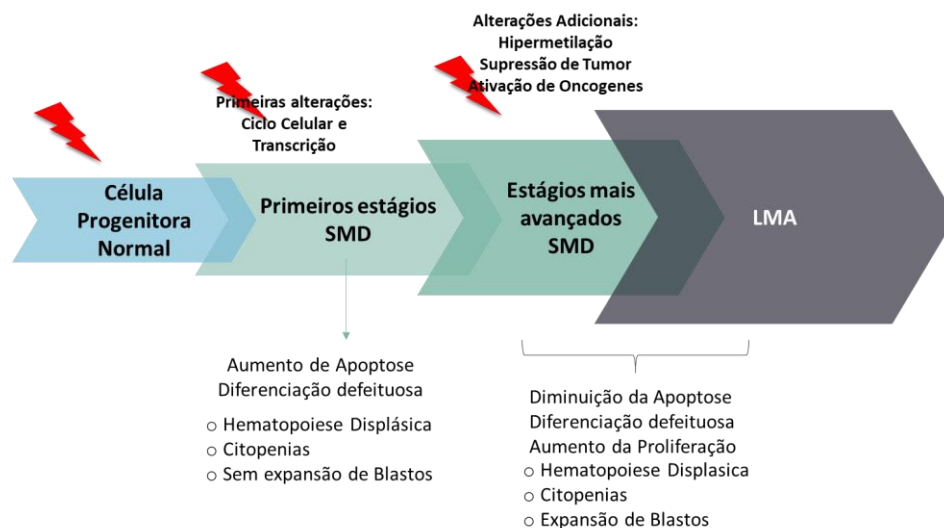
A SMD acomete mais frequentemente idosos com idade, ao diagnóstico, entre 60 e 75 anos, e sua prevalência aumenta com a idade. A incidência em pacientes acima de 70 anos é maior que 20 casos por 100.000 pessoas/ano (MUFTI, 2004). Segundo dados americanos, SMD ocorre em 3 a 4 indivíduos a cada 100.000 habitantes e, no Leste Europeu, estima-se uma incidência de 3,3 a 4,5/100.00 habitantes. Há, ainda, dados que favorecem diferenças na incidência de acordo com a distribuição étnica da população (GARCIA-MANERO, 2011).

As causas da SMD ainda não estão bem definidas, assim como sua evolução clínica para leucemia mieloide aguda, visto que sua patogênese engloba múltiplos passos, mecanismos e fatores, que podem ser endógenos e/ou exógenos. O clone anormal e geneticamente instável de

precursor de células hematopoiéticas se desenvolve após sofrer alterações genéticas, citogenéticas e epigenéticas, gerando mudanças funcionais nas células, e, conseqüentemente, evolução da doença (TALWALKAR SS, 2010; VASSALO e MAGALHAES, 2009).

Segundo Bejar e colaboradores (2011) as etapas associadas à patogênese da SMD incluem: 1. auto renovação da célula-tronco hematopoiética ou aquisição desta propriedade numa célula progenitora; 2. aumento da capacidade proliferativa no clone neoplásico e/ou em sua progênie mais diferenciada; 3. comprometimento ou bloqueio da diferenciação celular; 4. instabilidade genética e epigenética; 5. presença de mecanismos antiapoptóticos no clone neoplásico; 6. evasão ao sistema imune; 7. supressão da hematopoese normal.

Figura 3: Mecanismos de Patogênese da SMD



Fonte: Adaptado de Bejar et al (2011).

De forma geral, as manifestações clínicas da doença (tipo, gravidade das citopenias e tempo para progressão da mesma) dependerá do grau de prevalência de cada um destes processos enumerados anteriormente. As alterações genéticas na SMD são bastante complexas e envolvem interações com o microambiente alterado e com outras mutações, sendo tais fatores importantes para sua patogênese (BEJAR et al., 2011; MATOS, 2016).

No ano de 2016, foi lançada uma nova revisão da classificação da Organização Mundial de Saúde (OMS), com as seguintes nomenclaturas: SMD com Displasia em Única Linhagem (SMD-DU) e em múltiplas linhagens (SMD-CRDM), SMD com Sideroblastos em Anel em única linhagem (SMD-AS-DU) e múltiplas linhagens (SMD-SA-DM), SMD com excesso de blastos 1 e 2 (SMD-EB 1 e 2), SMD inclassificável e SMD com del5q isolada (ARBER et al, 2016).

Além da classificação criada pela a OMS, o IPSS (International Prognostic Scoring System) foi desenvolvido por Greenberg e colaboradores em 1997 e revisado em 2012, como um sistema de classificação baseado em escores prognósticos. Um método simples, que utiliza a citogenética, características morfológicas e clínicas para determinar o prognóstico, a categoria de risco de evolução para Leucemia Mieloide Aguda (LMA) e estimar a sobrevida do paciente (Figuras 3 e 4) (GREENBERG et al, 1997; GREENBERG et al, 2012).

Figura 4: Classificação prognóstica do IPSS-R de acordo com as categorias citogenéticas

Muito Favorável	Favorável	Intermediário	Desfavorável	Muito Desfavorável
<ul style="list-style-type: none"> Única: del(11q)-Y 	<ul style="list-style-type: none"> Normal Única: del(5q) del(12p) del(20p) Dupla: Incl. del(5q) 	<ul style="list-style-type: none"> Única: del(7q)+8 i(17q)+19 Qualquer outra Dupla: Qualquer outra 	<ul style="list-style-type: none"> Única: del(3q)-7 Dupla: Incl. -7/7q- Complexo: 3 alterações 	<ul style="list-style-type: none"> Complexo: > 3 alterações

Fonte: Adaptado de Greenberg et al (2012).

Figura 5: Categorias de risco e escores prognósticos segundo o IPSS-R

VARIÁVEIS	0	0,5	1	1,5	2	3	4
Cariótipo	Muito Favorável		Favorável		Intermediário	Desfavorável	Muito Desfavorável
Blastos MO (%)	≤2		>2 a <5		5 a 10	>10	
Hb (g/dL)	≥10		8 a <10	<8			
ANC (mm ³)	≥800		<800				
Plaquetas (mil cél/mm ³)	≥100	50 a <100	≤50				

CATEGORIA DE RISCO					
	Muito Baixo	Baixo	Intermediário	Alto	Muito Alto
Escores	≤1,5	>1,5- 3	>3-4,5	>4,5-6	>6
Sobrevida (anos)	8,8	5,3	3	1,6	0,8

Legenda: Hb = Hemoglobina; ANC = Contagem absoluta de neutrófilos; MO = Medula óssea.

Fonte: Adaptado de Greenberg et al (2012).

1.6. A metilação do DNA como processo neoplásico na Síndrome Mielodisplásica

A hipermetilação é uma característica das fases avançadas da SMD, estando associada à regulação de vários genes envolvidos no reparo do DNA, apoptose, angiogênese e regulação do ciclo celular na doença (ISSA, 2010; FIGUEROA et al, 2012).

Por esse motivo, os principais medicamentos utilizados nos estágios mais avançados da doença são os fármacos inibidores da DNA metiltransferase, tais como azacitidina (AZA) e decitabina. Estes azanucleosídeos foram originalmente descritos como drogas citotóxicas, mas doses baixas causam reversão da metilação anormal do DNA promotor, re-expressão de genes silenciados, incluindo supressores tumorais (BAYLIN, JONES, 2011). O tratamento com a azacitidina e decitabina atingem taxas de remissão superiores comparativamente com tratamento de suporte, e em alguns casos verificou-se um atraso da transformação blástica (FENAUX et al, 2009).

Na SMD, as alterações relacionadas a metilação estão presentes em diferentes vias de sinalização, acometendo genes envolvidos nas modificações das histonas (*EZH2*, *ASXL1*, *UTX*), regulação de metilação e demetilação (*DNMT3A*, *TET2*, *IDH1/2*), genes de sinalização celular (*RAS*, *JAK2*, *CBL*), fatores de transcrição (*RUNX1*, *TP53*) e aqueles envolvidos no processamento de RNAs (*SF3B1*, *SRSF2*, *U2AF1*) (ISSA, 2010; NIKOLOSKI, 2012; HASEGAWA, 2016).

Um estudo de Issa em 2011, avaliou a frequência de metilação de uma variedade de genes metilados encontrados em pacientes com a doença, afetando várias funções celulares (Tabela 1). Isso explica em parte o porquê da metilação do DNA ter sido relatada como prognóstico na SMD, pois todos os estudos individuais desses genes apontam para um conjunto comum de casos afetados pelo fenótipo hipermetilado característico da doença. (ISSA et al, 2010)

Tabela 1: Frequência de metilação dos principais genes envolvidos na patogênese da síndrome mielodisplásica.

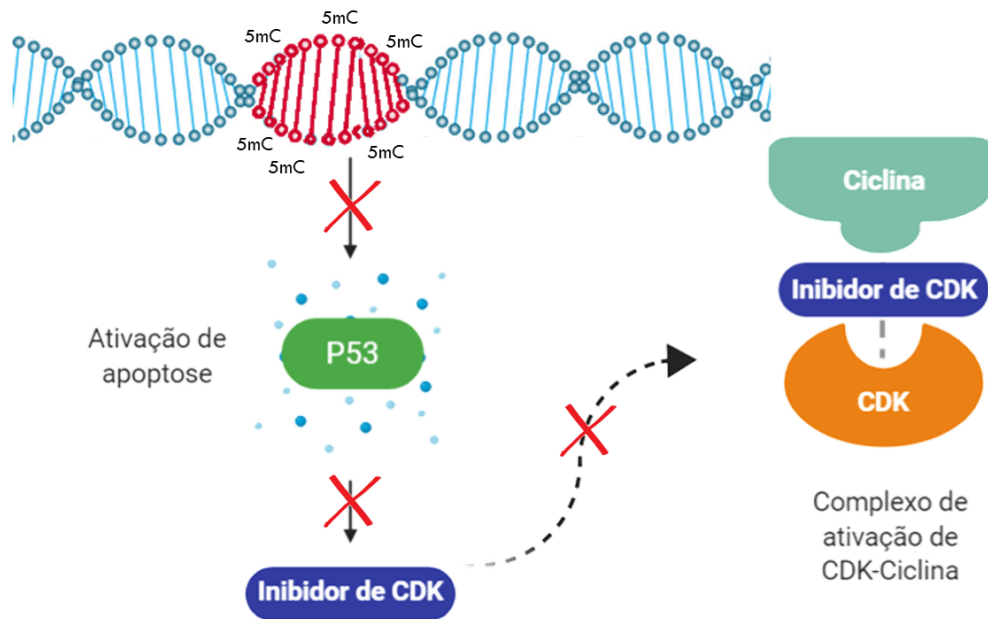
Gene	Frequência de Metilação (%)	Função
<i>CT</i>	50	Diferenciação celular
<i>DAPK</i>	50	Serina pró-apoptótica/ Treonina sérica
<i>FHIT</i>	50	Metabolismo das Purinas
<i>PGRA e PGRB</i>	45	Receptor de Progesterona
<i>P15</i>	23-80	Inibidor de quinases dependentes de ciclina/ ciclo celular/ proliferação
<i>RIL</i>	36-70	Supressor tumoral, pro-apoptótico
<i>CDH1</i>	15-27	Adesão e Motilidade
<i>OLIG2</i>	41	Fator de Transcrição básico hélice-loop-hélice
<i>RASSF1</i>	9	Regulador negativo da sinalização RAS
<i>CTNNA1</i>	10	Catenina alfa
<i>NOR1</i>	15	Proteína com domínio nitro-oxidorato

Legenda: CT (calcitonina), DAPK (proteína kinase associada a apoptose), RASSF1 (domínio de associação de ras-1), FHIT (triade histidina frágil), CDH1 (caderina-1), CTNNA1 (proteína associada à caderina), NOR (neuron-derived orphan receptor 1), OLIG2 (Fator de transcrição de oligodendrocitos), PGRA e PGRB (receptor de progesterona), RIL (Interleucina humana recombinada purificada-2) .

Fonte: Adaptado de Issa (2010).

Os genes *CDKN2B* (*P15*) e *CDKN2A* (*P16*), envolvidos na regulação do ciclo celular, *DAPK* na apoptose, *CDH1* na adesão e motilidade de células, entre outros, encontram-se hipermetilados em todos os subtipos da SMD. A metilação do *P15* e *P16* apresentam-se aumentados durante as fases avançadas da SMD. Esses genes, uma vez hipermetilados, perdem a função de controle de ciclina quinase dependente 4 (CDQ4), o que leva à ativação do ciclo celular com consequente aumento de proliferação celular, fenômeno típico das formas avançadas de SMD. (figura 5) (HASEGAWA, 2016; NIKOLOSKI, 2012).

Figura 6: Mecanismo de ação do gene P15 quando alterado pela metilação



Legenda: Com a metilação de P15, esse perde sua função inibitória sobre CDK4, o que leva a ativação contínua do ciclo celular, gerando vantagem proliferativa à célula neoplásica.

Abreviações: CDK= Cinasas dependentes de ciclina; P53=TP53 ou proteína de tumor.

Fonte: Adaptado de Nikoloski (2012).

O gene *DAPK*, regulador da apoptose, está descrito hipermetilado em 47% dos pacientes na SMD. Estes doentes encontram-se normalmente em estádios avançados da doença, nomeadamente em estádios de progressão para LMA, demonstrando que a hipermetilação do gene *DAPK* poderá representar um passo inicial no processo de evolução leucêmica. (DENG CY et al, 2017)

O gene *CDH1* codifica uma glicoproteína transmembranar, uma molécula responsável pela a adesão celular, chamada caderina-E. A caderina-E é essencial para a manutenção da polarização celular, diferenciação epitelial e arquitetura dos tecidos. A perda da sua função pela hipermetilação no promotor desse gene na SMD, compromete a adesão entre as células e vias de sinalização de proliferação celular, ocorrendo vantagem proliferativa comum nos estágios mais avançados da doença. (AGGERHOLM, 2006; ISSA, 2010)

O gene *FHIT*, também frequentemente metilado em SMD, o qual codifica um supressor tumoral envolvido com o crescimento, proliferação celular e apoptose. A perda de função desse gene está relacionada com o pior prognósticos dos pacientes portadores da doença e um aumento das chances de evolução para uma leucemia mieloide aguda (LMA). (IWAI, 2005)

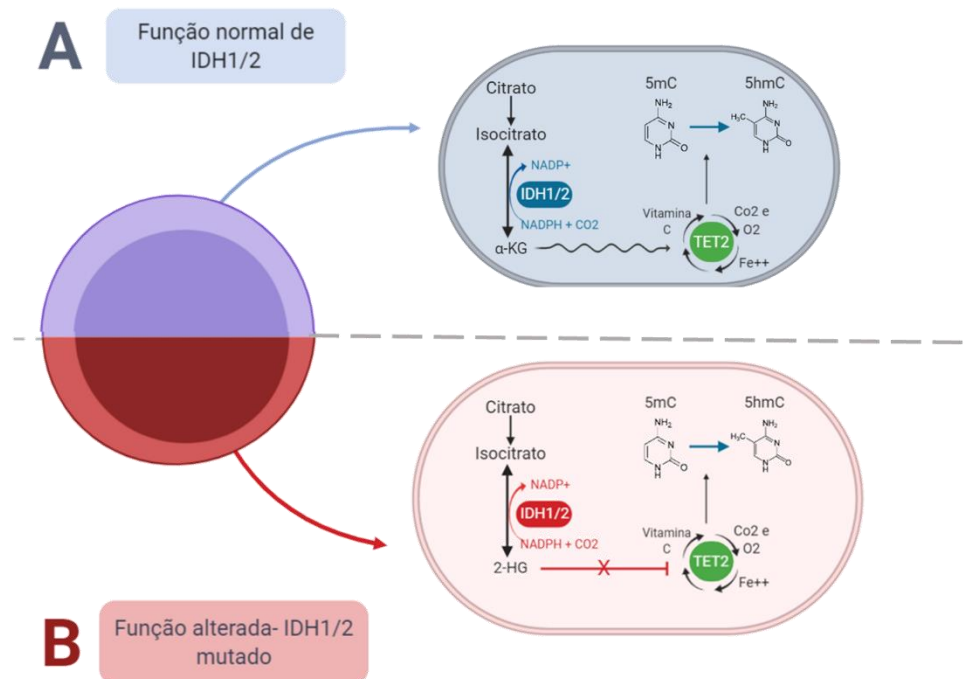
Essa variedade de genes metilados pode ser encontrada em doentes em estágios mais iniciais da doença, afetando várias funções celulares. (tabela 1) A metilação de cada um destes genes em separado tem um impacto funcional mínimo na SMD, não sendo sequer expressos nas células hematopoiéticas normais. (WEBER et al, 2007). Contudo, os doentes com SMD apresentam hipermetilação de vários genes simultaneamente o que pode contribuir para a heterogeneidade da doença (PAPAEMMANUIL et al., 2011).

Mutações em genes envolvidos na regulação da metilação do DNA, afetam diretamente os padrões de metilação na doença. Walter e colaboradores demonstraram que mutações no gene *DNMT3a*, uma das principais enzimas responsáveis pela metilação de novo do DNA, ocorre em todos os subtipos da SMD e o perfil mutacional desse gene na doença correlacionou-se com uma sobrevivência global diminuída e aumento de risco de evolução para LMA. Além disso o grupo heterogêneo de pacientes com LMA que apresentam mutação em *DNMT3a* foi associada a uma elevada contagem de leucócitos e blastos na medula óssea. A função de *DNMT3A*, quando alterada, poderá levar à hipometilação do DNA e afetar a expressão de diversos genes.

O gene *TET2* se apresenta como um dos genes mais mutados na Síndrome Mielodisplásica, sua mutação leva a perda da função catalítica da enzima e consequente redução nos níveis de 5hmC, o qual é um marcador de demetilação global do DNA (THOMPSON, 2017). Alterações em *TET2* são observadas em 15-27% na SMD, incluindo deleções, perda de heterozigosidade e mutações, levando à demetilação do DNA prejudicada. (MOHAMEDALI et al, 2009; LANGEMEIJER, et al 2009)

As mutações dos genes *IDH1/2*, citados anteriormente, estão presentes em 4 a 11% dos pacientes com SMD, e sugerem pior prognóstico e maior risco de progressão para LMA. Estas mutações interferem na função das enzimas e levam a produção de um oncometabólito, o 2-hidroxi-glutarato(2-HG), análogo de α -KG, que atua estimulando a progressão tumoral, podendo levar um padrão de metilação do DNA aberrante nas células cancerígenas (figura 6) (XU W et al, 2011; DANG et al, 2016).

Figura 7: Função da proteína IDH1 na fisiologia normal e na doença.



Legenda: Para que ocorra a reação de demetilação da ilha CpG metilada, ocorre oxidação de uma 5-metilcitosina por uma 5-hidroximetilcitosina, a qual é mediada pela proteína dioxigenase TET2, a qual é alfa-cetoglutarato dependente., que por sua vez, serão catalizadas pelas proteínas IDH1/2.

Abreviações: IDH1/2= isocitrato desidrogenase 1/2; TET2= A translocação de ten-eleven.

Fonte: Adaptado Dang et al (2016).

Um estudo de Shen e colaboradores em 2010 mostrou a importância da metilação do DNA na Síndrome Mielodisplásica. No estudo avaliaram amostras de 317 pacientes com SMD divididos em uma coorte tipo piloto e duas coortes de confirmação. A coorte piloto era composta de 89 pacientes, dentre os quais 40 foram tratados com decitabina (agente hipometilante) e 49 foram tratados com suporte transfusional.

A primeira coorte de validação foi composta de 75 pacientes, dentre os quais todos foram tratados com diferentes doses de decitabina (agente hipometilante) e a segunda coorte de validação foi composta de 153 pacientes, dentre os quais 40 receberam tratamento com decitabina (agente hipometilante) ou azacitidina (agente hipometilante) e os demais foram tratados com terapia de suporte. A análise da metilação do DNA foi quantitativa com Bisufito/Pirosequenciamento. Os pesquisadores selecionaram um painel de genes e, após um screening inicial, detectaram que os genes E-caderina (*CDH1*), N-caderina (*CDH13*), Receptor alfa-estrogênico (*ERα*), Nucleoplasmina 2 (*NPM2*), Fator 2 de transcrição de Oligodendrócitos (*OLIG2*), Inibidor 2b de quinase dependente de ciclina (*p15^{INK4B}*), Receptor A da progesterona

(*PGRA*), Receptor B da Progesterona (*PGRB*), Domínio 4 PDZ e LIM (*RIL*) apresentavam metilação aberrante em mais de 10% dos pacientes (SHEN et al, 2010).

