

UNIVERSIDADE CATÓLICA DE GOIÁS
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
MESTRADO EM GENÉTICA

IMPORTÂNCIA DO DIAGNÓSTICO CITOGENÉTICO CONVENCIONAL
COMO FATOR PROGNÓSTICO NA SINDROME MIELODISPLÁSICA

CRISTIANO LUIZ RIBEIRO

Goiânia-Goiás
Março de 2009

UNIVERSIDADE CATÓLICA DE GOIÁS
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
MESTRADO EM GENÉTICA

IMPORTÂNCIA DO DIAGNÓSTICO CITOGENÉTICO CONVENCIONAL
COMO FATOR PROGNÓSTICO NA SINDROME MIELODISPLÁSICA

CRISTIANO LUIZ RIBEIRO

Orientador: Dr. Aparecido D. da Cruz, Ph.D

Dissertação apresentada ao Programa de Mestrado em Genética da Universidade Católica de Goiás, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Genética.

Goiânia-Goiás

Março de 2009

R484i Ribeiro, Cristiano Luiz.

Importância do diagnóstico citogenético convencional como fator prognóstico na síndrome mielodisplásica / Cristiano Luiz Ribeiro. – 2009. 51. f.

Dissertação (mestrado) – Universidade Católica de Goiás, Mestrado em Genética, 2009.

“Orientador: Dr. Aparecido D. da Cruz”.

1. Síndrome mielodisplásica (SMD) – diagnóstico citogenético – importância. 2. Alterações citogenéticas. 3. Genética. I. Título.

CDU: 616.155.392-053.2:616-071(043.3)

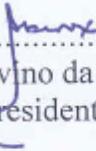


UNIVERSIDADE
Católica
DE GOIÁS

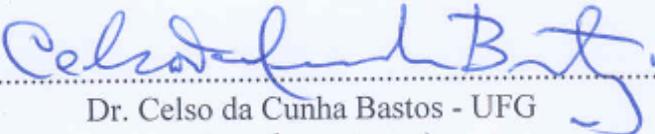
PRÓ-REITORIA DE
PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
Av. Universitária, 1069 • Setor Universitário
Caixa Postal 86 • CEP 74605-010
Goiânia • Goiás • Brasil
Fone: (62) 3946.1071 • Fax: (62) 3946.1073
www.ucg.br • prope@ucg.br

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM GENÉTICA
DEFENDIDA EM 16 DE MARÇO DE 2009 E APROVADA
PELA BANCA EXAMINADORA COM A NOTA

10,0 (Dez inteiros)


.....
Dr. Aparecido Divino da Cruz, PhD / MGene - UCG
(presidente orientador)


.....
Dr.^a. Daniela de Melo e Silva – MGene – UCG
(membro interno)


.....
Dr. Celso da Cunha Bastos - UFG
(membro externo)

Dedico os resultados deste estudo aos meus pais, meu irmão, à minha namorada, meus professores e a todos os meus amigos pelo apoio constante para que eu pudesse concluir esta longa, difícil, mas importante etapa da minha vida. Com muito esforço, felicidade e carinho pelo que faço, alcanço mais esta importante vitória.

AGRADECIMENTOS

Quero agradecer, em primeiro lugar, a Deus por ter me concedido e à toda minha família perseverança e saúde para que pudéssemos aproveitar mais esta oportunidade de estudo e, conseqüentemente, ter cursado e concluído com muita felicidade e sucesso o curso de mestrado em genética pela Universidade Católica de Goiás.

Aos meus pais, Antônio Luiz Ribeiro (IN MEMORIAM) e Maria José Ribeiro, e ao meu irmão Luciano Antônio Ribeiro pelo incentivo e ajuda prestados durante toda a minha vida e, especialmente, para o sucesso da conclusão de mais esta etapa de meus estudos.

À minha namorada, Juliana Fernandes dos Santos, pelo carinho, amor, amizade, colaboração e tudo que ela faz na minha vida, sempre do meu lado para me ajudar e proporcionar momentos maravilhosos. Existem pessoas que chegam e fazem parte de nossa vida que jamais serão esquecidas, e você Juliana, é uma delas.

Aos meus professores e principalmente, meus grandes amigos, Aparecido Divino da Cruz (Peixoto) e Cláudio Carlos da Silva, pela orientação, paciência, amizade, carinho, oportunidades

profissionais oferecidas e crescimento pessoal que, com certeza vão me ajudar por toda a minha vida.

Aos meus amigos Jonas Garcia de Almeida, Gustavo Silva Pinto e amiga Lysa Bernardes Minasi pelo companheirismo, que desde o início me ajudaram e acompanharam nesta jornada, juntos superamos dificuldades e conquistamos alegrias.

Ao meu amigo e amiga representando o NPR (Núcleo de Pesquisa Replicon) - da Universidade Católica de Goiás, Eduardo Rocha Pedrosa e Damiana Miriam da Cruz e Cunha e aos meus amigos da LaGene (Laboratório de Citogenética Humana e Genética Molecular - Suleide - Superintendência Leide das Neves Ferreira / SES - Secretaria de Estado da Saúde de Goiás), pelo companheirismo e profissionalismo compartilhados durante todo este tempo de nossa convivência.

A todas as pessoas envolvidas que cederam os materiais biológicos para que este estudo pudesse ter sido realizado e também a todos os profissionais médicos e não médicos envolvidos nesta pesquisa. Obrigado pela partilha.

A todos, o meu obrigado!

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	X
LISTA DE TABELAS.....	XI
LISTA DE ABREVIATURAS.....	XIII
RESUMO.....	XV
ABSTRACT.....	XVII
1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1 SÍNDROME MIELODISPLÁSICA.....	1
1.1.1 Aspectos Gerais.....	1
1.1.2 Epidemiologia.....	13
2. Justificativa.....	15
3. Objetivos.....	16
3.1. Geral.....	16
3.2. Específicos.....	16
4. Materiais e Métodos.....	17
4.1. Delineamento do estudo.....	17
4.2. Grupo amostral.....	17
4.2.1 Critérios de Inclusão.....	18
4.2.2 Critérios de exclusão.....	18
4.3 - Aprovações pelos comitês de ética em pesquisa.....	18
4.4. Coleta das Amostras.....	18
4.5. Citogenética Convencional.....	19
4.5.1 Bloqueio da Cultura.....	21
4.5.2 Preparação das Lâminas.....	21

4.5.3 Bandeamento.....	22
4.5.4 Análise Citogenética.....	23
4.6 Preparo das Soluções.....	23
4.6.1 Preparo de solução hipotônica.....	23
4.6.2 Preparo de solução fixadora álcool-ácida de <i>Carnoy</i>	23
4.6.3 Preparo da solução de Giemsa a 4%.....	23
5. RESULTADOS.....	24
6. DISCUSSÃO.....	30
7. CONCLUSÕES.....	38
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	40
8. ANEXOS.....	46
8.1 – Anexo I. Termo de consentimento livre e esclarecido.....	46
8.2 – Anexo II. Termo de consentimento livre e esclarecido para menores.....	49

LISTA DE FIGURAS

Pg.

Figura 01. Distribuição dos pacientes com SMD quanto ao tipo de amostra coletada..... 24

LISTA DE TABELAS	Pg.
Tabela I. Classificação FAB que compreende os cinco grupos da SMD.....	5
Tabela II. Classificação proposta pela OMS apresentando os subtipos da SMD.....	6
Tabela III. Anormalidades citogenéticas mais frequentes relacionadas à SMD...	7
Tabela IV. Dados descritivos dos pacientes estudados com diagnóstico de SMD.....	24
Tabela V. Alterações genéticas identificados nos pacientes estudados com SMD.....	25
Tabela VI. Resultados do hemograma e mielograma dos pacientes com SMD.....	26
Tabela VII. Classificação <i>IPSS</i>	27
Tabela VIII. Grupos de risco de acordo com o <i>IPSS</i>	27
Tabela IX. Alterações citogenéticas e suas respectivas percentagens encontradas por paciente com diagnóstico para SMD.....	28
Tabela X. Classificação <i>IPSS</i> dos pacientes estudados de acordo com o grupo de risco dos quinze pacientes com diagnóstico para SMD.....	29

Tabela XI. Tratamento e evolução dos pacientes estudados..... 29

LISTA DE ABREVIATURAS

SMD - Síndrome Mielodisplásica

LMA - Leucemia Mielóide Aguda

DNA - Ácido Desoxirribonucléico

HIV - Vírus da Imunodeficiência Humana

FAB - Grupo Cooperativo *Franco-Americano-Britânico*

AR - Anemia Refratária

ARSA - Anemia Refratária com Sideroblastos em Anel

AREB - Anemia Refratária com Excesso de Blastos

AREB-t - Anemia Refratária com Excesso de Blastos em Transformação

LMMC - Leucemia Mielomonocítica Crônica

OMS - Organização Mundial de Saúde

del – Deleção

IPSS - Internacional Prognostic Scoring System

FISH - Hibridização Fluorescente *in situ*

ISCN - International System for Chromosome Nomenclature

LMC - Leucemia Mielóide Crônica

GST - Genes Supressores Tumorais

TNF α - Fator de Necrose tumoral

CG - Citosina e Guanina

LLA - Leucemia Linfocítica Aguda

AA - Anemia Aplástica

LaGene - Laboratório de Citogenética Humana e Genética Molecular

SES/GO– Secretaria de Estado da Saúde de Goiás

HC/UFG – Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Goiás

UCG – Universidade Católica de Goiás

NPR - Núcleo de Pesquisas Replicon

HAI - Hospitais Araújo Jorge

ACCG – Associação de Combate ao Câncer de Goiás

SCMG - Santa Casa de Misericórdia de Goiânia

TCLE – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

SFB – Soro Fetal Bovino

°C – Graus Celsius

h – Horas

µL – Microlitros

RPM – Rotações Por Minutos

mL – Mililitros

PBS – Tampão Salino Fosfato

q.s.p – Quantidade Suficiente Para

DAPI – 4,6 – Diamidino – 2 – Fenilindole

RESUMO

Tratou-se de um estudo sobre uma doença de baixa incidência na população que é a síndrome mielodisplásica (SMD). Esta doença compreende um grupo de desordens hematopoiéticas heterogêneas de natureza clonal que tem em comum, graus variados de insuficiência medular e níveis distintos de citopenias no sangue periférico e displasias na diferenciação celular podendo apresentar várias formas de alterações citogenéticas, evoluindo algumas vezes para leucemia. Para SMD, pode-se através das alterações identificadas com auxílio do cariótipo, determinar o prognóstico e classificá-las em grupos de risco, cujo, cada paciente será submetido a um tratamento mais individualizado. O objetivo deste estudo foi avaliar as alterações citogenéticas nas síndromes mielodisplásicas, utilizando a citogenética convencional, correlacionando os achados citogenéticos encontrados com os dados clínicos dos pacientes, na tentativa de incrementar informações de valor prognóstico para os casos de SMD. O presente estudo foi conduzido no NPR – Núcleo de Pesquisa Replicon da Universidade Católica de Goiás e no LaGene – Laboratório de Citogenética Humana e Genética Molecular / SuLeide – Superintendência Leide das Neves Ferreira, SES-GO em parceria com o Hospital das Clínicas, da Universidade Federal de Goiás e com Hospital Araújo Jorge. Foram avaliadas amostras de sangue periférico e medula óssea com auxílio da citogenética convencional de 25 pacientes com indicação clínica de SMD, sendo que somente os 15 casos confirmados com SMD foram incluídos neste estudo. Os resultados dos testes citogenéticos demonstraram uma grande diversidade de alterações cromossômicas, entre elas trissomias nos cromossomos 21 e 22, monossomias dos cromossomos 17 e Y, translocações entre os cromossomos 3q;10q e 8q;16q e uma duplicação no cromossomo 1. As deleções apareceram com mais frequência, entre elas citamos deleções nos cromossomos 7p, 5q, 10q, 11q e 12p. Foi observado também um isocromossomo de 17, um cromossomo em anel e um cromossomo marcador de origem indeterminada além dos cariótipos normais. Esta diversidade de achados está relacionada com uma instabilidade gênômica, sendo que as monossomias e as deleções podem estar relacionadas com inativação de genes supressores tumorais (GST) e as translocações podem ativar os oncogenes, logo estas alterações estão relacionadas com a hematopoiese ineficaz em SMD. Também apresenta relação com o prognóstico, o curso clínico e a evolução da doença, oferecendo ainda informações para auxiliar o diagnóstico, a classificação, o acompanhamento, a escolha terapêutica e um

entendimento mais adequado em função da grande diversidade biológica da doença. Esta pesquisa será importante para estimular novos estudos nesta área podendo estabelecer novas parcerias entre centros de pesquisas e de tratamento, principalmente para oferecer uma melhor qualidade de vida para os pacientes com SMD e seus familiares.