Entre os 89 pacientes do coorte piloto, os pesquisadores encontraram metilação da região promotora em 7% *ER£*, 15% *CDH1*, 20% *NPM2*, 21% *CDH13*, 23% *p15*, 41% *OLIG2*, 45% *PGRB*, 45% *PGRA* e 70% *RIL* e, de extrema importância, foi detectada uma forte correlação positiva entre as metilações dos diferentes genes no mesmo paciente, gerando grande acurácia na previsão de sobrevida global e sobrevida livre de transformação em LMA. Foi realizada análise multivariada com regressão de Cox para avaliação de sobrevida global e sobrevida livre de progressão, sendo analisadas as mais diversas variáveis como idade, sexo, tratamento, tipo de SMD, categoria citogenética, grupo IPSS e o escore Z de metilação (SHEN et al, 2010).

Como resultados, apenas a metilação permaneceu como preditor independente de sobrevida global e sobrevida livre de transformação em LMA. A mediana de sobrevida global foi de 12,3 meses para quem apresentava elevado escore de metilação e 17,5 meses para quem apresentava baixo escore de metilação. Já a análise de sobrevida livre de transformação em LMA foi de 6,4 meses para aqueles com elevado escore de metilação e 14,9 meses para aqueles com baixo escore de metilação. Ao serem avaliados todos os 3 grupos (piloto e duas coortes de confirmação), os pesquisadores também encontraram que a metilação elevada foi associada a menor sobrevida global dos pacientes e menor tempo de sobrevida livre de transformação (SHEN et al, 2010).

Em relação ao status de metilação associado ao tratamento neste estudo de Shen, a quantidade de metilação não foi preditora de resposta aos agentes hipometilantes, porém a redução da quantidade de metilação após os agentes hipometilantes (decitabina e azacitidina) foi associada à resposta clínica (SHEN et al, 2010).

O fenômeno da metilação é presente em todos os casos de SMD, independente da etnia e da distribuição geográfica. Podemos corroborar isso em pacientes brasileiros, em trabalho realizado por nosso grupo de pesquisa. Avaliamos o status de metilação em genes conhecidos como fatores de transcrição da família dos Interferons, os IRFs de 111 pacientes brasileiros com Síndrome Mielodisplásica. A avaliação foi realizada para os genes *IRF1*, *IRF-2*, *IRF-3*, *IRF-4*, *IRF-5*, *IRF-6*, *IRF-7*, *IRF-8* e *IRF-9* em pacientes de baixo risco (fases iniciais da SMD) e de alto risco (formas avançadas da SMD, as AREBs). *IRF-3* e *IRF-5* estavam hipermetilados em comparação a controles saudáveis e *IRF-1*, *IRF-3*, *IRF-5*, *IRF-6* e *IRF-8* se encontravam hipermetilados nas fases avançadas da SMD (AREBs) em comparação às fases iniciais (SOUSA et al, 2019).

Diante do que foi exposto, a metilação do DNA aparece como um evento frequente nas doenças clonais e de perfil neoplásico, estando correlacionada com a regulação ou inativação de vários genes envolvidos no reparo do DNA, apoptose, angiogênese e regulação do ciclo celular. Na SMD, o bloqueio epigenético da metilação participante na sua patogênese ainda estar sendo desvendado.

Com isso, sabe-se que a análise do perfil global de metilação pelos produtos respectivos dessa reação, 5-metilcitosina e 5-hidroximetilcitosina, é importante para o entendimento da patogênese da SMD, haja visto que essa é uma doença com características de bloqueio epigenético. Além disso, na doença existem poucos estudos que avaliam o papel desses marcadores de metilação, e estes enfocam no estudo da 5-metilcitosina, contudo, nada se sabe sobre a influência do perfil de hidroximetilação global na SMD. A avaliação da metilação e hidroximetilação global em conjunto em pacientes com SMD pode representar valor clínico para o achado desses biomarcadores específicos e pode permitir a possível criação de modelos para tratamento da síndrome mielodisplásica, além de contribuir para o melhor entendimento da patogênese da doença.

2. OBJETIVOS

1.1 Objetivo Geral

Avaliar o perfil global de metilação e hidroximetilação do DNA (5-metilcitosina e 5-hidroximetilcitosina) por imuno-histoquímica em biopsias de medula óssea de pacientes portadores de síndrome mielodisplásica (SMD).

1.2 Objetivos Específicos

1. Avaliar os níveis de 5-metilcitosina /5-hidroximetilcitosina em relação as características clínico-laboratoriais dos pacientes portadores de SMD;
2. Comparar os níveis de 5-metilcitosina/5-hidroximetilcitosina, entre indivíduos saudáveis e pacientes portadores de SMD;
3. Correlacionar os níveis de 5-hidroximetilcitosina e 5-metilcitosina com os níveis de expressão gênica dos genes relacionados ao ciclo celular e fuso mitótico (*AURKA*, *AURKB*, *MAD2*, *CDC20*, *TPX2*), ao reparo do DNA (*ATM*, *RAD51*, *LIG 4*, *BRCA1*, *BRCA2*, *XRCC5*, *XRCC6*, *XPA*, *XPC*, *XPG*, *CSA* e *CSB*) e as polimerases com atividade de translesão (*REV3L*, *REVI*, *POLI*, *POLH*, *POLL*, *POLK*, *POLQ*, *POLN* e *PCNA*)

3. MATERIAIS E METÓDOS

3.1. Seleção de Amostras

Neste estudo foram incluídas 73 amostras de biópsias de medula óssea (BMO) de pacientes portadores de SMD, diagnosticados de acordo com os critérios da Organização Mundial de Saúde (SWERDLOW et al, 2016), e regularmente inscritos no ambulatório de hematologia do Hospital Universitário Walter Cantídio, da Universidade Federal do Ceará HUWC/UFC e Hospital Geral de Fortaleza (HGF) no período de 2008 a 2019. Foram utilizados como controles 10 biópsias de medula óssea de pacientes com o diagnóstico negativo para a doença, após consentimento informado.

3.2. Aspectos Éticos

A presente pesquisa foi submetida e aprovada (Nº do processo: 14022219.9.0000.5054) pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos do Hospital Universitário Walter Cantídio, através do sistema da Plataforma Brasil, utilizando-se de Termos de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (Anexo 1) apresentados na sessão apêndice.

Nestes termos, a equipe executora desta pesquisa comprometeu-se a cumprir todas as diretrizes e normas reguladoras descritas na Resolução nº 466 de 12 de dezembro de 2012 do Conselho Nacional de Saúde que aprova as diretrizes e normas regulamentadoras de pesquisas envolvendo seres humanos.

3.3. Coleta de Amostras

Todas as amostras foram coletadas por médico hematologista experiente. Para a avaliação do Cariótipo por banda G, as amostras foram coletadas em seringa heparinizada. As amostras para a obtenção do *pool* celular foram coletadas em tubos Vacutainer® contendo EDTA.

Para a separação das células do *pool* celular da medula óssea, realizou-se a transferência da amostra para um tubo do tipo Falcon de 50 mL onde foi lavada com solução de lise (25mL de solução de cloreto de amônio 0,144M e bicarbonato de amônio 0,01 M). O conteúdo foi agitado lentamente, deixado em banho de gelo por 15 minutos e centrifugado a 3000 rpm por 10 minutos a 4° C. Em seguida foi desprezada a fase aquosa e acrescentado 250µL de PBS e, posteriormente, 750uL de *Trizol LS Reagent*® (Invitrogen, EUA). O material foi

homogeneizando com pipeta até dissolução completa. Após este procedimento, o material foi armazenado no freezer a -80°C .

3.4. Cariótipo por Banda G

Os cariótipos foram realizados de acordo com os protocolos já estabelecidos pelo Laboratório de Citogenômica do Câncer, segundo a técnica descrita por Chauffaille e adaptada por Pinheiro (PINHEIRO et al, 2009). A medula óssea foi colhida em heparina e de forma estéril foi dividida em dois frascos contendo 7 mL de meio RPMI 1640 (pH 7,0), 3 mL de soro fetal bovino e 100 μL de L-glutamina. Este material foi cultivado por 24 horas em estufa a 37°C . Uma hora antes do término da cultura foram adicionados 40 μL de colchicina (Colcemid[®]), por 30 minutos. Em seguida, o material foi centrifugado e ressuspensão em solução hipotônica de KCl 0,075 M e fixado em solução de ácido acético e metanol (3:1), por 4 vezes.

Para confecção das lâminas para análise, o material foi gotejado em lâminas de microscopia óptica e em seguida foram aquecidas por 3 minutos em micro-ondas na potência alta. O bandeamento foi realizado pela técnica de tripsina e as bandas coradas com o corante Wrigth[®]. Foram analisadas pelo menos 20 metáfases de cada paciente, sendo capturadas e analisadas em sistema computadorizado com software para cariotipagem CytoVision[®]. Os resultados das análises citogenética de medula óssea foram estabelecidos de acordo com os critérios do Sistema Internacional de Nomenclatura Citogenética Humana (ISCN) (SHAFFER e TOMMERUP 2017).

3.5. Coleta de biópsias

Foram obtidos os blocos de BMO dos pacientes (coletados no momento do diagnóstico) e dos controles para realização de imuno-histoquímica. Os chefes do departamento de Patologia e do SAME do Hospital Universitário Walter Cantídio e Hospital Geral de Fortaleza foram informados sobre os objetivos e metodologia da pesquisa, tendo os mesmos concordado com o estudo.

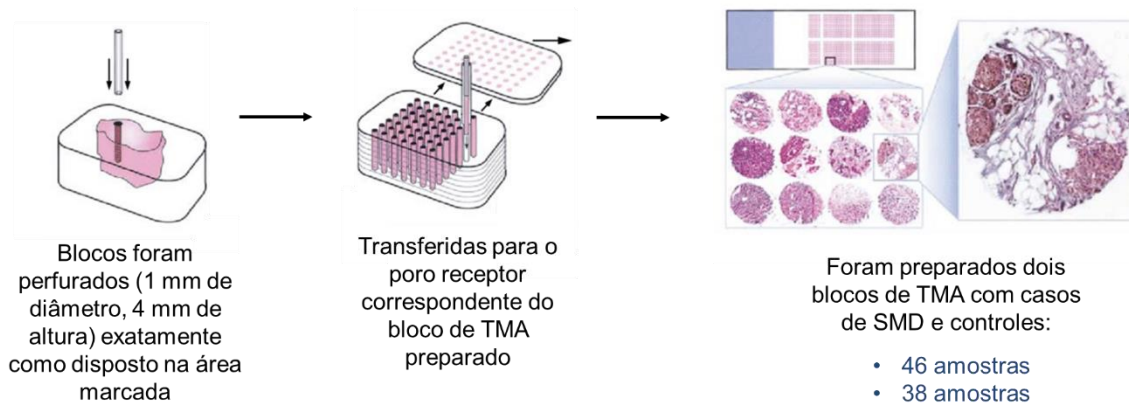
3.6. Técnica de *Tissue Microarray* (TMA)

A imunoexpressão foi avaliada através da imuno-histoquímica pela técnica de microarranjo tecidual ou “*tissue microarray*” (TMA). O TMA é uma coleção organizada de amostras teciduais dispostas sob forma de uma matriz onde cada amostra é suficientemente

grande para se representativa e convenientemente pequena que possa permitir o uso não predatório do bloco doador, permitindo a utilização racional dos reagentes a serem aplicados na amostra em condições experimentais homogêneas.

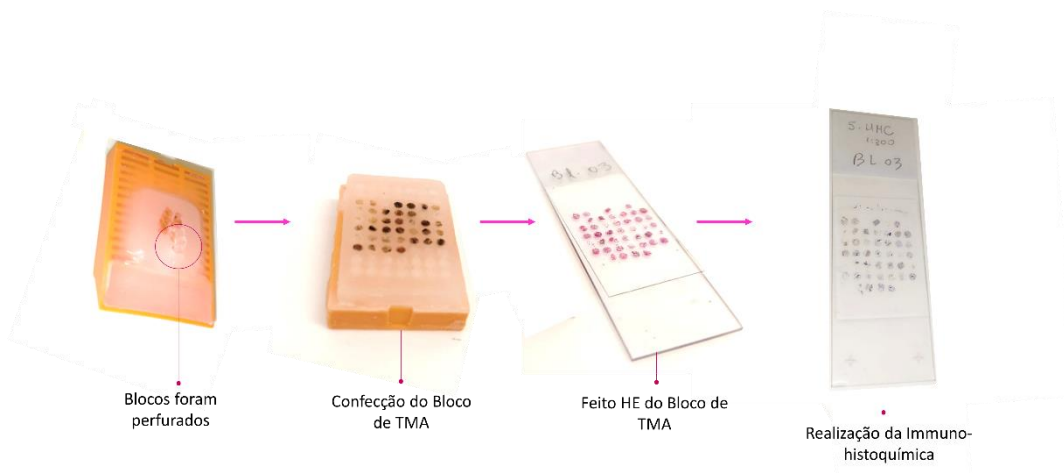
Em cada bloco foram escolhidos o local adequado para a melhor visualização do tecido de medula óssea por meio da leitura de lâminas H/E de cada caso e marcados correspondente ao bloco. Em seguida, os blocos foram perfurados (1 mm de diâmetro, 4 mm de altura) exatamente como disposto na área marcada e transferidas para o poro receptor correspondente do bloco de TMA preparado. Foram preparados dois blocos de TMA com casos de SMD e controles normais, tinham respectivamente 46 e 38 amostras, foram então completados de acordo com o esquema pré-determinado. Os blocos foram aquecidos a 42 ° C por 3 min e depois seccionados rotineiramente com 4 µm de espessura, com o auxílio do micrômetro.

Figura 8: Imagem esquemática da metodologia de *tissue microarray*.



Fonte: Elaborado pelo autor

Figura 9: Exposição do processo de confecção do bloco de TMA.



Fonte: Elaborado pelo autor

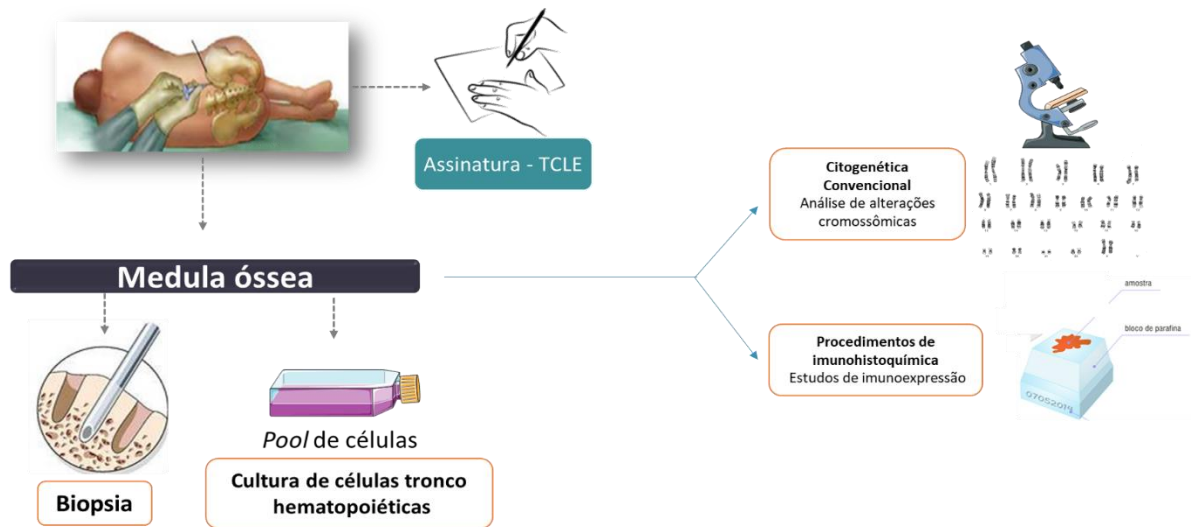
3.6. Imuno-histoquímica (IHC)

Para a análise de imuno-histoquímica foram utilizadas cerca de 66 biopsias de medula óssea de pacientes suspeitos ou diagnosticados portadores de síndrome mielodisplásica, armazenados no Departamento de Patologia e no Hospital Geral de Fortaleza. Os casos foram selecionados tendo como critério de inclusão no estudo a presença de quantidade suficiente de tecido no bloco de parafina. Uma vez selecionados os blocos, foram obtidas novas lâminas que foram coradas por hematoxilina e eosina (H/E) para avaliação histopatológica, qualidade do material e posterior realização de experimentos de imuno-histoquímicas com os respectivos anticorpos par 5-metilcitosina e 5-hidroxi-metilcitosina. Os dados clínicos como idade, gênero e subtipo da doença, foram coletados a partir das fichas de requisição de exames, e a seguir foram registrados em banco de dados e submetidos à análise estatística descritiva.

A reação imuno-histoquímica foi utilizada com a finalidade de visualizar diretamente na amostra a distribuição da 5-metilcitosina (5mC) e 5-hidroxi-metilcitosina (5hmC). Para a reação de imuno-histoquímica, os blocos de parafina foram cortados de forma seriada, com cerca de 3 m de espessura, e estendidos em lâminas de vidro previamente limpas, desengorduradas e tratadas com organossilano. Os cortes histológicos, após desparafinização em xilol e desidratação em série decrescente de etanol, foram submetidos à recuperação antigênica, bloqueio da peroxidase endógena e incubação com o anticorpo primário.

Posteriormente, foi realizada a contra-coloração dos cortes pela Hematoxilina de Mayer, reidratação em etanol crescente, clareamento em xilol e montagem com Permount®. Controles positivos indicados pelo fabricante foram utilizados para o anticorpo empregado. Para o controle negativo das reações imuno-histoquímicas, os cortes histológicos foram incubados com solução tampão (BSA 1% em Tris pH 7,4) no lugar do anticorpo primário.

Figura 10: Delineamento experimental do projeto.



Fonte: Elaborado pelo autor.

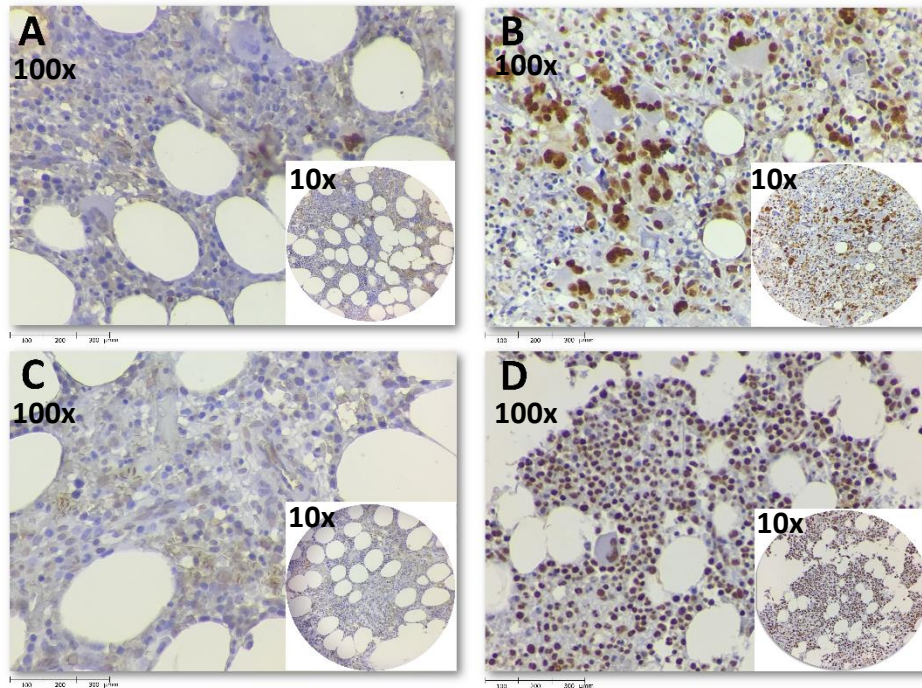
3.7. Interpretação da Imuno-histoquímica

A imunorreatividade para 5mC e 5hmC foi avaliada por três observadores independentes. Para cada paciente, as contagens de células foram repetidas três vezes e os valores médios foram utilizados para calcular o escore final de metilação (M-escore). Os casos discordantes foram discutidos sob o microscópio até o completo acordo.