Palavras-chave: Síndrome Mielodisplásica; Citogenética Convencional; Prognóstico; Tratamento.

ABSTRACT

This was a study of a low incidenced disease in the population that is myelodysplastic syndrome (MDS). This disease comprises a group of heterogeneous hematopoietic disorders of clonal nature that have in common, varying degrees of bone marrow failure and distinct levels of peripheral blood cytopenias and dysplasia in cell differentiation and may provide various forms of cytogenetic changes, sometimes progressing to leukemia. For MDS, can be identified through the changes with the aid of the karyotype, determine prognosis and to classify them into risk groups, which each patient will be subjected to a more individualized treatment. The objective of this study was to evaluate the cytogenetic and correlated the cytogenetic findings found with the clinical data of patients in an attempt to improve prognostic information in cases of MDS. This study was conducted at NPR – Núcleo de Pesquisas Replicon of Universidade Católica de Goiás e LaGene - de Citogenética Humana e Genética Molecular / SuLeide – Superintendência Leide das Neves Ferreira, SES-GO in partnership with the Hospital of the Universidade Federal de Goiás and Hospital Araújo Jorge. We evaluated samples of peripheral blood and bone marrow with the aid of conventional cytogenetics, of 25 patients with clinical indication of MDS, with only 15 confirmed cases with MDS were included in this study. The results of cytogenetic tests showed a wide range of chromosomal abnormalities, including trisomy of chromosomes 21 and 22, monosomy of chromosomes 17 and Y translocation between chromosomes 3q, 8q and 10q, 16q and a duplication on chromosome 1. The deletions appeared more frequently, including deletions on chromosomes 7p, 5q 10q, 11q and 12p. We also observed an isochromosome 17, a ring chromosome and a marker chromosome of unknown origin in addition to the normal karyotypes. This diversity of findings is related to genomic instability, and the monosomy and deletions may be related to

inactivation of tumor suppressor genes (TSG) and translocations can activate oncogenes, so these changes are related to the ineffective hematopoiesis in MDS. Also associated with prognosis, the clinical course and progression of the disease, and providing information to assist the diagnosis, classification, monitoring, treatment choice and a more adequate understanding to the broad diversity of the disease. This research will be important to stimulate new research in this area and may establish new partnerships between research centers and treatment, primarily to provide a better quality of life for patients with MDS and their families.

Keywords: myelodysplastic syndrome; Conventional Cytogenetics, Prognosis, Treatment.

1. INTRODUÇÃO

1.1 SINDROME MIELODISPLÁSICA

1.1.1 Aspectos Gerais

A síndrome mielodisplásica (SMD) compreende um grupo de alterações hematopoiéticas heterogêneas de natureza clonal, que têm em comum graus variados de insuficiência medular e conseqüentemente diferentes níveis de citopenias no sangue periférico e manifestações clínicas. No entanto, observa-se hiperplasticidade na medula óssea e displasia na diferenciação celular o que pode evoluir para uma leucemia aguda, principalmente a Leucemia Mielóide Aguda (LMA). Apesar de todo o conhecimento acumulado em relação à clínica, ao diagnóstico morfológico e às características biológicas da SMD seu tratamento ainda é precário e desafiador (Apa *et al.*, 2006).

Alterações no genoma de forma acumulativa podem resultar em proliferação de células hematopoiéticas com alterações morfológicas e funcionais, conseqüentemente a hematopoese pode ser alterada e ineficaz, podendo o paciente apresentar anemia e citopenia persistentes e refratárias (Wells, 2003; Hofmann *et al.*, 2002).

Existem etapas diversas para explicar a patogênese da SMD, sendo que a exposição de indivíduos geneticamente predispostos a agentes genotóxicos ocupacionais ou ambientais pode determinar o aparecimento de uma fase da doença, considerada pré-SMD. Na fase denominada SMD precoce observa-se uma quantidade inferior a 10% de blastos na medula óssea e apoptose aumentada. Na fase tardia, os blastos estão aumentados na medula óssea, ocorre instabilidade cromossômica e aumento de fatores epigenéticos como a metilação do Ácido Desoxirribonucléico (DNA) silenciando os genes envolvidos no controle do ciclo celular. Quando a doença se encontra em um estágio avançado ou de progressão ocorre perda ou inativação de genes supressores e aumenta a instabilidade gênômica com potencial evolução para

leucemia aguda. O processo de angiogênese encontra-se aumentado em todos os estágios da doença (Ribeiro *et al.*, 2004, Rosenfeld *et al.*, 2000).

Há carência de alguns critérios mínimos para o diagnóstico, principalmente dos pacientes que se encontram em fases mais precoces da SMD. Dos critérios atuais, as alterações citogenéticas clonais, a presença de displasia em pelo menos duas linhagens celulares, o aumento no percentual de blastos e uma possível evolução para leucemia aguda podem tornar mais difícil e desafiador o diagnóstico da doença (Ramos *et al.*, 1999; Kouides *et al.*, 1996, Farhi, 1992).

Devemos entender que um clone celular, do ponto de vista da citogenética, consiste na presença de uma mesma alteração morfológica ou numérica em pelo menos duas células analisadas. Outra informação citogenética importante relaciona-se com a presença de mosaicismo. Assim deve ser analisado o maior número de metáfases possível, uma vez que quanto maior o número de metáfases analisadas, menor a chance de um mosaicismo passar sem que seja identificado (Barch *et al.*, 1997).

Na SMD a presença de alterações morfológicas associada com a citopenia, somente, não podem ser tomadas como evidencia de uma doença clonal. È fundamentalmente importante realizar um diagnóstico diferencial, seguindo-se alguns critérios internacionalmente aceitos, como a análise do cariótipo (Aul *et al.*, 1995).

È importante levar em consideração que algumas doenças não clonais, que são secundárias e reversíveis podem evoluir para uma insuficiência medular progressiva, para uma leucemia aguda, ou para outras formas fisiopatológicas de doenças de células hematopoiéticas (Greenberg *et al.*, 1998).

Para determinar o diagnóstico e o prognóstico da SMD é importante estudar e observar a idade do paciente, dados do hemograma, a citologia, a citoquímica e histologia da medula óssea, a contagem de reticulócitos, a dosagem de eritropoetina

endógena, a demonstração do caráter clonal pela citogenética convencional ou por estudos moleculares das células neoplásicas, as dependências e carga transfusional e se a doença è de natureza primária ou secundária. É importante ressaltar que a análise em conjunto dos resultados obtidos das variáveis acima mencionadas terá maior significância para o diagnóstico e prognóstico da SMD do que quando analisados de forma independente (Malcovati *et al.*, 2005; Greenberg *et al.*, 1997; Morel *et al.*, 1993; Lorand-Metze I *et al.*, 1991).

Alguns critérios de exclusão considerados básicos devem ser levados em consideração. Assim, a deficiência de ácido fólico, uma exposição recente a substâncias tóxicas e ou agentes citotóxicos, sobretudo no período das últimas três semanas, a deficiência nutricional de vitamina B12 parecem compor o painel de variáveis significativas e auxiliares no diagnóstico de SMD (Norman *et al.*, 1993).

Citopenias e alterações morfológicas nas linhagens celulares também podem ser observadas devido ao etilismo, a restrição nutricional, a má absorção de vitamina B12 secundária a pancreatite crônica e dentre outros mecanismos. A título de exemplo, a presença de sideroblastos em anel também pode ser observada em etilistas crônicos ou em conseqüência da exposição ocupacional ao chumbo ou benzeno, sendo, portanto, considerada uma variável de exclusão. (Norman *et al.*, 1993).

O protocolo de exclusão relata que a infecção por Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV) é uma variável importante. Pois, os pacientes infectados geralmente apresentam medula hiperclular e alterações displásicas. Tais alterações na hematopoese podem ser em decorrência da infecção viral de células progenitoras ou devido à duplicação celular causada por infecções oportunistas ou por citotoxicidades das terapias antivirais prescritas ao paciente (Bain, 1997).

Para o diagnóstico da SMD, quando excluídas as causas não clonais, torna-se mais difícil. Nesta circunstância, é preciso considerar a ocorrência de doenças das células progenitoras hematopoiéticas, que podem apresentar achados similares e que se correlacionam. Um bom exemplo pode ser o diagnóstico diferencial entre anemia aplásica e SMD hipoplásica, que consiste um desafio (Greenberg *et al.*, 1998).

Nos casos em que se observam citopenias inexplicadas e persistentes e que não apresentam alterações morfológicas e citogenéticas, o diagnóstico para SMD deve ser feito após um acompanhamento do paciente por um período de no mínimo seis meses (Magalhães *et al.*, 2004; Greenberg *et al.*, 1998).

Várias diferenças entre SMD primária e secundária podem ser relacionadas. A SMD secundária pode se desenvolver em indivíduos mais jovens, ao contrário da SMD primária que acomete geralmente indivíduos mais idosos. As displasias e as citopenias em SMD secundária são mais agressivas e pode ocorrer um maior processo de fibrose no ambiente medular. Todos estes fatores mais agressivos aumentam o risco relativo de transformação para uma leucemia aguda, então paciente com diagnóstico de SMD secundária possuem em comparação com a SMD primária um prognóstico desfavorável (Pinheiro *et al.*, 2006).

A grande importância dos estudos dos fatores prognósticos com relação ao paciente de forma individual consiste em que a equipe clínica possa decidir sobre a melhor estratégia terapêutica a ser adotada. Assim, o conjunto de variáveis de prognóstico permite definir se um paciente pode ficar somente em acompanhamento e ou receber medidas de suporte, ou se será submetido a estratégias terapêuticas mais agressivas, que podem ser de maiores riscos para o paciente, como transplantes de medula ou quimioterapia (Sasai *et al.*, 1999).

Na SMD, não apenas as manifestações clínicas e laboratoriais são heterogêneas, mas a evolução dos pacientes também é muito variada. A variabilidade individual e a heterogeneidade da condição também dificulta muito a escolha da conduta terapêutica a ser seguida em cada caso. Nos últimos anos, tem-se melhorado o conhecimento das características clínicas e fisiopatológicas da SMD, decorrentes de um maior número de estudos sobre os fatores etiológicos e epidemiológicos. Assim, o diagnóstico tem se tornado mais preciso. No entanto, a complexidade da doença faz com que muito da biologia da doença ainda careça de elucidação (Koc *et al.*, 1998).

Em 1982, o Grupo Cooperativo *Franco-Americano-Britânico* (FAB) baseado em características morfológicas, propôs uma classificação inicial para a SMD, que compreendia cinco grupos (Tabela I).

Tabela I. Classificação FAB que compreende os cinco grupos da SMD.

Subtipo FAB	Blastos no SP	Blastos na MO	Sideroblastos em anel (MO)	Monócitos/mm³ (SP)
Anemia refratária (AR)	<1%	<5%	<15%	
Anemia refratária com sideroblastos em anel (ARSA)	<1%	<5%	>15%	
Anemia refratária com excesso de blastos (AREB)	<5%	5-20%		
Anemia refratária com excesso de blastos em transformação (AREB-t)	>5%	21-30%		
Leucemia mielomonocítica crônica (LMMC)	<5%	1-20%		>1000/mm ³

Fonte: (Bennett *et al.*, 1982).

Com o decorrer dos estudos, observaram que algumas formas da SMD não se enquadram muito bem nos critérios FAB. Adicionalmente, há, dentro de um mesmo subtipo, evolução e prognóstico diferentes. Assim, a Organização Mundial de Saúde (OMS) propôs uma nova classificação para SMD, como apresenta a (Tabela II).

Tabela II. Classificação proposta pela OMS apresentando os subtipos da SMD.

Tipo	Sangue periférico	Medula óssea
Anemia refratária	Anemia, blastos < 1%	Displasia apenas na linhagem eritroblástica, <5% de blastos.
Anemia refratária com sideroblastos em anel	Anemia, Ausência de blastos	Displasia apenas na linhagem eritroblástica, <5% de blastos, < 15% de sideroblastos em anel
Citopenia refratária com displasia multilinhagem	Bi ou pancitopênia < 1% de blastos	Displasia em >10% das células de duas ou mais linhagens, <5% de blastos.
Citopenia refratária com displasia de multilinhagens e sideroblastos em anel	Bi ou pancitopênia < 1% de blastos	Displasia em >10% das células de duas ou mais linhagens, <5% de blastos e >15% de sideroblastos em anel
Anemia refratária com excesso de blastos -1	Bi ou pancitopênia < 5 % de blastos	Displasia uni ou de multilinhagens 5%-9% de blastos
Anemia refratária com excesso de blastos -2	Bi ou pancitopenia, blastos 5%-19% Monócitos <1000/mm ³ .	Displasia uni ou de multilinhagens 10%-19% de blastos
Síndrome mielodisplásica inclassificável	Neutropenia ou plaquetopenia, blastos raros ou ausentes.	Displasia, unilinhagem blastos <5% Megacariócitos em número normal ou elevado com núcleos unilobulados <5% blastos.
Síndrome mielodisplásica com del (5q) isolada	Anemia, plaquetas normais ou elevadas, <5% blastos.	