A coloração considerada positiva foi nuclear nos marcadores 5-hidroxmetilcitosina e 5-metilcitosina (CHANG, D. Z. et al., 2012; ERPOLAT et al., 2012; LIANG et al., 2012; WANG, L. et al., 2009). Os controles internos negativos das reações foram realizados com reações sem os anticorpos primários e os positivos com secções de tecidos indicados de acordo com as instruções do fabricante de cada anticorpo.

Também foi avaliada a proporção de 5mC para 5hmC, sendo essa, um potencial alvo para desmetilação do DNA. A justificativa para utilizar a proporção de 5mC/5hmC é que os níveis de 5mC e 5hmC globais são muito variáveis entre os diferentes tecidos, mas as proporções 5mC/5hmC permanecem quase constantes. (CARDENAS et al, 2017).

Figura 11: Compilado de imagens da marcação de anticorpos em tecido de medula óssea.



Legenda: Imagens dispostas nos aumentos de 100x e 10x. **A.** Marcação fraca em 5hmC (1%); **B.** Marcação forte em 5hmC (60%); **C.** Marcação fraca em 5mC (1%); **D.** Marcação forte em 5mC (80%).

3.7.1 Análise de população

Entre os portadores de SMD, as seguintes características clínicas e laboratoriais foram analisadas para pesquisa de associação entre as expressões proteicas: sexo, idade ao diagnóstico, origem, número de citopenias ao hemograma, número de displasias e porcentagem de blastos ao mielograma, celularidade da medula óssea à histologia, dependência transfusional, citogenética, evolução clínica, classificação OMS e IPSS. Foi realizada, também, análise do tempo de sobrevivência dos pacientes portadores de SMD de acordo com a expressos foram qualitativas (positiva versus negativa) e quantitativa das proteínas do estudo.

As citopenias foram definidas de acordo com a classificação do IPSS, considerando-se quando: Hb < 10,0 g/dL, neutrófilos < 1.800/mm³ ou plaquetas < 100.000/mm³ (GREENBERG, P. et al., 1997). A celularidade da medula óssea foi analisada de acordo com a idade e classificada como descrito na Tabela 1 (ALVES, 2009).

Cariótipo normalmente é definido na presença de 46 cromossomos (22 pares autossômicos e 1 par alossômico sexual), sendo 46, XX para o sexo feminino e 46, XY para o masculino. Cariótipo complexo foi definido conforme a classificação IPSS (1997). Frente a um número diferente de 46 cromossomos à análise citogenética, temos uma situação de

aneuploidia, que pode ser poliploidia (mais do que 46 cromossomos) ou hipoploidia (abaixo de 46 cromossomos). A dependência transfusional foi considerada quando Hb < 9,0 g/dL em homens e < 8,0 g/dL em mulheres (MALCOVATI et al., 2011).

Foi realizado mediante ao pareamento de pacientes a caracterização de expressão gênica da população em estudo, através de uma análise do banco de dados de expressão gênica e proteica do laboratório de citogenômica do câncer. Os resultados de expressão gênica dos pacientes foram de genes relacionados ao ciclo celular e fuso mitótico (*AURKA, AURKB, MAD2, CDC20, TPX2*), ao reparo do DNA (*ATM, RAD51, LIG 4, BRCA1, BRCA2, XRCC5, XRCC6, XPA, XPC, XPG, CSA e CSB*) e polimerases com atividade de transcrição (*REV3L, REVI, POLI, POLH, POLL, POLK, POLQ, POLN e PCNA*).

3.8. Análise Estatística

O teste de Shapiro-Wilk foi utilizado para verificar se os dados de cada variável analisada se apresentavam com distribuição normal (dados paramétricos, com grupos com menos de 50 casos). Os valores de *outliers* foram retirados (quando ocorreram) por não representarem aqueles resultados aos quais o estudo tinha o objetivo de generalizar (p-valor >0.05 para o teste de Shapiro-Wilk).

Os dados paramétricos foram analisados através do teste t de Student, para a comparação da média entre dois grupos, e do teste de ANOVA one-way, para a comparação das médias em variáveis com mais de dois grupos. O pós-teste (post-hoc) para a ANOVA one-way foi definido a partir da análise da homogeneidade de variâncias através do teste de Levene. Caso houvesse homogeneidade de variâncias (p-valor $\geq 0,05$), foi definido como pós-teste para a ANOVA one-way o teste de Tukey. Caso não houvesse homogeneidade de variâncias entre os dados (p-valor < 0,05), foi definido como pós-teste para a ANOVA o teste de Games-Howell.

Para a comparação da intensidade da imunoexpressão dos marcadores do perfil de metilação analisados, conforme as seguintes variáveis categóricas (grau de celularidade da MO, número de displasias, dependência transfusional, IPSS – risco, grau e número de citopenias, normalidade ou não do cariótipo, complexidade da citogenética, % de blastos < ou ≥ 5 e óbito), utilizou-se o teste de Mann-Whitney ou de Kruskal-Wallis, quando apropriado.

Os níveis de imunohistoquímica (em %) também foi categorizado em três diferentes grupos (< 5%, 6-15%, 16-49% e $\geq 50\%$), com as proporções entre os mesmos comparadas conforme as variáveis categóricas descritas acima. Ainda para esta análise, foi delimitados os

pontos de corte (Cutoff points) estabelecidos pelas o teste de Curva ROC, pelo software Prism. (BUDCZIES et al., 2012)

Para essa análise comparativa, foi aplicado o teste do Qui-quadrado, calculando-se os resíduos ajustados, para a variáveis clínicas e para a análise comparativa com a expressão gênica foi categorizada pelo ponto de corte de cada marcador, >13 para 5-hidroxmetilcitosina e >18 para 5-metilcitosina. Nas situações em que se detectaram variáveis com frequência esperada inferior a 5, aplicou-se o Teste Exato de Fischer.

3.9 Variáveis analisadas

As variáveis analisadas neste estudo foram assim subdivididas:

- Grupo: Caso e controle
- Sexo: masculino e feminino;
- Idade (categorização 1): ≤60 anos e >60 anos;
- Idade (categorização 2): ≤60 anos, >60 - ≤70 anos, >70 anos;
- Origem: urbano e rural;
- Quanto à classificação da OMS (2008): CRDU (Citopenia Refratária com Displasia de Única Linhagem), ARSA (Anemia Refratária com Sideroblastos em Anel), CRDM (Citopenia Refratária com Displasia em Múltiplas Linhagens), AREB I (Anemia Refratária com Excesso de Blastos I), AREB II (Anemia Refratária com Excesso de Blastos II), t-SMD (SMD Secundária ao tratamento), LMMC (Leucemia Mielomonocítica Crônica);
- Forma da SMD: Iniciais (CRDU, ARSA e CRDM) e avançadas (AREB I e AREB II);
- Celularidade da medula óssea: Hipocelular+Normocelular e Hiper celular;
- Fibrose na medula óssea: Presença e Ausência;
- Displasias na medula óssea: 0, 1 displasia, 2 displasias e 3 displasias;
- Diseritropoiese: Presença e Ausência;
- Disgranulopoiese: Presença e Ausência;
- Dismegacariopoiese: Presença e Ausência;
- Sideroblastos em anel: Presença e ausência;
- Faixas de porcentagens de Sideroblastos em anel: 0, 1-14% e >15%;
- Porcentagens de Blastos categorizada: <10% e >10%;
- Cariótipo - Quanto à alteração: normal e alterado;

- Cariótipo (Aneuploidia): normal, alterado não aneuplóide e alterado aneuplóide;
- Cariótipo (Alteração no cromossomo 5): normal, alterado com -5/5q e alterado sem 5/5q;
- Cariótipo (Alteração no cromossomo 7): normal, alterado com -7/7q e alterado sem 7/7q;
- Cariótipo (Número de alterações): normal, 1 alteração, 2 alterações e Complexo (3 ou mais alterações);
- Quanto ao prognóstico (IPSS-R): muito favorável, favorável, intermediário, desfavorável e muito desfavorável;
- Classificação dos valores de hemoglobina (Hb) (IPSS-R): $\geq 10\text{g/dL}$, $8 < 10\text{g/dL}$ e $< 8\text{g/dL}$;
- Classificação dos valores de neutrófilos (ANC) (IPSS-R): ≥ 800 por mm^3 e < 800 por mm^3 ;
- Classificação dos valores de plaquetas (IPSS-R): ≥ 100.000 por mm^3 , $50.000 - < 100.000$ por mm^3 e ≤ 50.000 por mm^3 ;
- Classificação do número de citopenias no sangue periférico: 0/1 citopenia e 2/3 citopenias;
- Classificação do grupo de risco de acordo com o IPSS-R: muito baixo, baixo, intermediário, alto e muito alto;
- Classificação do grupo de risco de acordo com o WPSS: muito baixo, baixo, intermediário, alto e muito alto;
- Dependência Transfusional: sim e não (utilizando-se o critério de 1 transfusão a cada 8 semanas durante período de 4 meses (MALCOVATI et al., 2005));
- Resposta ao tratamento com Eritropoietina: Com resposta e sem resposta;
- Óbito: sim e não;
- Evolução para LMA: sim e não.

4. RESULTADOS

4.1 Caracterização da População

Dos 73 pacientes com SMD incluídos neste estudo até o momento, 36 indivíduos (49,3%) foram do sexo feminino e 37 indivíduos (50,6%) foram do sexo masculino. Com relação a idade dos pacientes, a média foi de 67 anos e a mediana 73 anos (mínimo de 23 anos e máximo de 92 anos) com uma predominância de pacientes com idade superior a 60 anos em 72,9% (56/17) dos casos.

Dos resultados obtidos de 58 biopsias de medula óssea desses pacientes, apresentavam 38 (65,5%) apresentaram medula hiperclular, 13 (22,4%) hipocelular e 07 (12,06%) normocelular, com predomínio de pacientes com ausência de fibrose (78,68%). Não foi possível contactar os resultados de biopsias dos restantes dos pacientes (Tabela 3).

Dos achados da medula óssea referentes ao Mielograma de 63 pacientes, observou-se predomínio de displasia da linhagem eritróide, em 53 (84,12%) pacientes, seguida por 48 (76,19%) pacientes apresentando dismegacariopoiese e 32 (50,79%) pacientes com disgranulopoiese. Quanto à percentagem de blastos, obtivemos resultado de 65 dos 73 pacientes, destes, 46 (70,07%) pacientes estavam inclusos na faixa de $\leq 3\%$, seguido de 10 (15,38%) pacientes na faixa de 4 a 10%, 9 (13,84%) na faixa de $>10\%$. (Tabela 3)

Quanto à percentagem de sideroblastos em anel, não foi observada a presença em 61 (83,56%) pacientes, e dos 12 (16,43%) pacientes e dos que apresentaram, houve um predomínio da faixa que corresponde a 30-69%, com 10 (13,69%) pacientes, seguida de 2 (2,73%) pacientes na faixa de 2-5%.(Tabela 3)

Tabela 2: Frequência das variáveis clínicas dos pacientes.

Variáveis	Número de Pacientes	Porcentagem
IDADE		
≤ 60	17	26,9%
$>60-70$	27	28,8%
$>70-80$	18	32,6%
>80	11	11,5%
HEMOGLOBINA (g/dL)		
≥ 10	18	31,4%
$8-<10$	11	29,6%
<8	29	38,8%
Contagem absoluta de neutrófilos (ANC)		
≥ 800	42	78,0%
<800	16	21,9%

PLAQUETAS		
≥ 100	37	51,7%
50-<100	15	28,5%
<50	11	19,6%
BLASTOS MO		
≤ 3	46	70,07%
4%-10%	10	15,38%
>10%	09	13,84%
SIDEROBLASTOS EM ANEL		
0	61	83,56%
>1-<15%	2	2,73%
≥ 15%	10	16,43%
CELULARIDADE MO		
Hipocelular	13	22,4%
Normocelular	07	12,06%
Hipercelular	38	65,5%
FIBROSE MEDULAR		
Presença de fibrose	10	21,32%
Ausência de fibrose	63	78,68%

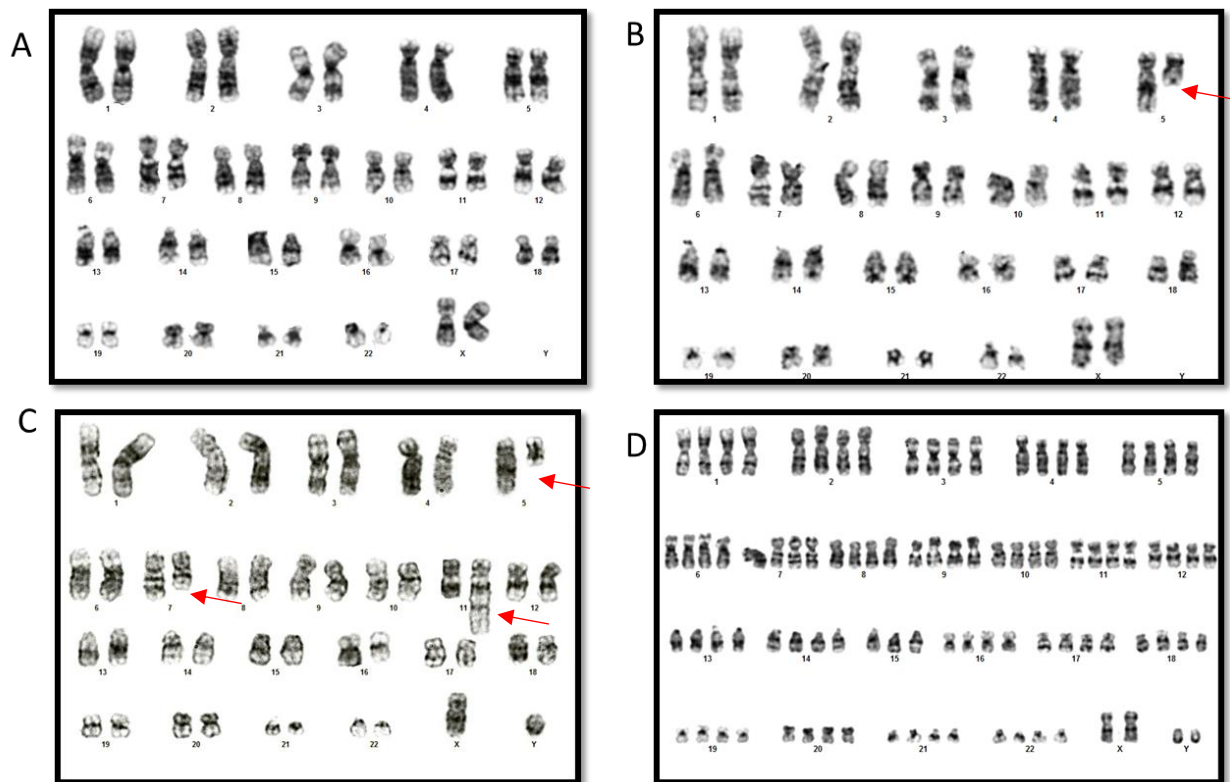
Todos os 73 pacientes avaliados foram classificados de acordo com a OMS 2016, sendo 71(96,49%) pacientes classificados como SMD primária, 2 (2,2%) como SMD relacionada a terapia. Dentre os pacientes classificados como SMD primária, o subtipo mais frequente foi a SMD-DM com 45 (61,40%) pacientes, seguida pelo subtipo SMD-SA-DM com 08 (11,26%) pacientes, SMD-EBI e SMD-EBII, com 6 (8,45%) e 5 (7,04%)pacientes (Tabela 3), síndrome do 5q com 1 (1,75%) paciente (Tabela 4).

Tabela 3: Caracterização dos pacientes segundo a classificação da OMS 2016

Variáveis	Número de Pacientes	Porcentagem
Classificação da OMS		
SMD-DU	02	2,81%
SMD-DM	45	63,38%
SMD-SA-DU	04	5,63%
SMD-SA-DM	08	11,26%
SMD-EBI	06	8,45%
SMD-EBII	05	7,04%
tSMD	02	2,81%
SMD hipocelular	01	1,40%
Formas da SMD		
Iniciais	59	80,8%
Avançadas	14	19,1%

A citogenética por banda G foi realizada para 59 pacientes, sendo que 45 (76,27%) pacientes apresentaram resultado e 14 (23,72%) pacientes apresentaram ausência de metáfases (Tabela 4). Dos 45 pacientes com resultado citogenético, 25 (55,55%) apresentaram cariótipo normal, frente a 20 (44,44%) de pacientes com alterações, sendo que 6 (13,33%) pacientes apresentaram alteração relacionada ao cromossomo 5 (-5/5q-), 3 (6,66%) pacientes apresentaram alteração relacionada ao cromossomo 7 (-7/7q-) e 14 (3,11%) dos pacientes apresentaram cariótipo com aneuploidia (Tabela 4). A figura 12 exemplifica os resultados da análise citogenética encontrados nesse estudo.

Figura 12: Achados de resultados de cariótipo



Legenda: A. Paciente do sexo feminino apresentando cariótipo normal 46, XX[20]. B. Paciente do sexo feminino apresentando cariótipo alterado com del(5q) C. Paciente do sexo masculino apresentando cariótipo complexo com del(7q), del(5q) e add 11 D. Paciente do sexo masculino apresentando cariótipo hiperdiploide 4n.

Quanto ao número de alterações, 9 (20%) pacientes apresentaram apenas 1 alteração, 5 (11,11%) pacientes apresentaram 2 alterações e 8 (17,77%) pacientes apresentaram cariótipo complexo, com 3 ou mais alterações em um mesmo clone (Tabela 4). Quanto ao prognóstico, estabelecido pelo IPSS-R (GREENBERG et al, 2012) houve um predomínio de pacientes com prognóstico favorável (22/45,83%) (Tabela 4).

Tabela 4: Caracterização da citogenética e impacto prognóstico.

Variáveis	Número de Pacientes	Porcentagem
Cariótipo (Normal/Alterado)		
Normal	25	55,55%
Alterado	20	44,44%
Cariótipo (Aneuploidia)		
Normal	25	55,55%
Alterado Aneuplóide	14	31,11%
Cariótipo (Deleção do 5q)		
Normal	25	55,55%
Alterado com deleção do 5q	06	13,33%
Alterado sem deleção do 5q	14	31,11%
Cariótipo (Deleção do 7q)		
Normal	25	55,5%
Alterado com deleção do 7q	03	6,66%
Alterado sem deleção do 7q	17	37,77%
Cariótipo (Alterações)		
Normal	25	55,55%
1 alteração	09	20%
2 alterações	05	11,11%
3 ou mais alterações (Complexo)	08	17,77%
Prognóstico segundo o IPSS-R		
Favorável	29	64,44%
Intermediário	05	11,11%
Desfavorável	08	17,77%

Quanto à sobrevida dos pacientes, obtivemos informação sobre o seguimento de 32 dos pacientes, destes, 06 (18,75%) pacientes a óbito. Quanto à evolução para LMA, obtivemos informação de 66 dos 73 pacientes, destes apenas 03 (4,54%) paciente evoluiu para LMA.

Tabela 5: Descrição clínica dos pacientes.