Fonte: (Jaffe *et al.*, 2001).

Sendo suprimido o subtipo anemia refratária com excesso de blastos em transformação e englobando os pacientes com mais de 20% de blastos como leucemia aguda. No entanto, aos subtipos anemia refratária e anemia refratária com sideroblastos em anel, a classificação da OMS sugere que sejam separados os casos de displasia eritróide isoladas daqueles com displasia das três linhagens, pois estes últimos têm prognósticos mais específicos. Já, os casos de leucemia mielomonocítica crônica por apresentarem tanto características proliferativas como displásicas, passaram a ser definidos na categoria de síndrome mielodisplásica/mieloproliferativa (Jaffe *et al.*, 2001).

A citogenética também mostra diferenças básicas entre SMD primária e secundária Tabela III. Alterações genéticas clonais podem ser detectadas de 30 a 50% dos casos primários e em mais de 80% da SMD secundária. Em geral, os achados cariotípicos incluem perda ou ganho de material genético decorrentes de deleções, monossomias ou trissomias (Pinheiro *et al.*, 2006).

Tabela III. Anormalidades citogenéticas mais frequentes relacionadas à SMD.

Alterações	Casos primários (%)	Casos secundários (%)
Deleção Parcial		
del 5q	20	20
del 20q	3-5	< 1
del 7q	1-2	20
del 11q	2-3	< 1
del 12p	1-2	3-4
Monossomias		
(- 7)	10-15	50
(- 11)	4	10
(- Y)	3	5-7
Trissomias		
(+ 8)	5	5-15
(+ 11)	15	10
(+ 21)	4	1
(+ 22)	2-5	1
Translocações		
t(1;7) (p11 ; p11)	< 1	5
t(5;17) ou (7;17)(p11;p11)	< 1	2
Alterações complexas	20	50

Fonte: (Fenaux *et al.*, 1996).

Como outras variáveis além do cariótipo também possuem valor prognóstico, Greenberg e colaboradores (1997) propuseram um *escore*, o *Internacional Prognostic Scoring System (IPSS)*. Este sistema leva em consideração, além do cariótipo, o número de citopenias e a porcentagem de blastos na medula óssea. Pelos critérios deste *escore* os pacientes, com as suas diversas alterações, podem ser estratificados em grupos de comportamentos evolutivos diferentes. Três categorias citogenéticas foram estabelecidas pelo *IPSS*, a saber: (1) bom prognóstico, que inclui cariótipo normal, nulissomia do cromossomo Y, deleção 5q e deleção 20q isoladas; (2) prognóstico desfavorável, incluindo os cariótipos complexos, que apresentam mais de três

anormalidades e alterações do cromossomo 7, podendo ser deleção ou monossomia e (3) prognóstico intermediário que contempla todas as demais anomalias observadas e que não foram citadas nas categorias anteriores e, portanto seu significado, ainda não foi plenamente estabelecido (Greenberg *et al.*, 1997).

O IPSS ganhou um grande destaque pela sua utilidade clínica devido ao fato de permitir a previsão da evolução em séries independentes de pacientes não tratados. Em (2005) Solé e colaboradores tentaram redefinir algumas alterações citogenéticas, em especial aquelas alocadas no grupo intermediário, e identificar outras previamente não reconhecidas. Para tanto, foram propostas quatro categorias, a saber: (1) bom prognóstico, incluindo cariótipo normal, nulissomia do cromossomo Y, del(5q), del(11q) e del(20q) isoladas; (2) prognóstico intermediário: trissomia 8, rearranjos envolvendo 3q21q26, translocações 11q, del(17p), trissomia 18 e trissomia 19; (3) prognóstico desfavorável: cariótipo complexo, monossomia 7, del(7q) e i(17q) e (4) prognóstico desconhecido: as demais alterações simples ou duplas. Tal estudo reforça a noção de que o cariótipo se constitui numa ferramenta de prognóstico importante. Seu papel nesse conjunto complexo de doenças pode oferecer uma visão global da instabilidade genômica das células malignas associadas à SMD, que afeta conseqüentemente a sobre vida relativa do indivíduo acometido pela condição.

O estudo dos cromossomos pode ser conduzido de forma convencional e ou molecular. A citogenética clássica ou convencional esta relacionada com a análise dos cromossomos da célula em divisão (mitose), especificamente nos de cromossomos metafásicos. FISH ou (Hibridização Fluorescente *in situ*) é uma técnica de citogenética molecular muito utilizada nos laboratórios, sendo que se utiliza sondas, ou seja, seqüências de DNA, marcados com fluorocromos complementares ao DNA alvo que se pretende estudar. O estudo por citogenética molecular possibilita a identificação tanto

em cromossomos metafásicos quanto interfásicos (Chauffaille, 2006; Botelho, 2006; Lorand-Metze I *et al.*, 1991).

Os resultados citogenéticos convencional e molecular devem sempre ser elaborados de acordo com uma nomenclatura estabelecida, isto é, a *International System for Chromosome Nomenclature (ISCN)* [ISCN, 2005].

Para cada tipo da SMD pode-se identificar uma frequência de alterações no cariótipo analisado. Em AR e ARSA, por exemplo, são observadas alterações em 18 a 30% dos casos, sendo que esta frequência pode aumentar para 60% em LMMC. O exame citogenético convencional, em geral está anormal em 25 a 30% dos pacientes, sendo que a monossomia do cromossomo 7 e/ou a trissomia do cromossomo 8 são alterações frequentes (Fenaux *et al.*, 1996).

Alterações no cariótipo da SMD têm sido relacionadas com alguns aspectos ou síndromes clínicas. Dentre estas podemos citar a síndrome 5q-, incluída no subtipo AR sendo caracterizada por uma anemia macrocítica dependente de transfusão além do aumento de contagem de plaquetas. No exame de medula óssea observa-se o número de megacariócitos aumentado. Esta alteração está associada com um bom prognóstico para o paciente e a baixa probabilidade de transformação leucêmica. Alterações do tipo 5q- foram observadas principalmente em indivíduos do sexo feminino com idade aproximada de 60 anos. Os pacientes com 5q- representam cerca de 4% dos casos de SMD (Balduini *et al.*, 1999; Olney HJ & LeBeau, 2001).

Deleção 20q está associada a AR e tem bom prognóstico. Por outro lado, a deleção de 17p é detectada em 6% dos casos de SMD, estando associada com um mau prognóstico (Balduini *et al.*, 1999).

Deleção parcial ou completa do braço curto do cromossomo 7 são achados frequentes na SMD. Estas alterações são encontradas geralmente em pacientes adultos

que apresentam o subtipo AREB ou AREB-t, sendo que estes pacientes apresentam uma sobrevida curta ou evolução para leucemia aguda. A região mais acometida é a 7q22.1 e não se sabe quais genes especificamente estão sendo envolvidos na patogênese da doença (Serio, 2002).

As deleções de 11q foram observadas principalmente em mulheres com ARSA, sendo descrita como bom prognóstico e os pacientes apresentaram uma maior sobrevida. A deleção de 11q envolve uma região próxima a do centrômero, geralmente concentradas em 11q23. O braço longo do cromossomo 11 apresenta vários genes que podem estar relacionados com algumas desordens hematológicas (Olney & LeBeau, 2001).

Aberrações envolvendo o cromossomo 13 foram observadas em aproximadamente 5% dos casos de SMD, podendo ocorrer em qualquer subtipo da doença. Com relação ao cromossomo 17, a deleção do braço curto, está sendo observada em pacientes em processo de terapia e é menos freqüente em SMD primária. Isocromossomo de 17q também foi descrito, do ponto de vista hematológico, os casos com iso de 17q apresentaram algumas características particulares como vacuolização de neutrófilos e eosinofilia, apresentando uma evolução desfavorável (Hirai, 2002).

Trissomia do cromossomo 19 em LMMC relaciona-se a manifestações de doença mieloproliferativa. Alterações no cromossomo 20 foram relatadas em aproximadamente 5% dos casos de SMD primária, observando-se uma deleção de seu braço longo. Deleção de 20q foi relacionada a um prognóstico bom. Os genes supressores tumorais (GST) que se localizam em 20q, como o *TPO1* e o *PLC1*, possuem função de transdução de sinal (Hirai, 2002; Romeo *et al.*, 2002).

O isocromossomo de X foi descrito como uma alteração relacionada principalmente a ARSA, com prognóstico intermediário. A nulissomia de Y pode ser

explicada pelo acúmulo de erros no processo de divisão celular. No entanto nulissomia de Y pode ser associada a um bom prognóstico (Romeo *et al.*, 2002).

As alterações consideradas complexas são observadas principalmente em SMD secundária e estão relacionadas com um prognóstico desfavorável. Estas alterações são caracterizadas por mais de três anormalidades simultâneas, sendo que em grande parte as alterações envolvem perda de material genético. Algumas translocações que podem ocorrer em SMD provocam uma desregulação da expressão de alguns genes, estando relacionada com o aumento, diminuição ou perda total de produtos protéicos normais (Hirai 2002; Romeo *et al.*, 2002).

Os estudos a níveis moleculares principalmente, realizados por FISH, trouxeram informações valiosas para a compreensão e caracterização da SMD (Bennett *et al.*, 2005).

O Gene *EGR-1* localizado no cromossomo em 5q codifica uma proteína que possui função de diferenciação das linhagens celulares monocítio-macrofágica. Também tem função de diferenciação de blastos mielóides e é um regulador de crescimento celular. Com relação ao *IRF-1* é considerado um GST e atua como regulador negativo de proliferação celular (Serio, 2002; Preisler *et al.*, 2001; Boulwood *et al.*, 1994).

Outro gene estudado que também está localizado em 5q é o *CSF-1R* que possivelmente não possui função de supressão tumoral e atua na regulação de crescimento de células mielóides (Mhaweck P & Saleem A, 2001; Heim *et al.*, 1995).

Não só os estudos de genes considerados GST podem ser relacionados à progressão da SMD, mas estudos de microssatélites, que são regiões de repetições no DNA de aproximadamente 100pb, são de extrema importância (Maeck *et al.*, 2000).

Os telômeros são seqüências de DNA repetitivo localizadas nas extremidades dos cromossomos e que são responsáveis pela manutenção da estabilidade cromossômica, logo na SMD a atividade da enzima responsável pela recomposição da perda gênica através do encurtamento dos telômeros, a telomerase, está possivelmente insuficiente devido a correlação com os cariótipos complexos e as instabilidades que se apresentam nesta doença (Gurkan *et al.*, 2005).

Casos em que não ocorrem perdas de material genético ou quando ocorre ganho que é menos freqüente que as perdas em SMD, devem-se focar os estudos dos oncogenes que atuam paralelamente aos GST para alterar o controle do crescimento celular. Genes como *RAS*, *P53*, *PDGF* e *CSF-1R* quando se apresentam mutados, podem contribuir para o surgimento e o desenvolvimento da SMD (Hirai, 2002).

Como componente da via de sinalização para proliferação celular e ativado por receptores de tirosino-quinase e sendo estimulado por fatores ligantes extracelulares temos o oncogene *RAS*. De 10 a 15% da SMD são detectadas mutações do gene *N-RAS* e dentro de uma classificação prognóstica apresenta-se como desfavorável e rápida transformação para Leucemia Mieloide Aguda (Hirai, 2002).

A apoptose aumentada em SMD está relacionada à presença desregulada de várias citocinas ou ligantes conhecidos por sua atividade funcional pré-apoptótica. Podemos citar como exemplo a Interleucina 1 β e o Fator de Necrose Tumoral na medula que estão ativados em pacientes com SMD (Appelbaum, 2004; Steensma *et al.*, 2004; Biesma *et al.*, 1997,).

Como codificador de um receptor-quinase, o gene *FLT3* está relacionado com diferenciação e proliferação de precursores hematopoéticos. Em aproximadamente 10% da SMD este gene apresenta mutações interna *em tandem*. Esta alteração apresenta-se em um estágio avançado da doença, sendo que o prognóstico é considerado

desfavorável e pode ocorrer transformação para leucemia aguda (Shih *et al.*, 2004; Stirewalt *et al.*, 2003; Hirai, 2002, Look, 2005; List *et al.*, 2004).