PACIENTE	SEXO	IDADE	CELULARIDADE	CARIÓTIPO	OMS 2016	IPSS-R	EV. LMA	ÓBITO
1	F	28	-	46 XX [20]	SMD-SA-DU	baixo risco	Não	Não
2	F	89	normo	46, XX [20]	AR	baixo risco	Não	Não
3	M	32	normo	46,XY, del(5)(q15q33), del(17)(p11.2)[7]/46,XY[13]	SMD-DM	baixo risco	Não	Sim
4	M	62	-	Ausência	SMD-DM	-	Não	Não
5	M	91	-	46,X-Y[4]/46,XY[16]	SMD-SA-DU	baixo risco	Não	Não
6	F	77	hiper	46, XX [15]	AR	baixo risco		Não
7	M	73	-	-	SMD-DM	-	Não	Não
8	M	45	hipo	47,XY,+mar[3]/46,XY[17]	SMD-DM	alto risco	Sim	Não
9	M	81	hiper	-	SMD- EB I	-	Não	Não
10	F	73	hiper	46,XX [25]	SMD-DM	baixo risco	Não	Sim
11	M	92	hiper	Ausência	SMD-DM	-	Não	Não
12	M	40	hipo	47,XY,+mar[6]/46,XY,del(5)(q31)[3]/46,XY,del(7)(q32)[2]/46,XY,del(5)(q31),del(7)(q32)[2]/46,XY[7]	SMD-DM	intermediário	Sim	Não
13	M	66	hiper	47,XY,+mar[5],46,XY[11]	SMD-DM	alto risco	Não	Não
14	M	85	hiper	46, XY [20]	SMD-DM	baixo risco	Não	Não
15	M	88	hiper	47,XY,+mar[6]/48,XY,+8,del(16)(?q22),+mar[4]/47~50,XY,del(4)(?q35),+8,+10,+11,del(16)(?q22),+21,+mar[cp8]	SMD- EB II	-	Não	Não
16	F	30	hipo	90,XXXX,-6,-7,-8,-11,+21,+22[5]/46,XX,del(7)(q23),del(20)(q13.1)[3]/45,XX,-7[5]/45~46,XX,-7,del(7)(q32),del(11)(q32),-17,del(17)(p11.2),del(20)(q13.1)[cp11]	t-SMD	alto risco	Não	Não
17	F		-	-	t-SMD	na	Não	Não
18	M	54	hipo	Ausência	SMD-DM	-	Não	-
19	M	46	hiper	46, XY[8]	SMD-DM	baixo risco	Sim	Não
20	M		-	-	AR	-	Não	Sim
21	M		-	-	SMD-DM	-	Não	-

22	F	64	hiper	-	SMD- EB II	baixo risco	Não	Sim
23	F	67	hiper	40-45,XX, -5, -6,-7,-9,-17[7]/46,xx,add(5)(p15)[3]/46,XX[14]	SMD-DM	intermediari o	Não	Não
24	F		hipo	46,XX[22]	SMD-DM	baixo risco	Não	Não
25	F	81	hipo	-	SMD-DM	-	Não	-
26	F	55	-	complexo, del 5, 8n-, 4(175 cromossomos)	SMD-DM	alto risco	Não	Não
27	F	84	hiper	Ausência	SMD-DM	-	Não	-
28	F		-	-	SMD-SA-DU	-	Não	-
29	F	23	hipo	46,XX,del(5)(q15q33)[4]/46,XX[18]	SMD-DM	baixo risco	Não	Não
30	F	77	normo	46 xx[3]	SMD-DM	baixo risco	Não	Não
31	F		-	-	SMD-DM	na	Não	-
32	F		-	-	SMD-DM	na	Sim	Não
33	F	80	hiper	46,XX[20]	SMD-SA-DM	baixo risco	Não	Não
34	M	80	hiper	45,X,-Y[18]/46,XY[7]	SMD-SA-DM	baixo risco	Não	Sim
35	M	73	hiper	-	SMD- EB I	-	Sim	-
36	M	81	hipo	46,XY[18]	SMD-DM	baixo risco	Não	Sim
37	M	87	hiper	Ausência	SMD-DM	-	Sim	-
38	M	58	hipo	46,XY[13]	SMD-DM	intermediari o	Não	Não
39	F	72	hiper	46, XX [5]	SMD-DM	baixo risco	Não	Não
40	F	56	hiper	46, XX [11]	SMD-SA-DM	baixo risco	Não	Sim
41	F	74	hiper	Ausência	SMD-DM	intermediari o	Não	Não
42	M	73	hiper	46, XY, add(5)(p14), del(7)(q32)[2]/46,XY, del(7) (q32)[3]/46,XY[15]	SMD-DM	alto risco	Não	Não
43	M	76	hiper	Ausência	SMD-DM	-	Sim	-
44	F	75	hiper	46, XX [14]	SMD-DM	intermediari o	Não	Não
45	F	59	hiper	47,XX,+8[11]/47,XX,+8,del(5)(q31)[2]47,XX,+8,del(11)(q22)[2]47,XX,+8,del(5)(q31,del(11)(q22)[2]/46,XX[3]	SMD- EB II	alto risco	Não	Não
46	M	61	hiper	Ausência	SMD-SA-DM	-	Não	Não

47	M	59	-	Ausência	SMD-DM	-	Não	-
48	F	54	-	47,XY,del(5)(q31),+mar[7]/46,XY,del(11)(q23)[3]/46,XY,del(5)(q31),del(11)(q23)[5].	SMD-SA-DM	-	Sim	Não
49	M	89	-	-	SMD-DM	baixo risco	Não	Não
50	M	77	hipo	Ausência	SMD-HIPO	-	Não	Não
51	F	87	normo	46 XX [10]	SMD-DM	intermediário	Não	Não
52	F	92	hipo	46 XX [20]	SMD-DM	baixo risco	Não	Não
53	F	86	hipo	Ausência	SMD-DM	-	Não	-
54	F	53	hiper	46 XX [20]	SMD-DM	baixo risco	Não	Não
55	F	55	normo	complexo	SMD-DM	intermediário	Não	Não
56	M	71	-	46 XY [20]	SMD-DM	baixo risco	Não	Não
57	F	79	hiper	Ausência	SMD-DM	-	Não	-
58	F	44	-	-	SMD-DM	-	Sim	Sim
59	M	67	hiper	Ausência	SMD-DM	-	Não	-
60	M	77	hiper	47 XY [20]	SMD-EB I	alto risco	Não	Não
61	F	71	hiper	46,XX[20]	SMD-SA-DM	baixo risco	Sim	Sim
62	M	68	hipo	47 XY [20]	SMD-SA-DM	Muito baixo	não	não
63	F	74	hiper	46,XX[20]	SMD-DM	Baixo	não	não
64	M	71	hiper	45, X, -Y[19]/46,XY[1]	SMD-DU	Muito baixo	não	não
	M	83	hiper	45,X,-Y[6]/45,XY[14]	SMD-DM	Muito baixo	não	não
65	M	78	hiper	46, XX[20]	SMD-DM	Muito baixo	sim	não
66	F	67	hiper	-	SMD-EBI	intermediário	não	não

67	F	66	hiper	-	SMD- EB I	intermediari o	não	sim
68	M	71	hiper	46,XY,der(7)t(1;7)(q10;q10)[18]/46,XY[2]	SMD- EB II	Baixo risco	não	não
69	M	77	hiper	-	SMD-DU	intermediari o	não	não
70	F	-	hipo	-	SMD-SA-DM	-	não	não
71	F	-	-	Ausência	SMD- EB I	-	não	não
72	F	-	normo	48,XX,+19,+mar1[10]/48,XX,+mar1,+mar2[6]/47,XX,+mar1[3]/46XX[3]	SMD-EB II	intermediari o	não	sim
73	M	70	hiper	46, XY,add(17)(p13)[8]/46,XY,del(9)(q13),add(17)(p13)[10]/46,XY[2]	SMD-SA-DU	Muito alto	Sim	não

Legenda: M (Masculino), F (Feminino), OMS (Organização Mundial de Saúde), IPSS-R (Sistema Internacional de Score Prognóstico Revisado), DT (Dependência Transfusional), Ev.LMA (Evolução para Leucemia Mielóide Aguda), CRDU (Citopenia Refratária com Displasia em Única linhagem), ARSA (Anemia Refratária com Sideroblastos em Anel), CRDM (Citopenia Refratária com Displasia em Múltiplas linhagens), AREB I (Anemia Refratária com Excesso de Blastos tipo I), AREB II ((Anemia Refratária com Excesso de Blastos tipo II), t-SMD (SMD relacionada a terapia), LMMC (Leucemia Mielomonocítica Crônica)

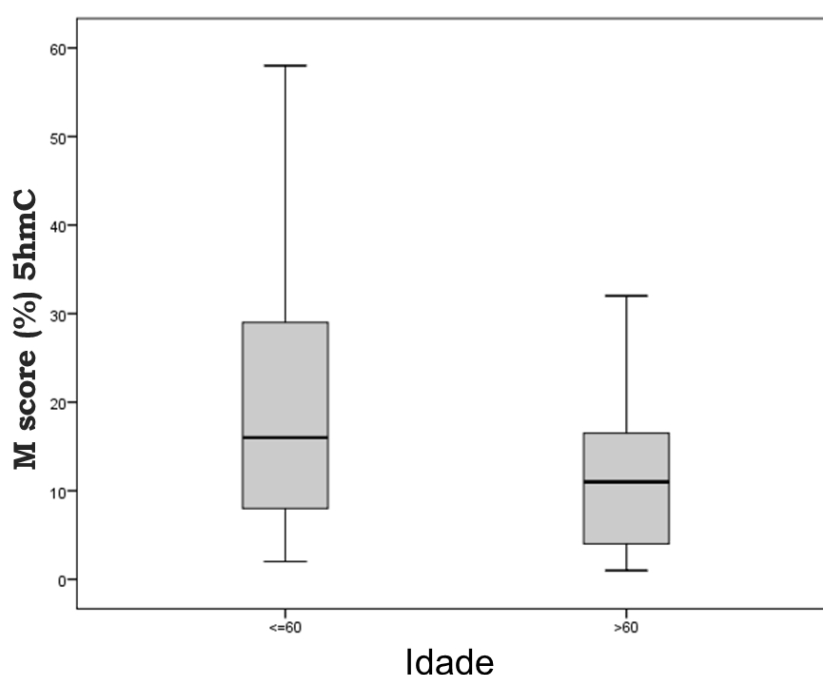
4.2 Análise dos níveis de metilação e hidroximetilação global por imunohistoquímica

As associações entre os níveis de imunopressão de 5mC e 5hmC e as variáveis clínico-laboratoriais, bem como a associação com os indivíduos controles, serão apresentados a seguir. Para melhor entendimento os resultados serão apresentados separadamente para os valores de M-score e Ratio.

4.2.1 Associação da metilação global (M-score) de 5mC e 5hmC e variáveis clínicas

Para a variável idade, estratificada em dois grupos: >60 anos e <60 anos, constatamos que pacientes com idade inferior a 60 anos apresentavam aumento dos níveis 5hmC ($p=0,044$) (Figura 15).

Figura 13: Mscore 5hmC frente a variável idade.

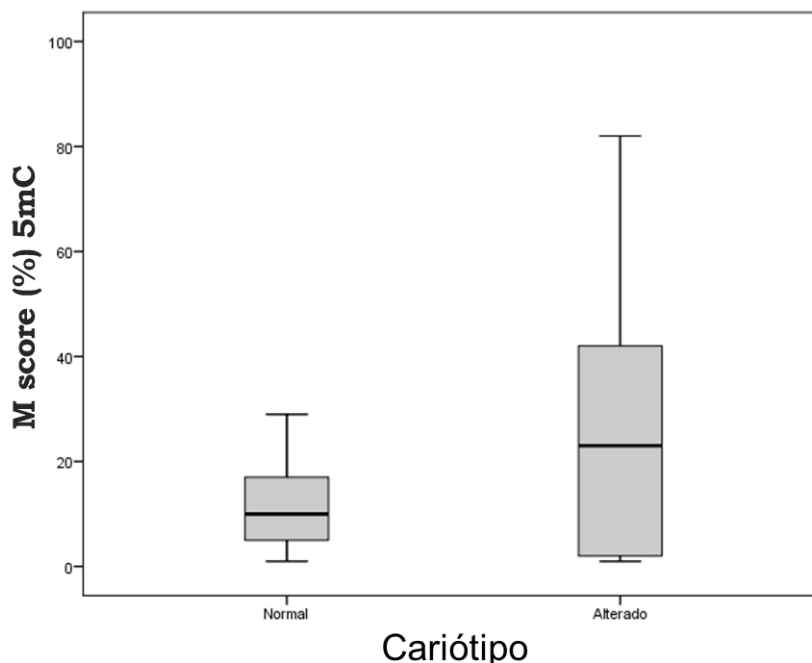


M-score 5hmC	Níveis de metilação global (%)						
	Idade	Média	Desvio Padrão	IC inferior	IC superior	Teste levene	p-valor
≥60		21,44	17,712	2,743	17,332	0,002	0,044
<60		11,40	8,371				

‡Teste t de Student. Teste de Levene - Teste de homogeneidade de variâncias. Valor estatisticamente significativo para $p \leq 0,05$.

Quanto ao cariótipo, observou-se que níveis de 5mC estão aumentados nos pacientes com cariótipo alterado ($p = 0.022$), em comparação com os que apresentavam cariótipo normal (Figura 21).

Figura 14: Níveis de Mscore 5mC frente a variável de citogenética.



M-score 5mC	Níveis de metilação global (%)						
	Cariótipo	Média	Desvio Padrão	IC inferior	IC superior	Teste levene	p-valor
Normal		11,43	7,750	-25,737	-3,759	0,001	0,022
Alterado		26,18	23,357				

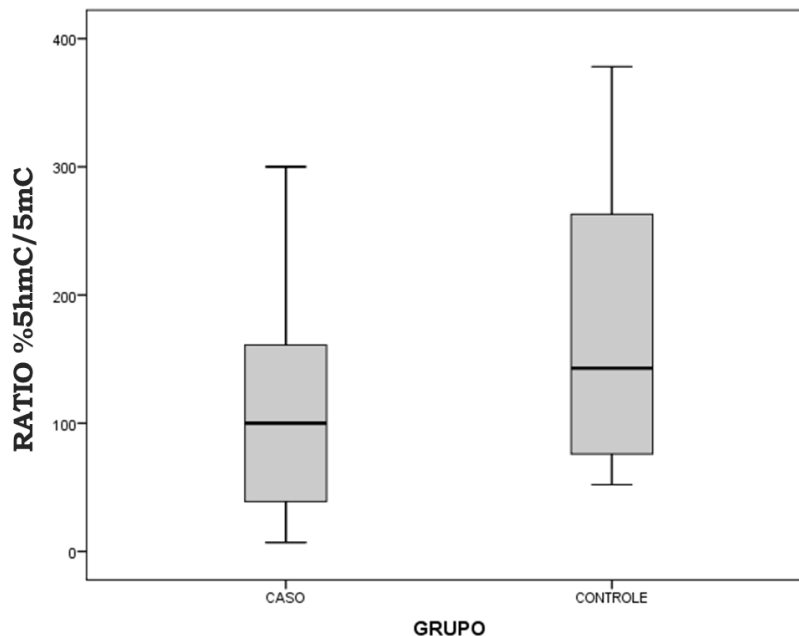
‡Teste t de Student. Teste de Levene - Teste de homogeneidade de variâncias. Valor estatisticamente significativo para $p \leq 0,05$.

Não houve associações significantes com relação aos níveis globais de 5mC e 5hmC e as variáveis sexo, classificação da OMS (2008 e 2016), presença de micromegacariócito, sideroblastos em anel, faixas de porcentagens de sideroblastos em anel, presença de fibrose, porcentagens de blastos (IPSS-R), cariótipo (aneuploidia), cariótipo (alteração no cromossomo 7), cariótipo (número de alterações), Quanto à prognóstico (IPSS-R), classificação do número de citopenias no sangue periférico, classificação do grupo de risco de acordo com o IPSS-R, dependência transfusional, tratamento com eritropoietina, óbito e evolução para LMA ($p > 0,05$).

4.2.2 Associação do Ratio 5hmC/5mC com as variáveis clínicas e prognósticas

Ao avaliar a relação 5hmC/5mC em pacientes com SMD e controles, verificamos que houve aumento dos níveis de 5hmC em relação 5mC no grupo controle em relação aos casos com SMD ($p = 0.031$) (Figura 15).

Figura 15: Níveis de relação 5hmC/5mC frente a variável grupos.

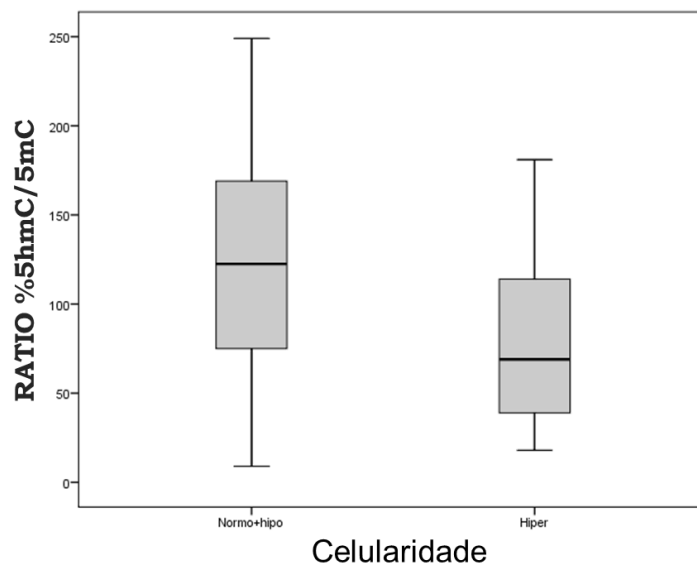


5hmC/5mC	Ratio (%)						
	Grupo	Média	Desvio Padrão	IC inferior	IC superior	Teste levene	p-valor
Caso		110,63	77,217	-124,239	-6,275	0,066	0,031
Controle		175,89	111,654				

†Teste t de Student. Teste de Levene - Teste de homogeneidade de variâncias. Valor estatisticamente significativo para $p \leq 0,05$.

Quanto à celularidade, categorizada em dois grupos: normocelular+hipocelular e hiper celular, observou-se que houve aumento dos níveis 5hmC em relação 5mC ($p=0.012$) naqueles pacientes com medula óssea hiper celular (Figura 16).

Figura 16: Níveis de relação 5hmC/5mC e relação 5hmC/5mC frente a variável celularidade.



5hmC/5mC	Ratio (%)						
	Celularidade	Média	Desvio Padrão	IC inferior	IC superior	Teste levene	p-valor
Hipo+Normo		122,39	69,698	10,591	81,947	0,080	0,012
Hiper		76,12	46,247				

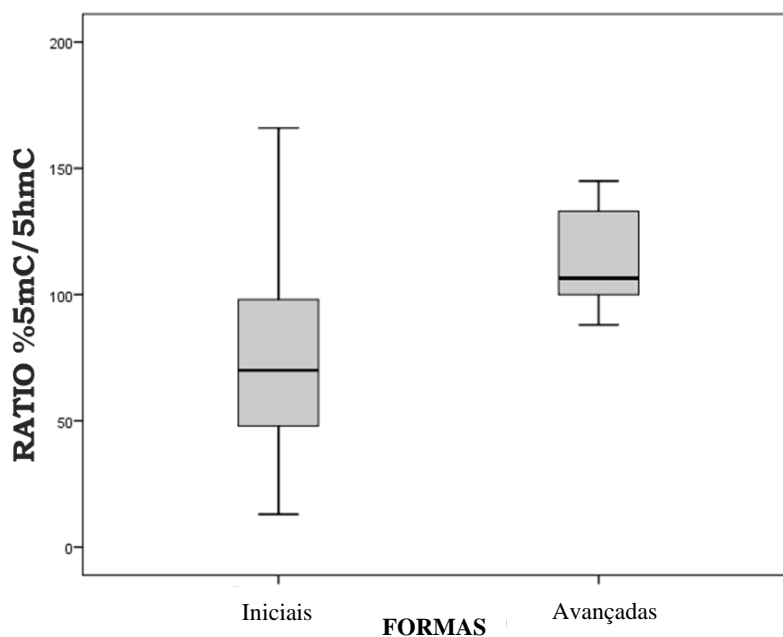
‡Teste t de Student. Teste de Levene - Teste de homogeneidade de variâncias. Valor estatisticamente significativo para $p \leq 0,05$.

Não houve associações significantes com a relação do ratio de 5hmC/5mC e as variáveis sexo, classificação da OMS (2008 e 2016), idade, presença de micromegacariócito, sideroblastos em anel, faixas de porcentagens de sideroblastos em anel, presença de fibrose, porcentagens de blastos (IPSS-R), cariótipo (aneuploidia), cariótipo (alteração no cromossomo 7), cariótipo (número de alterações), Quanto à prognóstico (IPSS-R), classificação do número de citopenias no sangue periférico, classificação do grupo de risco de acordo com o IPSS-R, dependência transfusional, tratamento com eritropoietina, óbito e evolução para LMA ($p > 0,05$).

4.2.3 Associação do Ratio 5mC/5hmC com as variáveis clínicas e prognósticas

Em relação à forma da doença, categorizada em formas iniciais (SMD-DU, SMD-DM e SMD-SA) e avançadas (SMD-EB1 e SMD-EB2), verificamos que os níveis de 5mC ($p=0.040$) apresentavam-se aumentados naqueles pacientes nos estágios avançados da doença (Figura 17).

Figura 17: Níveis de relação 5mC/5hmC frente a variável formas avançadas e iniciais.

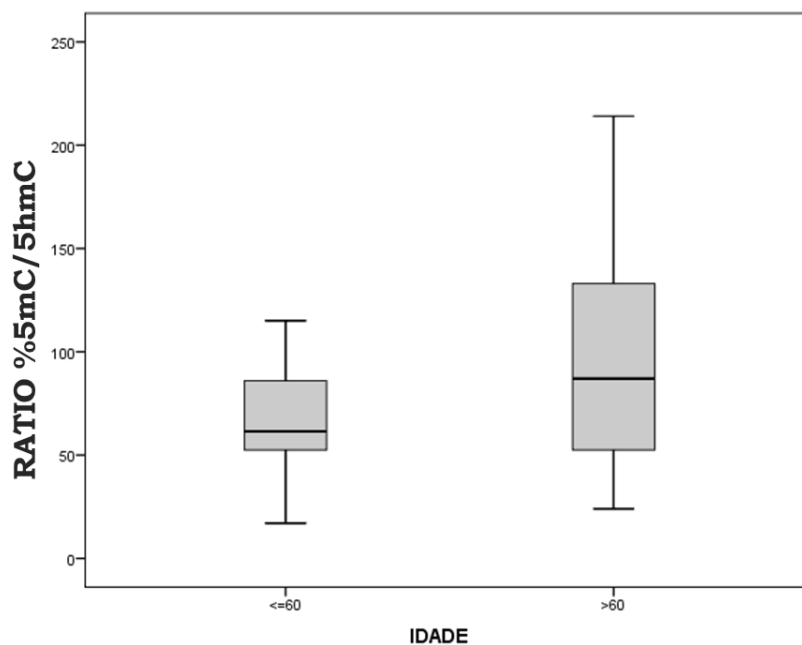


5mC/5hmC	Ratio (%)					
	Média	Desvio Padrão	IC inferior	IC superior	Teste levene	p-valor
Iniciais	75,78	41,831	-72,922	-1,856	0,149	0,040
Avançadas	113,17	21,646				

‡Teste t de Student. Teste de Levene - Teste de homogeneidade de variâncias. Valor estatisticamente significativo para $p \leq 0,05$.

Para a variável idade associada ao ratio 5mC/5hmC, estratificada em dois grupos: >60 anos e <60 anos, constatamos que pacientes com idade superior a 60 anos apresentavam aumento dos níveis 5mC ($p=0.017$) em relação a 5hmC (Figura 18).

Figura 18: Níveis da relação 5mC/5hmC frente a variável idade.

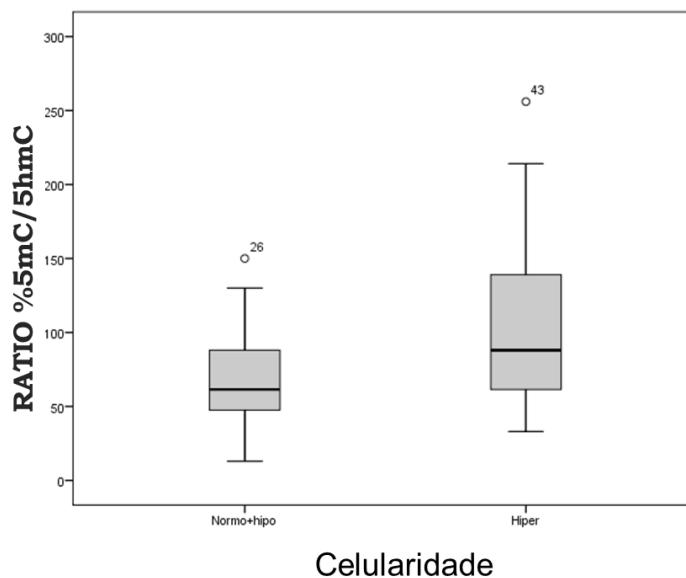


5mC/5hmC	Ratio (%)					
Idade	Média	Desvio Padrão	IC inferior	IC superior	Teste levene	p-valor
≥60	65,58	29,651	-64,446	-1,113	0,032	0,017
<60	97,25	52,987				

†Teste t de Student. Teste de Levene - Teste de homogeneidade de variâncias. Valor estatisticamente significativo para $p \leq 0,05$.

Quanto à celularidade, categorizada em dois grupos: normocelular+hipocelular e hiper celular, observou-se que houve aumento dos níveis 5mC em relação 5hmC ($p=0.047$) naqueles pacientes com medula óssea hiper celular (Figura 19).

Figura 19: Níveis de relação 5hmC/5mC e relação 5mC/5hmC frente a variável celularidade.

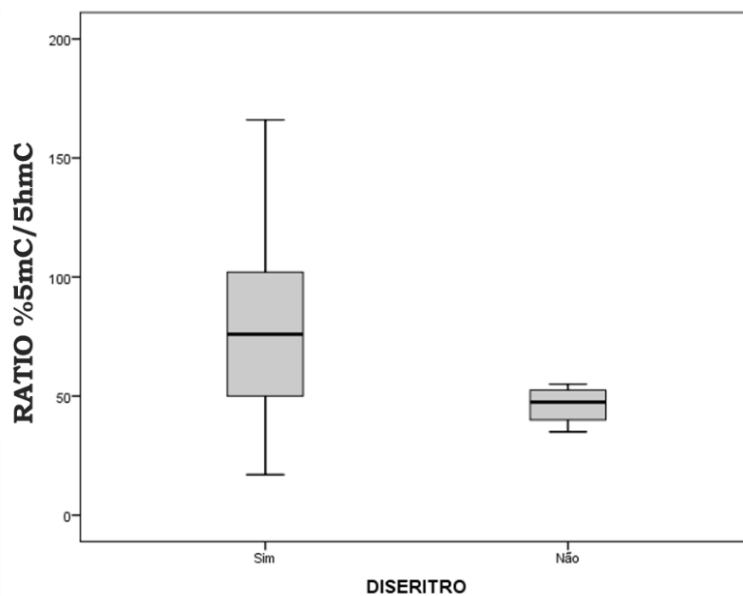


5mC/5hmC	Ratio (%)					
Celularidade	Média	Desvio Padrão	IC inferior	IC superior	Teste levene	p-valor
Hipo+Normo	70,06	36,075	69,189	-0,512	0,052	0,047
Hiper	104,91	60,586				

†Teste t de Student. Teste de Levene - Teste de homogeneidade de variâncias. Valor estatisticamente significativo para $p \leq 0,05$.

Quanto ao setor eritrocítico, constatamos que os níveis de 5mC apresentava-se aumentados ($p = 0,000$) em relação aos níveis de 5hmC nos pacientes com presença de displasia eritroide (figura 20).

Figura 20: Níveis de relação 5mC/5hmC frente as variáveis diseritropese.

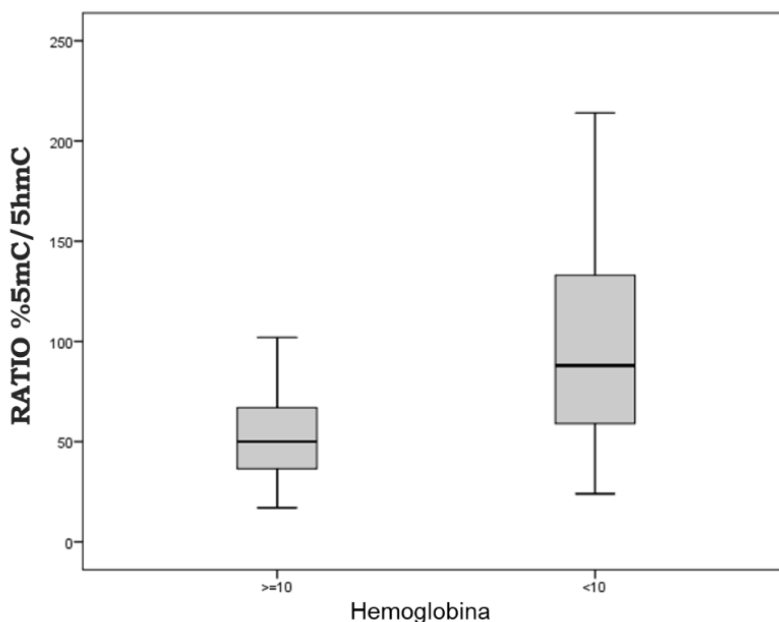


5mC/5hmC	Ratio (%)					
Diseritro	Média	Desvio Padrão	IC inferior	IC superior	Teste levene	p-valor
Sim	80,45	40,986	-8,003	76,412	0,043	0,000
Não	46,25	8,539				

‡Teste t de Student. Teste de Levene - Teste de homogeneidade de variâncias. Valor estatisticamente significativo para $p \leq 0,05$.

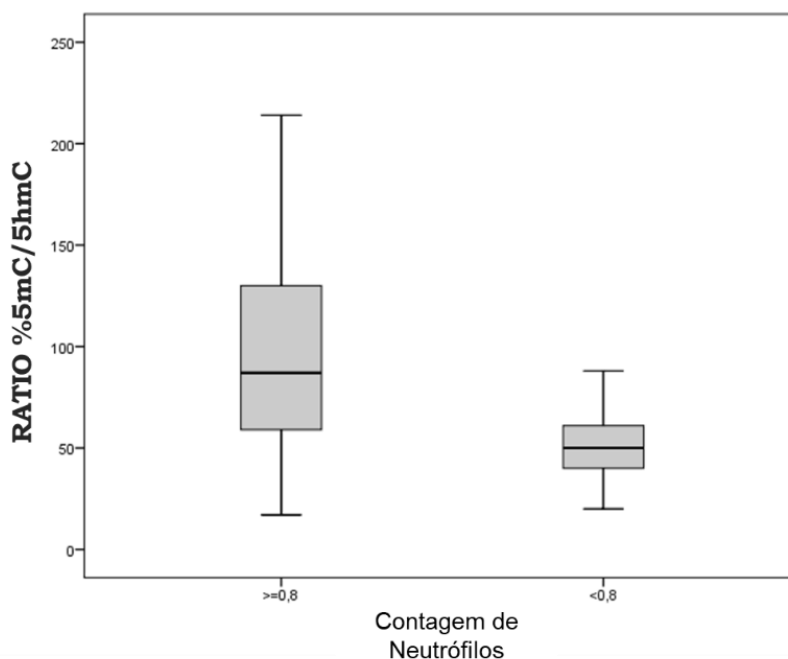
Com relação aos valores de hemoglobina, os níveis de 5mC em relação aos níveis de 5hmC apresentaram-se mais altos em pacientes com hemoglobina inferior a 10 g/dL, quando comparado a pacientes com hemoglobina superior a 10 g/dL ($p = 0,000$) (Figura 21).

Figura 21: Níveis de relação 5mC/5hmC frente a variável hemoglobina.



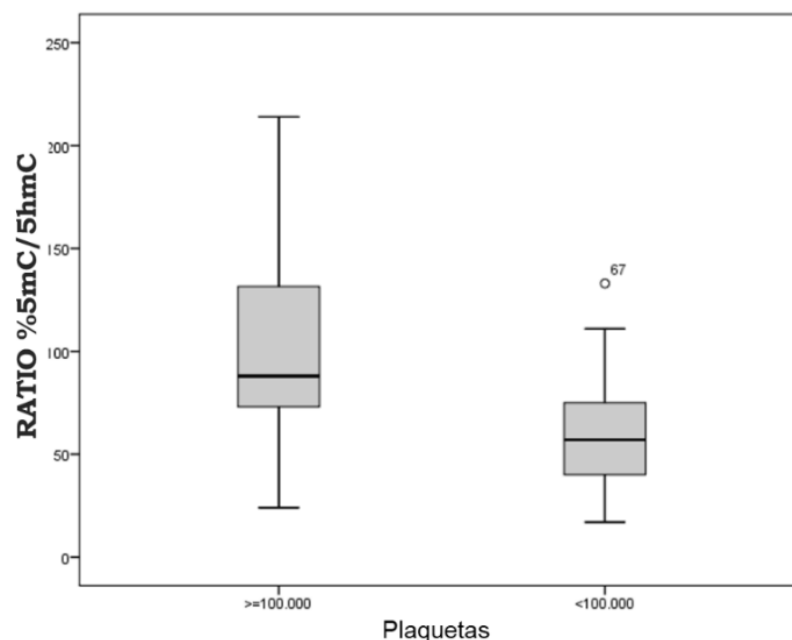
Na avaliação da contagem absoluta de neutrófilos (ANC) observamos que os níveis de 5mC em relação aos níveis de 5hmC apresentavam-se aumentados naqueles pacientes com ANC superior a 800/mm³ ($p=0,000$) (Figura 22).

Figura 22: Níveis de relação 5mC/5hmC frente a variável contagem absoluta de neutrófilos.



Na avaliação da contagem de plaquetas observamos que valores mais altos de plaqueta no sangue periférico estão associados a um aumento dos níveis de 5mC em relação aos níveis de 5hmC, quando comparados a pacientes com contagem de plaquetas inferior a 100.000/mm³ ($p = 0,005$) (Figura 24).

Figura 23: Níveis de relação 5mC/5hmC frente a variável contagem de plaquetas.



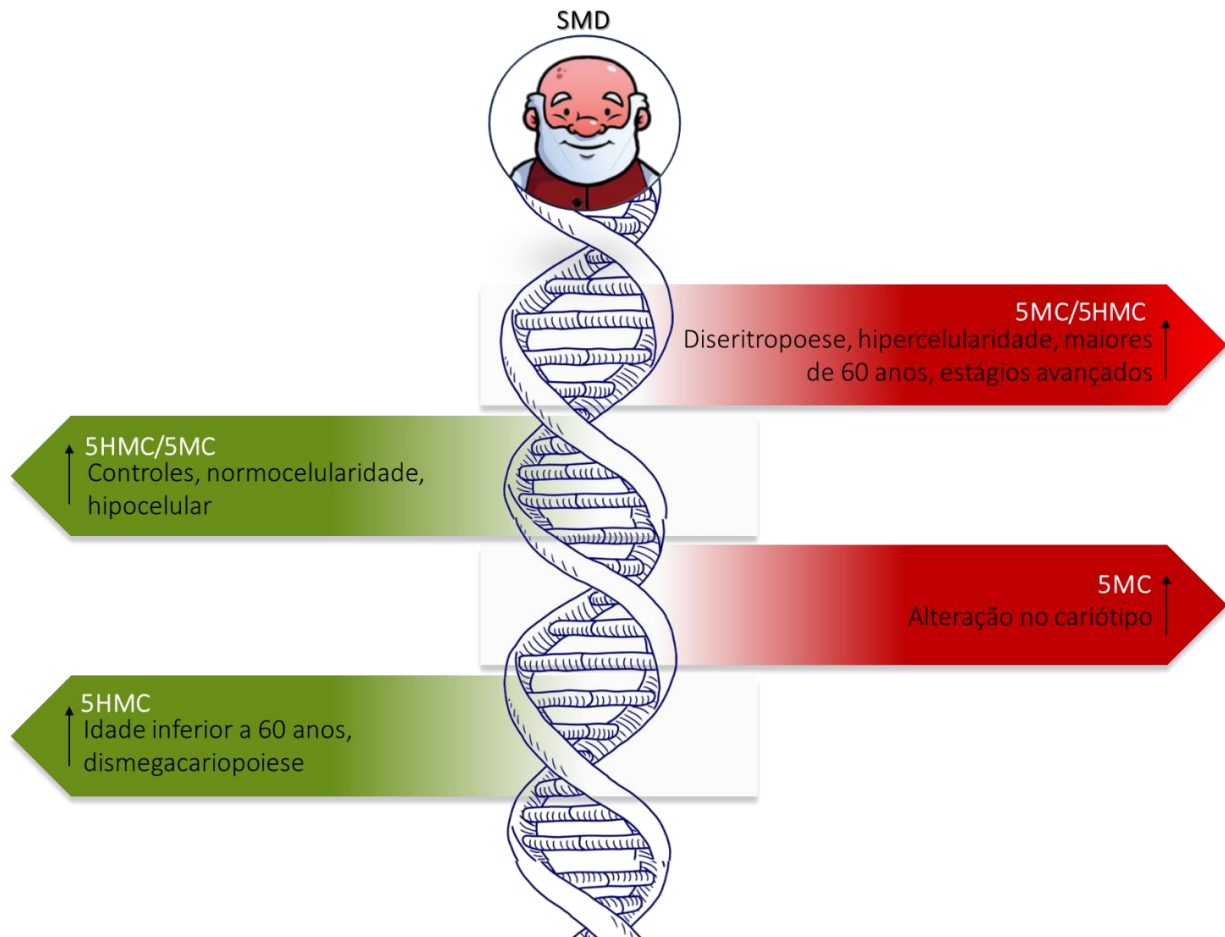
5mC/5hmC	Ratio (%)					
Hemoglobina	Média	Desvio Padrão	IC inferior	IC superior	Teste levene	p-valor
≥10 g/dl	13,61	24,159	-76,758	-15,476	0,023	0,000
<10 g/dl	27,17	51,733				
5mC/5hmC	Ratio (%)					
Cont. Neu	Média	Desvio Padrão	IC inferior	IC superior	Teste levene	p-valor
≥ 0,8 g/dl	95,74	51,096	8,617	79,298	0,027	0,000
< 0,8 g/dl	51,78	19,974				
5mC/5hmC	Ratio (%)					
Plaquetas	Média	Desvio Padrão	IC inferior	IC superior	Teste levene	p-valor
≥100.000 g/dl	101,58	50,532	13,375	68,125	0,078	0,005
<100.000 g/dl	60,83	31,388				

#Teste t de Student. Teste de Levene - Teste de homogeneidade de variâncias. Valor estatisticamente significativo para $p \leq 0,05$.

Não houve associações significantes com a relação do ratio de 5mC/5hmC e as variáveis sexo, classificação da OMS (2008 e 2016), grupo, presença de micromegacariócito, sideroblastos em anel, faixas de porcentagens de sideroblastos em

anel, presença de fibrose, porcentagens de blastos (IPSS-R), cariótipo (aneuploidia), cariótipo (alteração no cromossomo 7), cariótipo (número de alterações), Quanto à prognóstico (IPSS-R), dependência transfusional, tratamento com eritropoietina, óbito e evolução para LMA ($p > 0,05$).

Figura 24: Representação esquemática dos resultados encontrados.



4.3 Análise da expressão genica da população

Após a análise de pareamento de populações no banco de dados de expressão gênica do laboratório citogenômica do câncer foi possível obter resultados de expressão gênica da população do estudo. Dos 61 pacientes incluídos neste estudo, 28 (45,90%) possuíam expressões genicas dos genes de ciclo celular e fuso mitótico (*MAD2*, *AURKA*, *AURKB*, *CDC20* e *TPX2*). Já dos genes de reparo do DNA (*ATM*, *RAD51*, *LIG 4*, *BRCA1*, *BRCA2*, *XRCC5*, *XRCC6*, *XPA*, *XPC*, *XPG*, *CSA* e *CSB*) foram pareados 22 (36,06%) pacientes. E por fim genes de polimerases com atividade de translesão (*REV3L*, *REVI*, *POLI*, *POLH*, *POLL*, *POLK*, *POLQ*, *POLN* e *PCNA*), os quais foram pareados 16 (26,22%) pacientes.