Não podemos deixar de enfatizar alguns processos importantes que influenciam na expressão de alguns genes, onde podem estar ligados ao surgimento e desenvolvimento da SMD (Aggerholm *et al.*, 2006; Laird, 2005). Tais processos como metilação, hipermetilação e modificações na estrutura das proteínas histonas no DNA são conhecidos como alterações ou fatores epigenéticos e podem, por exemplo, causar o silenciamento da expressão de um gene (List *et al.*, 2004; Laird, 2005; Chauffaille, 2006, apud, Aggerholm *et al.*, 2006; List *et al.*, 2004).

A citogenética tanto convencional se mostra de extrema importância para definir e colaborar com o diagnóstico, prognóstico e também um melhor entendimento biológico da síndrome mielodisplásica.

Os estudos relacionados com SMD ainda estão longe de elucidar e definir todos os mecanismos para o seu desenvolvimento, entendimento biológico e hipóteses diagnósticas, mas desde os estudos iniciais apresentaram sem dúvida um avanço e um desafio muito grande.

Com certeza em breve estes estudos ofereceram uma caracterização mais abrangente que servirá para aperfeiçoamentos futuros, tanto clínicos como laboratoriais, que proporcionaram um processo terapêutico mais preciso podendo oferecer uma melhor qualidade de vida para o paciente.

1.1.2 Epidemiologia

Devido às inúmeras formas com que a SMD pode se manifestar, sua incidência anual no Brasil ainda não é conhecida. A incidência nos Estados Unidos, onde existe um maior número de estudos epidemiológicos é de 10 a 20 mil casos por ano, o que equivale a aproximadamente 40 a 80 casos por milhão de habitantes, ou seja, 1 em cada

12 a 25 mil indivíduos é portador de SMD. A incidência da doença em indivíduos acima de 60 anos, segundo a literatura médica, é de 1 caso para cada 5.000 habitantes, e se manifesta mais comumente em pessoas na faixa etária de 70 anos na Europa e nos Estados Unidos. No Brasil, contudo, os dados epidemiológicos mostraram uma tendência na SMD de surgir mais cedo, por volta dos 55 anos (Lopes *et al.*, 1999).

A precocidade no surgimento da doença no Brasil pode estar associada a alguns fatores ambientais. Tem sido atribuídos aos brasileiros uma maior exposição a agentes tóxicos, já que a legislação de controle ambiental no Brasil é precária e insuficiente, quando comparada com as de países europeus e dos EUA. No Brasil os indivíduos nem sempre têm a consciência dos riscos ocupacionais e acidentais a que estão submetidos. Conseqüentemente, há desconhecimento da importância da atitude preventiva. Daí, portanto, a proporção de casos de cânceres relacionada às exposições ocupacionais pode variar de 4 e 40% no território nacional (Ribeiro *et al.*, 2004).

O número de casos de SMD na idade infantil tem aumentado consideravelmente nos últimos anos e daí a necessidade e a importância de se desenvolver mais estudos e conseqüentemente capacitar profissionais que tenham interesse nos diferentes aspectos da doença (Hindsgav *et al.*, 2000; Fenaux, 1996).

Um dos primeiros estudos publicados relacionando infância e mielodisplasia no Brasil foi feito por Lopes e colaboradores em 2006 no Centro de Tratamento e Pesquisa do Hospital do Câncer de São Paulo. Sendo que se tratou de um estudo retrospectivo, obtidos de registros dos anos de 1984 a 1991. Os autores identificaram oito casos de SMD entre 320 crianças que foram encaminhadas ao hospital com diagnóstico provável de leucemia. Os demais casos foram diagnosticados como: LMC (7/320); LLA (227/320); LMA (54/320); AA (7/320) os outros com (17/320) diagnósticos a uma reação de leucemogênese a infecções graves. Posteriormente foi

realizado um estudo complementar acrescentando seis outros casos de SMD identificados na mesma instituição no período de 1992 a 1994 também com SMD (Lopes *et al.*, 2006).

Crianças com SMD primária apresentam aproximadamente 50% de anormalidades citogenéticas clonais nas células malignas. A frequência percentual destas anormalidades é maior em pacientes com doenças mais avançadas, progressivas e secundárias (White *et al.*, 1992; Yunis *et al.*, 1988).

O Brasil, por ser um país grande e com tantas diferenças, as características de determinadas regiões e os aspectos epidemiológicos provavelmente influenciam tanto na incidência e prevalência quanto nos diferentes tipos de cânceres e de mielodisplasias. Exames mais refinados e disponíveis para a população, principalmente as mais carentes, são praticamente impossíveis de serem realizados em centros com poucos recursos financeiros e sem recurso humano especializado. Desta forma, a capacitação de profissionais para o desenvolvimento técnico e para o pensamento crítico analítico aplicado, sem dúvida traria inúmeros benefícios, principalmente para a população carente e menos assistida nas diversas regiões nacionais e garantiria uma análise epidemiológica que retratasse melhor a realidade dos agravos da saúde na população (Lopes *et al.*, 2006).

2. Justificativa

As anormalidades citogenéticas estão intrinsecamente relacionadas ao processo neoplásico, representando tanto uma causa como uma consequência do tumor. A presença das anormalidades cromossômicas numéricas e/ou estruturais representa uma importante informação no que diz respeito ao prognóstico da doença neoplásica, à resposta ao tratamento quimioterápico e a probabilidade de cura. Em alguns casos, constitui importante parâmetro de orientação quanto à escolha da abordagem

terapêutica. O tratamento do paciente com mielodisplasia deve ser feito considerando o risco biológico da doença, definido pelas alterações cariotípicas clonais da doença, além da idade e das condições clínicas do paciente.

No Estado de Goiás, até o momento, nenhum estudo foi realizado visando correlacionar os achados cariotípicos na síndrome mielodisplásica. Portanto, os dados obtidos a partir do presente estudo contribuirão para reforçar as comunidades médicas e científicas que de fato a avaliação citogenética, tanto convencional como a molecular, promovem informações valiosas que poderão contribuir para a definição do diagnóstico e prognóstico do paciente.