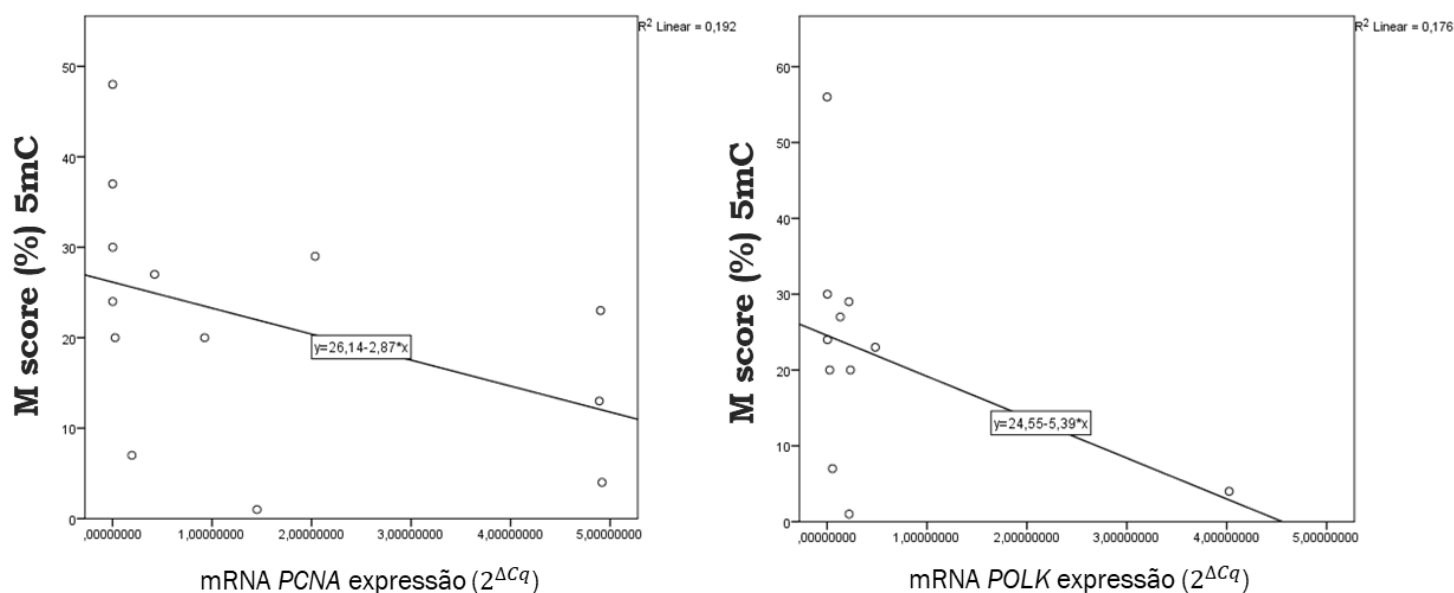
Tabela 6: Caracterização de expressão gênica da população em estudo.

	GENES	N	PORCENTAGEM
CICLO CELULAR E FUSO MITÓTICO	<i>MAD2, AUKA, AUKB, CDC20 E TPX2</i>	28	45,90%
REPARO DO DNA	<i>ATM, RAD51, LIG4, BRCA1, BRCA2, XRCC5, XRCC6, XPA, XPC, XPG, CSA E CSB</i>	22	36,06%
POLIMERASES DE TRANSLEÇÃO	<i>REV3L, REV1, POLI, POLH, POLL, POLK, POLQ, POLN E PCNA</i>	16	26,22%

4.3.1 Análise de correlação entre os níveis de expressão gênica e níveis de metilação global

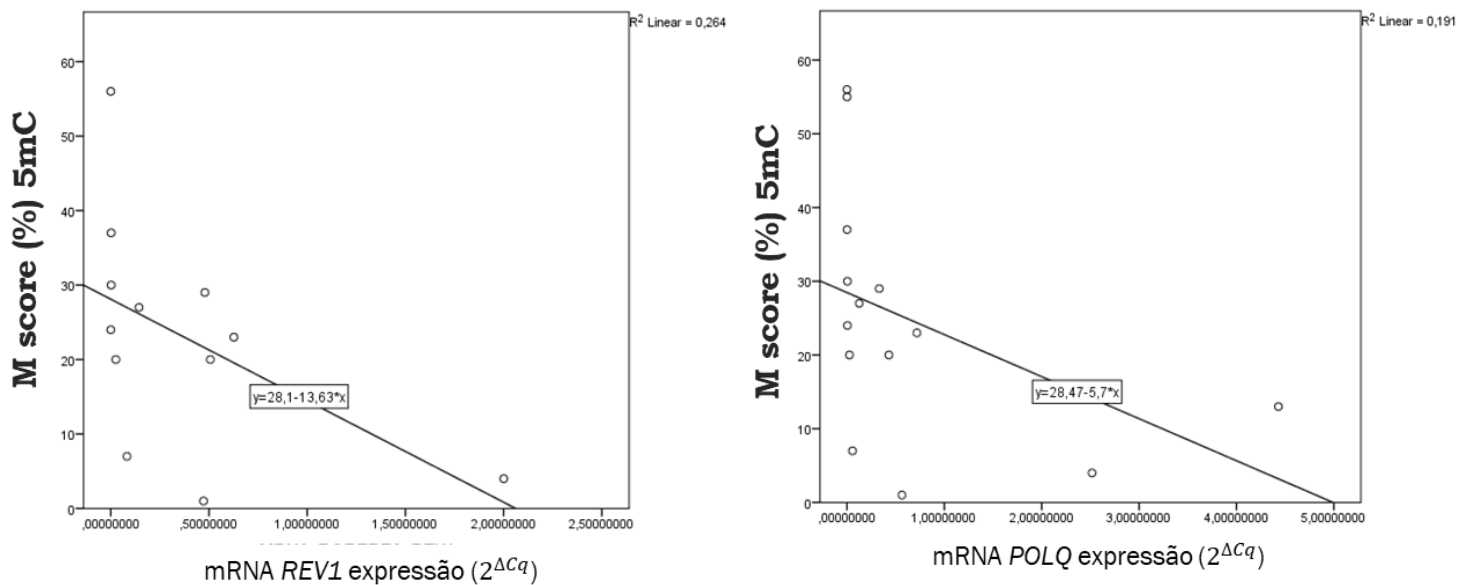
O coeficiente de correlação de Spearman foi realizado para analisar a intensidade da associação não linear existente entre os genes e os níveis de metilação global estudados. Observou-se moderada correlação entre o gene PCNA e a imunexpressão de 5mC ($r = -0,635$; $p = 0,020$), demonstrando uma influência de 19,2% ($r^2 = 0,192$) na variação dos níveis de expressão desse gene sobre a relação de metilação global (Figura 25); POLK e a imunexpressão de 5mC ($r = 0,633$; $p = 0,036$), apresentando uma influência de 17,6% ($r^2 = 0,176$) nos seus níveis de expressão gênica (Figura 25).

Figura 25: Gráfico da correlação de spearman entre a expressão gênica das polimerases com atividade de translesão, PCNA e POLK e o Mscore 5mC.



Observou-se moderada correlação entre o gene *REV1* e a imunexpressão de 5mC ($r = -0,577$; $p = 0,049$), demonstrando uma influência de 26,4% ($r^2 = 0,264$) na variação dos níveis de expressão desse gene sobre a relação de metilação global (Figura 26); *POLQ* e a imunexpressão de 5mC ($r = -0,789$; $p = 0,001$), apresentando uma influência de 19,1% ($r^2 = 0,191$) nos seus níveis de expressão gênica (Figura 26).

Figura 26: Gráfico da correlação de spearman entre a expressão gênica das polimerases com atividade de translesão, *REV1* e *POLQ*, e o Mscore 5mC.



Não encontramos correlação significativa entre os níveis das razões 5mC, 5hmC e 5mC / 5hmC e os genes *AURKA*, *AURKB*, *MAD2*, *CDC20*, *TPX2*, *ATM*, *RAD51*, *LIG4*, *BRCA1*, *BRCA2*, *XRCC5*, *XRCC6*, *XPA*, *XPC*, *XPG*, *CSA* e *CSB* ($p > 0,05$) (Anexo 1).

5. DISCUSSÃO

A hipermetilação do DNA tem sido reconhecida como uma característica comum da SMD e associada ao prognóstico desfavorável nesses pacientes (HEUSER et al, 2018). O silenciamento causado pelos processos epigenéticos em vários genes, incluindo reguladores do ciclo celular, genes apoptóticos e de reparo do DNA, têm importante papel na patogênese e transformação leucêmica da doença. No entanto, as causas e consequências da alteração dos mecanismos de metilação envolvidos na SMD ainda não foram completamente elucidados (KHAN et al 2013).

5.1 Aumento dos níveis de metilação em pacientes com SMD

Nossos resultados demonstram que pacientes com síndrome mielodisplásica (SMD) apresentam maiores níveis de metilação global do DNA em relação ao grupo controle pela análise da relação entre 5hmC e 5mC ($p=0,031$). Algumas pesquisas avaliaram a metilação global do DNA em pacientes com SMD, porém, apenas a metilcitosina ou hidroximetilcitosina isoladamente, sendo o nosso o primeiro estudo a avaliar por imuno-histoquímica simultaneamente metilcitosina e hidroximetilcitosina na SMD.

Os grupos de Poloni (2013) e Chandra (2017) demonstraram por imuno-histoquímica que pacientes com SMD apresentaram níveis de 5-mC elevados em relação aos controles, indicando fortemente o papel na hipermetilação global do DNA no processo de patogênese da doença (POLONI et al, 2013; CHANDRA et al, 2017). Em 2014, Calvo e colaboradores também demonstraram, por ensaio colorimétrico, elevados níveis de 5mC em pacientes com SMD, entretanto não realizaram associação com controles saudáveis (CALVO et al, 2014). Liu e colaboradores (2013), também por ensaio colorimétrico, demonstraram que pacientes com SMD apresentaram níveis de 5hmC significativamente menores do que os controles saudáveis (LIU et al, 2013).

Consideramos que a análise levando em consideração o processo de demetilação em relação a metilação é mais fidedigno que a mera avaliação da metilcitosina isoladamente. Contudo, esses estudos demonstram que pacientes com SMD possuem um perfil global de hipermetilação do DNA, corroborando com os nossos resultados.

Adicionalmente, categorizamos a SMD nas suas formas iniciais (SMD-DU, SMD-DM e SMD-SA) e avançadas (SMD-EB1 e SMD-EB2) (de acordo com a classificação da

OMS de 2016) e observamos que pacientes nas formas mais avançadas apresentaram níveis de 5mC mais elevados ($p=0,040$). Esses resultados corroboram com os achados da literatura de que o aumento da metilação do DNA está associado aos perfis mais avançados da SMD e a um maior risco para a progressão para LMA, mostrando que a hipermetilação do DNA está relacionada a um prognóstico desfavorável na SMD (ISSA, 2010; TSAI et al, 2012; POLONI et al, 2013; CHANDRA et al, 2017).

5.2 Aumento dos níveis de metilação em pacientes com idade superior a 60 anos

Sabe-se que o risco para o acometimento da SMD aumenta de acordo com o avanço da idade, sendo que aproximadamente 86% dos casos diagnosticados são indivíduos com mais de 60 anos (CHESON et al., 2006; ROLLISON et al., 2008). Nossos resultados demonstram que pacientes com idade superior a 60 anos de idade apresentam maiores níveis de metilação global do DNA ($p=0,044$), resultado também encontrado na análise da razão de 5mC/5hmC ($p=0,017$). Em 2014, Maegawa e colaboradores avaliaram a relação da metilação com a idade em portadores de SMD e relataram uma consistência nos padrões de metilação aberrante do DNA em pacientes maiores que 60 anos. Estes achados propuseram que a hipermetilação de promotores gênicos estaria associada a um fenótipo de envelhecimento acelerado na SMD (MAEGAWA et al, 2014).

Nenhum outro estudo que avaliou os níveis de 5-mC ou 5hmC na SMD apresentou associações significantes com relação a idade dos pacientes (CHANDRA et al, 2017; POLONI et al, 2013; CALVO et al, 2014). Desse modo, nosso estudo é o primeiro a relatar significância nos níveis de 5-mC de pacientes com SMD em relação à idade. Esse resultado pode estar relacionado com o fato de que cerca de 90% dos pacientes classificados como de alto risco (GREENBERG et al, 2012), apresentaram idade superior a 60 anos.

5.3 Aumento dos níveis de 5mC em pacientes com cariótipo alterado

Outro resultado importante do nosso estudo é que pacientes com alterações citogenéticas apresentam aumento dos níveis de metilação global do DNA ($p=0,022$). Dentre a grande maioria dos estudos que avaliaram os níveis de 5-mC em relação ao cariótipo de pacientes com SMD, apenas um demonstrou resultados significativos associando o aumento dos níveis de 5mc com cariótipo alterado (CHANDRA et al, 2017). Uma possível resposta pra essa divergência dos nossos achados e os da literatura, é que dos nossos pacientes que apresentaram alteração citogenéticas, cerca de 76% possuíam

alterações classificadas como prognóstico intermediário e desfavorável/muito desfavorável (GREENBERG ET AL, 2012). Já os outros estudos que analisaram os níveis de 5-mC em relação ao cariótipo, mesmo os que não obtiveram resultados significativos, a grande maioria dos pacientes apresentavam alterações citogenéticas classificadas como prognóstico favorável. (POLONI et al, 2013; SUČIĆ et al 2019; CALVO et al, 2014).

A presença de alterações citogenéticas é um dos principais fatores prognósticos na SMD (GREENBERG ET AL, 2012), portanto o aumento dos níveis de metilação nos pacientes com alterações citogenéticas corrobora com os resultados encontrados entre o aumento da metilação em pacientes com idade superior a 60 anos e nos pacientes nas formas avançadas da SMD. Nossos resultados sugerem que o aumento da metilação do DNA está associado ao aumento da instabilidade cromossômica e, conseqüentemente, a um prognóstico desfavorável e maior risco de transformação leucêmica.

5.4 Aumento da metilação em pacientes com medula óssea hiperclular

A maioria dos pacientes com SMD apresentam medula óssea hiperclular, a qual tem sido associada ao prognóstico desfavorável na doença (HUANG et al 2008). Nossos resultados demonstram que pacientes com medula óssea hiperclular apresentam níveis de demetilação inferiores aos pacientes com medula hipocelular e normocelular ($p=0,012$). O quadro de uma medula óssea hiperclular na SMD se deve à hematopoese ineficaz em função do aumento da susceptibilidade das linhagens progenitoras mieloides clonais ao processo de apoptose e a limitada capacidade de resposta dessas células aos fatores de crescimento, resultando em citopenias periféricas. (TEFFERI, VARDIMAN, 2009^a; ADES, 2014). Apesar de não termos encontrado estudos associando os níveis de 5mC e 5hmC com a celularidade da medula óssea na SMD, um estudo de Farlik e colaboradores (2016) avaliou o comportamento da metilação global do DNA nas células progenitoras hematopoiéticas e demonstrou que à medida que acontece a hematopoese a metilação global tende a diminuir (FARLIK et al, 2016). Assim, inferimos que o bloqueio da diferenciação celular, característica importante de pacientes com SMD hiperclular e nos estágios avançados, pode estar atrelado ao aumento da metilação global do DNA na doença.

Nosso estudo é o primeiro a avaliar a relação de metilação e demetilação em tecido histopatológico em pacientes com SMD. Com a análise *in situ* da relação 5hmC/5mC e 5mC/5hmC realizadas em biópsia de medula óssea, nossos resultados confirmam de

forma inequívoca que há um desbalanço na metilação global do DNA no processo de patogênese da SMD, tendo influência no desenvolvimento e evolução do quadro clínico.

5.5 Correlação da metilação global e a expressão dos genes de polimerases com atividade de translesão

Com relação à análise de correlação, descobrimos que, enquanto os níveis globais de 5mC aumentam, os níveis de RNAm de *POLQ*, *PCNA* e *POLK* apresentam uma diminuição, o que pode ser justificado pelo silenciamento genético causado pelo processo de metilação do DNA. Um estudo de Laport et al (2020) mostrou que formas não metiladas de *POLH* e *POLK* estão associadas a tumores mais avançados em pacientes com câncer colorretal. Além disso, a hiperexpressão das polimerases de DNA com atividade de translesão (TLS) está associada à tumorigênese de vários tipos de câncer (HOFFMANN E CAZAUX, 2010; PILLAIRE, 2010; CEPPI, 2009). Um estudo do nosso grupo de pesquisa demonstrou que a diminuição da expressão dos genes *POLK* e *POLQ* estava associada com medula hiperclular na SMD. Já a diminuição da expressão do gene *PCNA* estava associada ao aumento do número de displasia na medula óssea e citopenias no sangue periférico, indicando um pior prognóstico para pacientes com SMD (OLIVEIRA et al, 2019). Como a patogênese da SMD está fortemente ligada aos eventos de metilação do DNA, sugerimos o estudo da metilação alvo das polimerases TLS na SMD para inferir se essa família de genes tem a mesma expressão e padrão de metilação na SMD e nos tumores sólidos.

5.6 Limitações

Estamos cientes das limitações do estudo em biópsias de medula óssea uma vez que não foi possível analisar algumas das amostras devido à baixa qualidade de algumas amostras de biópsia, o que pode ter causado problemas na visualização da imunohistoquímica. Além disso, tivemos um número limitado de amostras controle (10), pois não é fácil obter amostras de biópsia da medula óssea de pacientes sem histórico de neoplasias, devido às dificuldades envolvidas no procedimento. Ainda, a imunohistoquímica possui limitações inerentes à técnica, como a presença de marcação celular inespecífica, alterações nas imagens microscópicas dos tecidos (por presença de bolhas, dobras do tecido, fendas, pigmentos, entre outros), dificuldade nas leituras de medulas hipocelulares, dentre outras (BARRA, 2006).

6. CONCLUSÃO

- I. O aumento dos níveis de 5mC pode estar associado a patogênese da SMD;
- II. O aumento dos níveis de 5mC nos estágios mais avançados da doença pode estar associada ao prognóstico desfavorável e à aumento do risco da evolução para LMA.
- III. O aumento dos níveis de 5mC pode estar associada a medula óssea hiperclular quando comprada com medula óssea normocelular e hipocelular. Portanto, inferimos que fica evidenciado que há uma distinção nas alterações da metilação global do DNA na SMD hiperclular e hipocelular.
- IV. O aumento dos níveis de 5mC associado a alteração cromossômica pode representar maior instabilidade cromossômica e uma possível associação ao prognóstico desfavorável.
- V. Estes resultados suportam a importância da regulação da metilação global do DNA na manutenção da estabilidade genômica das células tronco hematopoiéticas promovendo um melhor entendimento da etiologia, estratificação diagnóstica, prognóstica e do processo de evolução clonal da Síndrome Mielodisplásica.

7. REFERÊNCIAS

- ADÈS L, ITZYKSON R, FENAUX P. Myelodysplastic syndromes. **Lancet**. 2014;383(9936):2239–2252.
- AGGERHOLM, A., HOLM, M. S., GULDBERG, P., OLESEN, L. H., & HOKLAND, P. Promoter hypermethylation of p15INK4B, HIC1, CDH1, and ER is frequent in myelodysplastic syndrome and predicts poor prognosis in early-stage patients. **European Journal of Haematology**, 76(1), 23–322006
- ALVES G, TATRO A, FANNING T. Differential methylation of human LINE-1 retrotransposons in malignant cells. **Gene**. 1996 176:19-44
- ANISIMOV VN. Carcinogenesis and aging 20 years after: escaping horizon. *Mech Ageing Dev* 2009; 130:105-21.
- ARBER DA, et al. The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. **Blood**. 2016; 127(20): 2391-2405.
- BARNES, Jessica L. e colab. Carcinogens and DNA damage. **Biochemical Society Transactions**, v. 46, n. 5, p. 1213–1224, 2018.
- BARRA, MB. O uso da imunoistoquímica no diagnóstico: indicações e limitações. **Revista da AMRIGS**. 2006; 50(2):173-184.
- BAYLIN SB, JONES PA. A decade of exploring the cancer epigenome—Biological and translational implications. **Nat Rev Cancer** . 2011.11: 726–734.
- BEJAR R, et al. Clinical effect of point mutations in myelodysplastic syndromes. **N Engl J Med**, 2011; 364(26):2496-506.
- BEJAR R, STEENSMA DP. Recent developments in myelodysplastic syndromes. *Blood*. 2014;124(18):2793-2803.
- BEJAR, R.; EBERT, B. L. The genetic basis of myelodysplastic syndromes. **Hematol. Oncol. Clin. North Am.** 2010; 24(2):295-315, 2010.
- BESTOR, T. H. The DNA methyltransferases of mammals. **Hum Mol Genet** 9(16): 2395402. 2000
- BESTOR, TIMOTHY H., The DNA methyltransferases of mammals, **Human Molecular Genetics**, Volume 9, Issue 16, 1 October 2000, Pages 2395–2402
- BIRD A. DNA methylation patterns and epigenetic memory. **Genes Dev.**;16(1):6–21. 2002

BIRD A. DNA methylation patterns and epigenetic memory. *Genes Dev.*;16(1):6–21. 2002

BIRD A. Perceptions of epigenetics. *Nature.*;447(7143):396–398. 2007

BOLTON MA, LAN W, POWERS SE, MCCLELAND ML, KUANG J, STUKENBERG PT. Aurora B kinase exists in a complex with survivin and INCENP and its kinase activity is stimulated by survivin binding and phosphorylation. *Mol Biol Cell.* 2002;13(9):3064–3077.

BORGES DP, DOS SANTOS AWA, PAIER CRK, ET AL. Prognostic importance of Aurora Kinases and mitotic spindle genes transcript levels in Myelodysplastic syndrome. *Leuk Res.*;64:61–70. 2018

BUCKSTEIN R, YEE K, WELLS RA; Canadian Consortium on Evidence-based Care in MDS. 5-Azacytidine in myelodysplastic syndromes: a clinical practice guideline. *Cancer Treat Rev.* 2011;37(2):160–167.

CALVO X, NOMDEDEU M, NAVARRO A, et al. High levels of global DNA methylation are an independent adverse prognostic factor in a series of 90 patients with de novo MDS. *Leuk Res.* 2014; 38, 874-81.

CARDENAS A, RIFAS-SHIMAN SL, GODDERIS L, et al. Prenatal Exposure to Mercury: Associations with Global DNA Methylation and Hydroxymethylation in Cord Blood and in Childhood. *Environ Health Perspect.* 2017; 125(8):087022.

CHANDRA, D., TYAGI, S., SINGH, J., DEKA, R., MANIVANNAN, P., MISHRA, P., PATI, H. P., & SAXENA, R. Utility of 5-methylcytosine immunohistochemical staining to assess global DNA methylation and its prognostic impact in MDS patients. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention.* 2017; 18(12), 3307–3313.

CHANG DJ, CIMPRICH KA. DNA damage tolerance: when it's OK to make mistakes. *Nat Chem Biol.* 2009;5:82–90.

CHESON BD, GREENBERG PL, BENNETT JM, et al. Clinical application and proposal for modification of the International Working Group (IWG) response criteria in myelodysplasia. *Blood.* 2006;108(2):419–425.

COSTELLO JF, FRÜHWALD MC, SMIRAGLIA DJ, et al. Aberrant CpG-island methylation has non-random and tumour-type-specific patterns. *Nat Genet.* 2000

DANG, L., YEN, K., & ATTAR, E. C. IDH mutations in cancer and progress toward development of targeted therapeutics. *Annals of Oncology*, 27(4), 599–608. 2016.

DANTE R, DANTE-PAIRE J, RIGAL D, ROIZES G. Methylation Patterno of long interspersed repeated DNA and Alphoid repetitive DNA from human cell lines and tumors. *Anticancer Res.*1992. 12;559-863

DAYYANI F, CONLEY AP, STROM SS, et al. Cause of death in patients with lower-risk myelodysplastic syndrome. **Cancer**. 2010;116(9):2174-2179.

DE SMET, C LUCAS, S, , ARDEN, KC, VIARS, CS, LETHE, B, LURQUIN, C & BOON, T. Identification of a new MAGE gene with tumor-specific expression by representational difference analysis. **Cancer Res** .1998. 58: 743–752.

DE SOUSA JC, DA NÓBREGA ITO M, COSTA MB, et al. Dysregulation of interferon regulatory genes reinforces the concept of chronic immune response in myelodysplastic syndrome pathogenesis. **Hematol Oncol**. 2019;37(4):523-526.

DEANS, C., & MAGGERT, K. A. What do you mean, “Epigenetic”? **Genetics**, 199(4), 887–896. 2015

DENG CY, CHEN S, JIANG M, NILUPAR T, WANG H, HAO JP. ZHONGGUO SHI YAN XUE YE XUE ZA ZHI. Prognostic Value of Multigene Methylation in Patients With Myelodysplastic Syndrome. 2017;25(4):1118-1122.

ESTELLER M, GARCIA-FONCILLAS J, ANDION E, et al. Inactivation of the DNA-repair gene MGMT and the clinical response of gliomas to alkylating agents. **N Engl J Med**. 2000 Dec 7;343(23):1740.

ESTELLER M. Cancer epigenomics: DNA methylomes and histone-modification maps. **Nat Rev Genet** 2007;8:286-98.

ESTELLER M. CpG island hypermethylation and tumor suppressor genes: a booming present, a brighter future. **Oncogene** 2002;21:5427-40.

FARLIK, M., HALBRITTER, F., MÜLLER, F., CHOUDRY, F. A., EBERT, P., KLUGHAMMER, J., FARROW, S., SANTORO, A., CIAURRO, V., MATHUR, A., UPPAL, R., STUNNENBERG, H. G., OUWEHAND, W. H., LAURENTI, E., LENGAUER, T., FRONTINI, M., & BOCK, C. (2016). DNA Methylation Dynamics of Human Hematopoietic Stem Cell Differentiation. **Cell Stem Cell**, 19(6), 808–822.

FEINBERG AP, OHLSSON R, HENIKOFF S. The epigenetic progenitor origin of human cancer. **Nat Rev Genet**. 2006

FENAUX P, MUFTI GJ, HELLSTROM-LINDBERG E, et al. Efficacy of azacitidine compared with that of conventional care regimens in the treatment of higher-risk myelodysplastic syndromes: a randomised, open-label, phase III study. **Lancet Oncol**. 2009.

FIGUEROA ME, SKRABANEK L, LI Y, JIEMJIT A, FANDY TE, PAIETTA E et al. MDS and secondary AML display unique patterns and abundance of aberrant DNA methylation. **Blood** 2009; 114: 3448–3458.

FIGUEROA, M. E., ABDEL-WAHAB, O., LU, C., WARD, P. S., PATEL, J., SHIH, A., MELNICK, A. Leukemic IDH1 and IDH2 mutations result in a hypermethylation phenotype, disrupt TET2 function, and impair hematopoietic differentiation. **Cancer Cell**, 2010. 18(6), 553-67.

FRIEDBERG, EC.; WAGNER, R.; RADMAN, M. Specialized DNA polymerases, cellular survival, and the genesis of mutations. **Science**. 2002 May 31;296(5573):1627-30.

FUJII T, KHAWAJA MR, DINARDO CD, ATKINS JT, JANKU F. Targeting isocitrate dehydrogenase (IDH) in cancer. **Discov Med**. 2016

GAL-YAM EN, EGGER G, INIGUEZ L, et al. Frequent switching of Polycomb repressive marks and DNA hypermethylation in the PC3 prostate cancer cell line. **Proc Natl Acad Sci U S A**. 2008;105(35):12979–12984.

GARCIA-MANERO G, MONTALBAN-BRAVO G, BERDEJA JG, et al. Phase 2, randomized, double-blind study of pracinostat in combination with azacitidine in patients with untreated, higher-risk myelodysplastic syndromes. **Cancer**. 2017;123(6):994–1002.

GARCIA-MANERO, G. Myelodysplastic syndromes: 2011 update on diagnosis, risk-stratification, and management. **Am J Hematol**, v. 86, n. 6, p. 490-8, Jun 2011

GEIMAN TM, MUEGGE K. DNA methylation in early development. **Mol Reprod Dev**. 2010;77(2):105-113.

GENGA KR, FILHO FD, FERREIRA FV, et al. Proteins of the mitotic checkpoint and spindle are related to chromosomal instability and unfavorable prognosis in patients with myelodysplastic syndrome. **J Clin Pathol**. 2015; 0:1-7.

GOLDENSON B, CRISPINO JD. The Aurora Kinases in Cell Cycle and Leukemia. **Oncogene**. 2015; 34(5): 537-545.

GONZALO S. Epigenetic alterations in aging. **J Appl Physiol** 2010;109:586-97

GRAFF JR, HERMAN JG, LAPIDUS RG, et al. E-cadherin expression is silenced by DNA hypermethylation in human breast and prostate carcinomas. **Cancer Res**. 1995;55(22):5195–5199

GREENBERG P. et al. International scoring system for evaluating prognosis in myelodysplastic syndromes. **Blood**. 1997; 89(6):2079-88.

GREENBERG PL, TUECHLER H, SCHANZ J, et al. Cytopenia levels for aiding establishment of the diagnosis of myelodysplastic syndromes. **Blood**. 2016

GREENBERG, P. L et al. Revised international prognostic scoring system for myelodysplastic syndromes. **Blood**. 2012; 120(12): 2454-2465.

GREGER, V., PASSARGE, E., HOPPING, W., MESSMER, E., & HORSTHEMKE, B. (1989). Epigenetic changes may contribute to the formation and spontaneous regression of retinoblastoma. *Human Genetics*, 83(2), 155–158.

HAIG, D., The (Dual) Origin of Epigenetics. Cold Spring Harbor Symposium on Quantitative Biology, Vol. LXIX. **Cold Spring Harbor Laboratory Press**, Cold Spring Harbor, NY. 2004

HASEGAWA, N. et al. Impact of combinatorial dysfunctions of Tet2 and Ezh2 on the epigenome in the pathogenesis of myelodysplastic syndrome. Nature Publishing Group, v. 31, n. 4, p. 861–871, 2016. IRIMURA, S. U. K. et al. H A E M A T O L O G Y Role of microRNA-29b in myelodysplastic syndromes during transformation to overt leukaemia. v. 48, n. April, p. 233–241, 2016.

HE Y-F, LI B-Z, LI Z, LIU P, WANG Y, TANG Q, DING J, JIA Y, CHEN Z, LI L, ET AL. Tet-mediated formation of 5-carboxylcytosine and its excision by TDG in mammalian DNA. **Science** 2011. 333: 1303–1307.

HEREDIA FF, et al. Proteins related to the spindle and checkpoint mitotic emphasize the different pathogenesis of hypoplastic MDS. **Leukemia Research**. 2014; 38:218-224.

HERMAN JG, LATIF F, WENG Y, et al. Silencing of the VHL tumor-suppressor gene by DNA methylation in renal carcinoma. Proc Natl Acad Sci U S A. 1994;91(21):9700–9704.

HEUSER M, YUN H, THOL F. Epigenetics in myelodysplastic syndromes. **Semin Cancer Biol**. 2018;51:170–179.

HUANG TC, KO BS, TANG JL, et al. Comparison of hypoplastic myelodysplastic syndrome (MDS) with normo-/hypercellular MDS by International Prognostic Scoring System, cytogenetic and genetic studies. **Leukemia**. 2008;22(3):544–550.

ISSA JP. CpG island methylator phenotype in cancer. **Nat Rev Cancer**. 2004.4:

ISSA JP. CpG-island methylation in aging and cancer. **Curr Top Microbiol Immunol** 2000;249:101-18.

ISSA, J-P. “Epigenetic Changes in the Myelodysplastic Syndrome” **Hematology/Oncology Clinics of North America**. 2010; 24(2):317-330.

ITO S, D’ALESSIO AC, TARANOVA OV, HONG K, SOWERS LC, ZHANG Y. Role of Tet proteins in 5mC to 5hmC conversion, ES-cell self-renewal and inner cell mass specification. **Nature**. Aug;466(7310):1129–33. 2010

IWAI, M., KIYOI, H., OZEKI, K., KINOSHITA, T., EMI, N., OHNO, R., & NAOE, T.. Expression and methylation status of the FHIT gene in acute myeloid leukemia and myelodysplastic syndrome. **Leukemia**, 19(8), 1367–1375. 2005

IYAMA, T.; WILSON, D. M. DNA repair mechanisms in dividing and non-dividing cells. **DNA Repair**, v. 12, p. 620–636, 2013.

JIANG Y, DUNBAR A, GONDEK LP, et al. Aberrant DNA methylation is a dominant mechanism in MDS progression to AML. **Blood**. 2009;113(6):1315–1325.

KHAN H, VALE C, BHAGAT T, VERMA A. Role of DNA methylation in the pathogenesis and treatment of myelodysplastic syndromes. **Semin Hematol**. 2013; 50(1):16–37.

KIEFER, JC. Epigenetics in development. *Dev. Dyn.* 2007; 236: 1144-1156.

KIM, J.-H., KIM, M., HE, X.-B., WULANSARI, N., YOON, B.-H., BAE, D.-H., ... KIM, S.-Y. . Vitamin C Promotes Astrocyte Differentiation Through DNA Hydroxymethylation. **STEM CELLS**. 2018

KIM, M. DNA methylation: a cause and consequence of type 2 diabetes. **Genomics & Informatics**, 17(4), e38. 2019

KURIHARA Y, KAWAMURA Y, UCHIJIMA Y, et al. Maintenance of genomic methylation patterns during preimplantation development requires the somatic form of DNA methyltransferase 1. **Dev Biol.**;313(1):335–346. 2008

LANGE SS, TAKATA K, WOOD RD. DNA polymerases and cancer. **Nature Reviews Cancer**. 2011; 11:96–110.

LANGEMEIJER, S., KUIPER, R., BERENDS, M. et al. Acquired mutations in TET2 are common in myelodysplastic syndromes. **Nat Genet** **41**, 838–842 (2009).

LI W, LIU M. Distribution of 5-hydroxymethylcytosine in different human tissues. **J Nucleic Acids**. 2011;2011:870726.

LINCOLN, R. J., G. A. BOXSHALL, and P. F. CLARK, Dictionary of Ecology, Evolution and Systematics, **Cambridge University Press**, Cambridge. 1982.

LIU X, ZHANG G, YI Y, et al. Decreased 5-hydroxymethylcytosine levels are associated with TET2 mutation and unfavorable overall survival in myelodysplastic syndromes. **Leuk Lymphoma**. 2013;54(11):2466–2473.

LIVNEH Z1.; ZIV O.; SHACHAR S. Multiple two-polymerase mechanisms in mammalian translesion DNA synthesis. **Cell Cycle**. 2010 Feb 15;9(4):729-35

M. MOHAMEDALI, ALEXANDER E. SMITH, JOOP GAKEN, NICHOLAS C. LEA, SYED A. MIAN, NIGEL B. WESTWOOD, CORINNA STRUPP, NORBERT GATTERMANN, ULRICH GERMING, AND GHULAM J. MUFTI. Novel TET2 Mutations Associated With UPD4q24 in Myelodysplastic Syndrome. **Journal of Clinical Oncology** 2009.

MACEDO, L C; MATTOS, J R; SILVA, D M. síndrome mielodisplásica: da suspeita ao diagnóstico definitivo. **SaBios-Revista de Saúde e Biologia**, [S.l.], v. 11, n. 1, p. 80-89, jun. 2016. ISSN 1980-0002.

MAEGAWA S, GOUGH SM, WATANABE-OKOCHI N, ET AL. Age-related epigenetic drift in the pathogenesis of MDS and AML. **Genome Res.** 2014;24(4):580–591.

MAGA, G., & HUBSCHER, U. (2003). Proliferating cell nuclear antigen (PCNA): a dancer with many partners. **Journal of Cell Science**, 116(Pt 15), 3051-60.

MATTOS JR, SILVA DM, MACEDO LC. Síndrome Mielodisplásica: Da Suspeita ao Diagnóstico definitivo. **Rev. Saúde e Biol. SaBios**, v.11, n1,p.80- 89, jan/abr.2016

MERLO A, HERMAN JG, MAO L, LEE DJ, GABRIELSON E, BURGER PC, BAYLIN SB, SIDRANSKY D (1995) 5' CpG island methylation is associated with transcriptional silencing of the tumour suppressor CDKN2A/CDKN2/MTS1 in human cancers. **Nat Med** 1: 686–692

MONIER, K., MOURADIAN, S., & SULLIVAN, K. F. (). DNA methylation promotes Aurora-B-driven phosphorylation of histone H3 in chromosomal subdomains. **Journal of Cell Science**. 2007. 120(1), 101–114.

MORGAN HD, DEAN W, COKER HA, REIK W, PETERSEN-MAHRT SK. Activation-induced cytidine deaminase deaminates 5-methylcytosine in DNA and is expressed in pluripotent tissues: implications for epigenetic reprogramming. **J Biol Chem**. 2004

MUFTI GJ. Pathobiology, classification, and diagnosis of myelodysplastic syndrome. **Best Pract Res Clin Haematol**. 2004;17(4):543-557.

NGUYEN PL. The myelodysplastic syndromes. **Hematol Oncol Clin**
NIKOLOSKI, G., & REIJDEN, B. A. “Mutations in epigenetic regulators in myelodysplastic syndromes” **Progress in Hematology**. 2012 95:8-16.

NIKOLOSKI, G., LANGEMEIJER, S. M. C., Kuiper, R. P., Knops, R., Massop, M., Tönnissen, E. R. L. T. M., ... Jansen, J. H. Somatic mutations of the histone methyltransferase gene EZH2 in myelodysplastic syndromes. 2010. **Nature Genetics**, 42(8), 665–667.

NISHIGAKI M AOYAGI K DANJOH I FUKAYA M YANAGIHARA
KSAKAMOTO H YOSHIDA T SASAKI H. Discovery of aberrant expression of R-RAS by cancer-linked DNA hypomethylation in gastric cancer using microarrays. **Cancer Research**. 2005. 65:2115–2124.

OKANO M, BELL DW, HABER DA, LI E. DNA methyltransferases Dnmt3a and Dnmt3b are essential for de novo methylation and mammalian development. **Cell** 1999;99: 247–57.

PAPAEMMANUIL E, CAZZOLA M, BOULTWOOD J, et al. Somatic SF3B1 mutation in myelodysplasia with ring sideroblasts. **N Engl J Med**. 2011;365(15):1384–1395

PAUL B, BARNES S, DEMARK-WAHNEFRIED W, et al. Influences of diet and the gut microbiome on epigenetic modulation in cancer and other diseases. **Clin Epigenetics**. 2015; 7:112.

PAZ MF, AVILA S, FRAGA MF, POLLAN M, CAPELLA G, PEINADO MA, SANCHEZ-CESPEDES M, HERMAN JG, ESTELLER M. Germ-line variants in methyl-group metabolism genes and susceptibility to DNA methylation in normal tissues and human primary tumours. **Cancer Res**. 2002. 62: 4519–4524

PERCY MJ, MYRIE KA, NEELEY CK, AZIM JN, ETHIER SP, PETTY EM. Expression and mutational analyses of the human MAD2L1 gene in breast cancer cells. **Genes Chromosomes Cancer** 2000;

PFEILSTÖCKER M, TUECHLER H, SANZ G, et al. Time-dependent changes in mortality and transformation risk in MDS. **Blood**. 2016;128(7):902-910.

PINHEIRO RF, CHAUFFAILLE MLLF. 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(11):1110-1112.

POLONI A, GOTERI G, ZIZZI A, et al. Prognostic role of immunohistochemical analysis of 5 mc in myelodysplastic syndromes. **Eur J Haematol**. 2013; 91, 219–27.

RIBEIRO HL JUNIOR; DE OLIVEIRA, R.T.; MAIA, A.R.; PIRES FERREIRA FILHO, L.I.; DE SOUSA, J.C., HEREDIA, F.F.; MAGALHÃES, S.M.; PINHEIRO, R.F. Polymorphisms of DNA repair genes are related to the pathogenesis of myelodysplastic syndrome. **Hematol Oncol.**, v. 33, n. 4, p. 220-228, 2015.

RODRIGUEZ J, FRIGOLA J, VENDRELL E, ET AL. Chromosomal instability correlates with genome-wide DNA demethylation in human primary colorectal cancers. **Cancer Res**. 2006;66(17):8462–9468.

ROLLISON DE, HOWLADER N, SMITH MT, et al. Epidemiology of myelodysplastic syndromes and chronic myeloproliferative disorders in the United States, 2001-2004, using data from the NAACCR and SEER programs. **Blood**. 2008;112(1):45–52.

ROMANOV GA, VANIUSHIN BF. Intragenomic specificity of DNA methylation in animals. Qualitative differences in tissues and changes in methylation of repeating sequences during aging, carcinogenesis and hormonal induction. **Mol Biol**.1980;14:357-68

- RÖMERMANN, D., HASEMEIER, B., METZIG, K. et al. Global increase in DNA methylation in patients with myelodysplastic syndrome. **Leukemia** 2008. 22, 1954–1956.
- SAXONOV S, BERG P, BRUTLAG DL. A genome-wide analysis of CpG dinucleotides in the human genome distinguishes two distinct classes of promoters. **Proc Natl Acad Sci U S A**. 2006
- SCHUTSKY EK, DENIZIO JE, HU P, et al. Nondestructive, base-resolution sequencing of 5-hydroxymethylcytosine using a DNA deaminase. **Nat Biotechnol**. 2018;10.1038/nbt.4204.
- SEN P, SHAH PP, NATIVIO R, BERGER SL. Epigenetic Mechanisms of Longevity and Aging. **Cell**. 2016; 166(4):822–839.
- SHEN L, KANTARJIAN H, GUO Y, et al. DNA methylation predicts survival and response to therapy in patients with myelodysplastic syndromes **J Clin Oncol**. 2010
- SPERLING AS, GIBSON CJ, EBERT BL. The genetics of myelodysplastic syndrome: from clonal haematopoiesis to secondary leukaemia. **Nat Rev Cancer**. 2017;17(1):5-19.
- SPRUIJT CG, GNERLICH F, SMITS AH, et al. Dynamic readers for 5-(hydroxy)methylcytosine and its oxidized derivatives. **Cell**. 2013;152(5):1146–1159.
- SWERDLOW SH, et al. World Health Organization Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. **IARC Press**: Lyon, 2014.
- TAHILIANI M, et al. Conversion of 5-methylcytosine to 5-hydroxymethylcytosine in mammalian DNA by MLL partner TET1. **Science**.;324(5929):930–5. 2009
- TAKAI D, JONES PA. Comprehensive analysis of CpG islands in human chromosomes 21 and 22. **Proc Natl Acad Sci USA** 2002;99:3740–5.
- TALWALKAR SS, YIN CC, NAEEM RC, et al. Myelodysplastic syndromes arising in patients with germline TP53 mutation and Li-Fraumeni syndrome. **Arch Pathol Lab Med**. 2010;134:1010–5.
- TANG WY, HO SM. Epigenetic reprogramming and imprinting in origins of disease. **Rev Endocr Metab Disord**.;8(2):173-182. 2007
- TEFFERI A, VARDIMAN JW. Myelodysplastic syndromes. **N Engl J Med**. 2009;361(19):1872–1885.
- THOMSON, J. P., & Meehan, R. R. The application of genome-wide 5 hydroxymethylcytosine studies in cancer research. **Epigenomics**, 9(1), 77–91. 2017.

- THOMSON, J. P., & MEEHAN, R. R. The application of genome-wide 5-hydroxymethylcytosine studies in cancer research. **Epigenomics**, 2017. 9(1), 77–91.
- TO-HO KW, CHEUNG HW, LING MT, WONG YC, WANG X. MAD2ΔC induces aneuploidy and promotes anchorage-independent growth in human prostate epithelial cells. **Oncogene** 2008;
- TROYER, D. A., LUCIA, M. S., DE BRUINE, A. P., MENDEZ-MEZA, R., BALDEWIJNS, M. M., DUNSCOMB, N., ... BIGLEY, J. W. Prostate Cancer Detected by Methylated Gene Markers in Histopathologically Cancer-Negative Tissues from Men with Subsequent Positive Biopsies. 2009. **Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention**, 18(10), 2717–2722.
- TURNER AJ, AGGARWAL P, MILLER HE, et al. The introduction of RNA-DNA differences underlies interindividual variation in the human IL12RB1 mRNA repertoire. **Proc Natl Acad Sci U S A.**;112(50):15414-15419. 2015
- VAN GENT, D. C.; HOEIJMAKERS, J. H.; KANNAR, R. Chromosomal stability and the DNA double-stranded break connection. **Nat. Rev. Genet.**, v. 2, n. 3, p. 196-206, 2001.
- VAN SPEYBROECK, L., From epigenesis to epigenetics: the case of C. H. Waddington. **Ann. NY Acad. Sci.** 981: 61–81. 2002
- VARDIMAN J W, JÜERGEN T, ARBER D A., et al; The 2008 revision of the World Health Organization (WHO) classification of myeloid neoplasms and acute leukemia: rationale and important changes. **Blood**. 2009; 114 (5): 937–951.
- VASSALLO J, MAGALHÃES SMM. Síndromes mielodisplásicas e mielodisplásicas/mieloproliferativas. **Rev Bras Hematol Hemoter**, 2009; 31:267-72.
- WADDINGTON, C. H., Canalization of development and the inheritance of acquired characters. **Nature** 150: 563–565. 1942b
- WADDINGTON, C. H., The epigenotype. *Endeavour* 1: 18. 1942a
- WADDINGTON, C. H., The Strategy of the Genes. A Discussion of Some Aspects of Theoretical Biology, p. 262. Routledge, **New York**. 1957
- WALTER, M. J., DING, L., SHEN, D., SHAO, J., GRILLOT, M., MCLELLAN, M. GRAUBERT, T. A. Recurrent DNMT3A mutations in patients with myelodysplastic syndromes. **Leukemia**, 25(7), 1153-8. 2011
- WEBER, M., HELLMANN, I., STADLER, M. B., RAMOS, L., PÄÄBO, S., REBHAN, M., & SCHÜBELER, D. Distribution, silencing potential and evolutionary impact of promoter DNA methylation in the human genome. **Nature Genetics**, 39(4), 457-66. 2007.

WEEDEN, Clare E. BBA - Molecular Basis of Disease Mechanisms of DNA damage repair in adult stem cells and implications for cancer formation. **BBA - Molecular Basis of Disease**, v. 1864, n. 1, p. 89–101, 2018.

WILSON VL, SMITH RA, MA S, CUTLER RG. Genomic 5-methyldeoxycytidine decreases with age. **J Biol Chem** 1987; 262:9948-51.

WU H, ZHANG Y. Mechanisms and functions of Tet protein-mediated 5 methylcytosine oxidation. **Genes Dev.** 2011;25(23):2436–52.

XIAO FH, WANG HT, KONG QP. Dynamic DNA Methylation During Aging: A "Prophet" of Age-Related Outcomes. **Front Genet.** 2019; 10:107.

XU W, YANG H, LIU Y, et al. Oncometabolite 2-hydroxyglutarate is a competitive inhibitor of α -ketoglutarate-dependent dioxygenases. **Cancer Cell.** 2011;19(1):17-30.

YAN, H., WANG, Y., QU, X., LI, J., HALE, J., HUANG, Y., AN, C., PAPOIN, J., GUO, X., CHEN, L., KANG, Q., LI, W., SCHULZ, V. P., GALLAGHER, P. G., HILLYER, C. D., MOHANDAS, N., & AN, X. (). Distinct roles for TET family proteins in regulating human erythropoiesis. **Blood**, 2017129(14), 2002–2012.

YIN, XIAOTONG, XU, YANHUI. Structure and Function of TET Enzymes. **Advances in experimental medicine and biology.** 2016. 302-275

YOSHIDA, K.; MIKI, Y. Role of BRCA1 and BRCA2 as regulators of DNA repair, transcription, and cell cycle in response to DNA damage. **Cancer Sci.**, v. 95, n. 11, p. 866– 871, 2004.

ANEXO 1

Análise de correlação entre análise de IHC e níveis de expressão de mRNA

Spearman's correlação		<i>M-score 5mC</i>	<i>M-score 5hmC</i>	<i>5mC/5hmC ratio</i>
DNA Polimerase com atividade de translesão				
<i>PCNA</i>	Correlation (r)	-0.635	0.055	-0.442
	r-square (r ²)	0.192	0.009	0.106
	<i>p</i> -value (2-tailed)	0.020	0.851	0.129
	N	13	14	13
<i>REVI</i>	Correlation (r)	-0.578	-0.101	-0.287
	r-square (r ²)	0.264	0.008	0.160
	<i>p</i> -value (2-tailed)	0.049	0.740	0.365
	N	12	14	12
<i>POLQ</i>	Correlation (r)	-0.719	-0.234	-0.369
	r-square (r ²)	0.191	6.493	0.157
	<i>p</i> -value (2-tailed)	0.001	0,400	0.193
	N	14	15	14
<i>POLK</i>	Correlation (r)	-0.633	-0.147	-0,277
	r-square (r ²)	0.176	0.045	0.185
	<i>p</i> -value (2-tailed)	0.036	0.648	0.407
	N	11	12	11
<i>POLH</i>	Correlation (r)	-0.816	-0.232	-0.356
	r-square (r ²)	0.444	0.069	0.122
	<i>p</i> -value (2-tailed)	0.000	0.403	0.210
	N	14	15	14
<i>REV3L</i>	Correlation (r)	-0.563	-0.005	-0.399
	r-square (r ²)	0.201	0.060	0.204
	<i>p</i> -value (2-tailed)	0.056	0.985	0.198
	N	12	13	12
<i>POLN</i>	Correlation (r)	-0.109	0.259	-0.407
	r-square (r ²)	0.043	0.134	0.197
	<i>p</i> -value (2-tailed)	0.763	0.440	0.242
	N	10	11	10
<i>POLI</i>	Correlation (r)	-0.595	-0.100	-0.510
	r-square (r ²)	0.150	0.061	0.218
	<i>p</i> -value (2-tailed)	0,069	0.769	0.131
	N	10	11	10
<i>POLL</i>	Correlation (r)	-0.332	-0.195	0.115
	r-square (r ²)	0.073	0.055	0.022
	<i>p</i> -value (2-tailed)	0.290	0.521	0.720
	N	12	13	12
Reparo de DNA				
<i>ATM</i>	Correlation (r)	0.000	-0.020	-0.012
	r-square (r ²)	0.003	0.007	0.091
	<i>p</i> -value (2-tailed)	1.000	0.934	0.961
	N	18	19	18
<i>RAD51</i>	Correlation (r)	0.082	-0.100	0.223
	r-square (r ²)	0.017	1.547	0.209

	<i>p</i> -value (2-tailed)	0.744	0.680	0.372
	N	18	19	18
LIG4	Correlation (r)	-0.239	-0.066	-0.019
	r-square (r ²)	0.003	0.019	0.008
	<i>p</i> -value (2-tailed)	0.338	0.786	0.938
	N	18	19	18
BRCA1	Correlation (r)	0.252	-0.182	0.409
	r-square (r ²)	0.077	0.005	0.170
	<i>p</i> -value (2-tailed)	0.312	0.454	0.091
	N	18	19	18
BRCA2	Correlation (r)	0.209	-0.063	0.322
	r-square (r ²)	0.013	0.077	5.032
	<i>p</i> -value (2-tailed)	0.403	0.797	0.191
	N	18	19	18
XRCC5	Correlation (r)	0.292	0.050	0.246
	r-square (r ²)	0.098	0.013	0.251
	<i>p</i> -value (2-tailed)	0.239	0.835	0.324
	N	18	19	18
XRCC6	Correlation (r)	0.191	-0.051	0.356
	r-square (r ²)	0.023	0.027	0.002
	<i>p</i> -value (2-tailed)	0.447	0.833	0.145
	N	18	19	18
CSA	Correlation (r)	0.443	0.072	0.263
	r-square (r ²)	0.094	0.034	0.014
	<i>p</i> -value (2-tailed)	0.065	0.766	0.290
	N	18	19	18
CSB	Correlation (r)	-0.102	-0.307	0.257
	r-square (r ²)	0.024	1.795	0.003
	<i>p</i> -value (2-tailed)	0.686	0.200	0.302
	N	18	19	18
XPG	Correlation (r)	0.257	0.031	0.188
	r-square (r ²)	0.091	0.010	0.139
	<i>p</i> -value (2-tailed)	0.302	0.897	0.454
	N	18	19	18
XPA	Correlation (r)	0.136	0.278	-0.172
	r-square (r ²)	0.068	0.014	0.007
	<i>p</i> -value (2-tailed)	0.589	0.248	0.492
	N	18	19	18
XPC	Correlation (r)	0.308	0.236	0.009
	r-square (r ²)	0.140	0.061	0.020
	<i>p</i> -value (2-tailed)	0.212	0.330	0.970
	N	18	19	18
Ciclo celular e Fuso mitótico				
	Correlation (r)	0.255	0.042	0.156
MAD2	r-square (r ²)	3.370	0.040	0.006
	<i>p</i> -value (2-tailed)	0.227	0.840	0.465
	N	24	25	24
CDC20	Correlation (r)	0.142	-0.092	0.183

	r-square (r^2)	0.001	0.009	6.059
	p -value (2-tailed)	0.506	0.661	0.391
	N	24	25	24
	Correlation (r)	0.033	0.031	-0.053
AURKA	r-square (r^2)	0.003	5.583	0.033
	p -value (2-tailed)	0.874	0.880	0.802
	N	24	25	24
	Correlation (r)	0.218	-0.157	0.291
AURKB	r-square (r^2)	0.010	0.035	8.027
	p -value (2-tailed)	0.304	0,453	0.167
	N	24	25	24
	Correlation (r)	0.057	-0.086	0.090
TPX2	r-square (r^2)	0.008	0.046	0.006
	p -value (2-tailed)	0.788	0.680	0.673
	N	24	25	24

Apêndice: Termo de consentimento livre e esclarecido.



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
FACULDADE DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE MEDICINA CLÍNICA
TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**

PROJETO: ANÁLISE DO PERFIL GLOBAL DE METILAÇÃO DO DNA DE PACIENTES COM SÍNDROME MIELODISPLÁSICA

Você está sendo convidado a participar de um projeto de pesquisa. Sua participação é importante, porém, você não deve participar contra a sua vontade. Leia atentamente as informações abaixo e faça qualquer pergunta que desejar.

O abaixo assinado, _____

_____, ____ anos, RG nº _____, declara que é de livre e espontânea vontade que está participando como voluntário do projeto de pesquisa supracitado, de responsabilidade do pesquisador Prof. Dr. Ronald Feitosa Pinheiro / Howard Lopes Ribeiro Junior. O abaixo assinado está ciente de que:

NATUREZA E PROPÓSITO DO ESTUDO

O objetivo da pesquisa é avaliar os níveis de expressão dos genes relacionados aos mecanismos de regulação do ciclo celular, ao ponto de checagem mitótico e ao fuso mitótico em pacientes portadores de síndrome mielodisplásica (SMD). Para compreender melhor os pontos clínicos dos pacientes visualizados nesta pesquisa, precisamos comparar os achados clínicos destes pacientes com indivíduos sadios (voluntários). É devido a este contexto que necessitamos recrutar indivíduos saudáveis (voluntários) para participar da presente pesquisa.

PROCEDIMENTOS A SEREM REALIZADOS E RESPONSABILIDADES

A amostra biológica utilizada na presente pesquisa corresponde a medula óssea do indivíduo. A medula óssea corresponde a um tecido líquido-gelatinoso que ocupa o interior dos ossos, sendo conhecida popularmente por 'tutano'. Na medula óssea são produzidos os componentes do sangue: as hemácias (glóbulos vermelhos), os leucócitos (glóbulos brancos) e as plaquetas.

A coleta da medula óssea será realizada por médico hematologista experiente com agulha de mielograma mediante punção esternal. O osso do esterno é um osso chato, plano e ímpar localizado no centro do tórax. O osso do esterno é um importante osso hematopoético, ou seja, de produção das células sanguíneas. É neste osso que é realizada a punção da medula óssea. Serão coletadas somente 2mL de amostra de medula óssea com o uso de uma agulha específica para

aspiração da medula óssea. Todo o procedimento de coleta da medula óssea é realizado mediante administração de anestésico local com duração máxima de 15 minutos.

Durante o procedimento de coleta esternal da medula óssea, pode, raramente, determinar uma equimose (mancha arroxeadada) ao redor do local de onde foi retirado a medula óssea, desaparecendo em poucos dias, e poderá ocorrer dor discreta e de fácil alívio, podendo ser, ocasionalmente, dor de maior intensidade. Excepcionalmente, poderá ocorrer sangramento local. Raramente, pode ocorrer infecção local. Para pacientes com maior sensibilidade dolorosa existe a possibilidade de realizar o procedimento sob anestesia geral. A recoleta deste material é necessária, em poucos casos, pela amostra ser insuficiente ou inadequada para análise.

Após o procedimento, serão coletados dados pessoais de sexo e idade. É de sua responsabilidade: comparecer nas datas e horários informados e submeter-se aos procedimentos de rotina do serviço.

PARTICIPAÇÃO VOLUNTÁRIA

Sua participação é voluntária e você tem a liberdade de desistir ou interromper a participação neste estudo no momento em que desejar. Neste caso, você deve informar imediatamente sua decisão ao pesquisador responsável ou a qualquer um membro de sua equipe, sem necessidade de qualquer explicação e sem que isto venha interferir no seu atendimento nesta instituição.

Independentemente de seu desejo e consentimento, sua participação no estudo poderá ser interrompida, em função da ocorrência de qualquer doença que, a critério médico, prejudique a continuação de sua participação no estudo, do não cumprimento das normas estabelecidas, de qualquer outro motivo que, a critério da pesquisadora, seja do interesse de seu próprio bem-estar ou dos demais participantes e, por fim, da suspensão do estudo como um todo.

O Laboratório de Citogenômica do Câncer o manterá informado, em tempo oportuno, sempre que houver alguma informação adicional que possa influenciar seu desejo de continuar participando no estudo e prestará qualquer tipo de esclarecimento em relação ao progresso da pesquisa, conforme sua solicitação.

DIVULGAÇÃO DE INFORMAÇÕES QUANTO À PARTICIPAÇÃO NO ESTUDO

Os registros que possam identificar sua identidade serão mantidos em sigilo, a não ser que haja obrigação legal de divulgação. Você não será identificado por ocasião da publicação dos resultados obtidos.

Contudo, o(s) monitor(es) do Estudo, auditor(es), membros do Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos, ou autoridades do(s) órgão(s) regulamentar(es) envolvido(s) terão direito de ter acesso aos registros originais de dados clínicos de sua pessoa, coletados durante a pesquisa, na extensão em que for permitido pela Lei e regulamentações aplicáveis, como o propósito de verificar os procedimentos e dados do estudo, sem, no entanto, violar a condição de que tais informações são confidenciais.

CONTATOS E PERGUNTAS

Poderá contatar a Secretaria do Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Ceará - UFC ou no local (Rua Coronel Nunes de Melo, 1000) ou pelo telefone 3366-8344, para apresentar

recursos ou reclamações em relação ao estudo. Somente assine este termo se você tiver a certeza de que recebeu todos os esclarecimentos e informações para decidir conscientemente sobre a sua participação neste estudo.

ASSINATURAS

Autorizo o acesso às minhas informações de saúde aos membros da equipe de pesquisadores, nas condições estabelecidas descritas nos itens acima. Não renunciei qualquer direito legal que eu venha a ter ao participar deste Estudo.

Eu, por fim, declaro que li cuidadosamente todo este documento denominado **Termo de Consentimento Livre e Esclarecido** e que, após a assinatura, tive oportunidade de fazer perguntas sobre o conteúdo do mesmo e também sobre o referido estudo, recebendo explicações que responderam por completo minhas dúvidas e reafirmando estar livre e espontaneamente decidido a participar do estudo, ficando munido de uma via do documento assinado pelo pesquisador responsável.

____/____/____

Data

Assinatura do participante da pesquisa

____/____/____

Data

Assinatura do Pesquisador Responsável

____/____/____

Data

Assinatura do Responsável pela aplicação do TCLE