3. Objetivos

3.1. Geral

Avaliar as alterações citogenéticas na síndrome mielodisplásica, utilizando a técnica de citogenética convencional correlacionando os achados citogenéticos com os dados clínicos dos pacientes, na tentativa de incrementar informações de valor prognóstico para os casos de SMD.

3.2. Específicos

- Determinar a diversidade das alterações citogenéticas nos pacientes em estudo, que apresentar diagnóstico para síndrome mielodisplásica.

- Demonstrar a importância das alterações cromossômicas nos quadros da SMD como variáveis auxiliares ao diagnóstico, classificação, acompanhamento, escolha terapêutica e entendimento mais adequado em função da diversidade biológica da doença.

- Correlacionar os resultados citogenéticos obtidos com aspectos clínicos e laboratoriais.

- Estimular as parcerias entre a Universidade Católica de Goiás - Laboratório Núcleo de Pesquisa Replicon, Laboratório de Citogenética Humana e Genética Molecular – LaGene – Superintendência Leide das Neves Ferreira da Secretaria de Estado da Saúde – (SES), Hospital Araujo Jorge e Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Goiás.

- Fornecer dados para um estudo prospectivo, que permitirá uma análise detalhada, à medida que se agregam novos casos de SMD.

- Capacitar recurso humano para o desenvolvimento do pensamento técnico, crítico e analítico aplicados, que visem apoiar o diagnóstico de SMD no Estado de Goiás.

4. Materiais e Métodos

4.1. Delineamento do estudo

O presente estudo foi conduzido no Núcleo de Pesquisa Replicon da Universidade Católica de Goiás em cooperação mútua com o LaGene - Laboratório de Citogenética Humana e Genética Molecular / SuLeide - Superintendência Leide das Neves Ferreira / SES – Secretaria de Estado da Saúde / Governo do Estado de Goiás. As amostras foram obtidas junto aos Serviços de Hematologia dos Hospitais Araújo Jorge (HAJ) e Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Goiás (HC/UFG).

A avaliação do prognóstico foi realizada a partir da obtenção dos dados dos prontuários individuais, confrontados com os resultados do diagnóstico citogenético convencional dos pacientes.

4.2. Grupo amostral

Foram avaliadas amostras de 25 pacientes com indicação clínica para síndrome mielodisplásica, sendo que somente 15 pacientes com diagnóstico confirmado para SMD foram incluídos neste estudo. A participação individual no estudo e as doações

das amostras biológicas foram voluntárias. Todos os 15 pacientes participantes preencheram e assinaram um termo de consentimento livre e esclarecido (Anexo I e II).

4.2.1 Critérios de Inclusão

- Pacientes com indicação clínica para síndrome mielodisplásica.
- Pacientes com diagnóstico primário e secundário para SMD.
- Pacientes com TCLE assinado.

4.2.2 Critérios de exclusão

- Pacientes que não apresentaram diagnóstico para SMD.
- Pacientes que não concordaram em participar do estudo.

4.3 - Aprovações pelos comitês de ética em pesquisa

O Projeto de pesquisa intitulado “Importância do diagnóstico citogenético convencional como fator prognóstico na síndrome mielodisplásica” foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa Médica Humana do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Goiás (protocolo de registro N° 141/08 em 03/12/2008) e pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Araújo Jorge da Associação de Combate ao Câncer em Goiás (protocolo de registro N° 033/08 em 07/08/2008).

4.4. Coleta das Amostras

Os Serviços de Hematologia dos Hospitais Araújo Jorge e Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Goiás realizaram as coletas de medula óssea e/ou sangue periférico para o estudo morfológico e/ou imunofenotípico destas amostras. Das amostras biológicas aspiradas, 2,0 mL foram destinadas para o presente estudo. O risco para os pacientes voluntários foi relativo ao procedimento da coleta da amostra. Em qual houve um desconforto para o paciente no momento do procedimento, que foi conduzido por profissionais capacitados do setor de hematologia em que possuía todos os recursos ambulatoriais a procedimentos desta natureza. Ademais, a obtenção das

amostras fazia parte da rotina necessária para o diagnóstico da doença, não sendo conduzida com fim específica para pesquisa.

Os critérios de inclusão que foram seguidos criteriosamente para o teste citogenético são:

- A coleta foi realizada utilizando seringas e tubos esterilizados exclusivamente por raios gama.
- Heparina foi o anticoagulante utilizado.
- As amostras foram transportadas sob refrigeração adequada para a correta preservação da viabilidade celular.
- As amostras foram processadas para a cultura de células em um período de no máximo 2h após a coleta.

Os critérios de exclusão das amostras para o teste citogenético foram:

- As coletas e transporte das amostras não foram realizados conforme descrição anterior.
- Amostras que chegaram ao laboratório hemolizadas ou coaguladas.

4.5. Citogenética Convencional

O protocolo conduzido foi obtido de Verma e Babu (1995). As culturas foram feitas em quadruplicatas.

4.5.1 Início da Cultura

- Protocolavam-se os dados dos pacientes no livro específico de protocolo do laboratório.

- Utilizavam-se frascos aliquotados com meio de cultura incompleto ou com meio completo (Marrow Grow - *Cytocell*).

- Etiquetavam-se os frascos de cultura, com o código de identificação das amostras.

- Para cultura de medula óssea heparinizada segue-se:
 - Na câmara de fluxo laminar, separava-se 2 mL da amostra enviada ao laboratório em um tubo cônico de 15 mL.
 - Acrescentava-se 4 mL do meio de cultura.
 - Centrifugava-se por 6 minutos a 1800rpm.
 - Na câmara de fluxo laminar, retirava-se o sobrenadante e acrescentava-se mais 2 mL do meio de cultura. As células eram ressuspensas em meio de cultura.
 - Em um tubo do tipo eppendorf de 2 mL contendo 1 mL do líquido de Thomas, colocava-se 0,05 mL da suspensão celular.
 - Com o auxílio de em uma câmara de *Newbauer* estimava-se o total de células na amostra.
 - Em um tubo de cultura incompleto que continha 4 mL de meio de cultura, adiciona-se:
 - 2 mL de SFB;
 - 100 µL de L-glutamina;
 - quantidade de amostra adequada;
 - não acrescentar fitohemaglutinina para cultura de medula óssea.
 - para o meio de cultura completo para medula óssea, acrescentar somente a amostra adequada de medula.
 - Homogeneizava-se lentamente, por movimentos circulares e de inversão.
 - Incubava-se em estufa a 37°C e 5% de CO₂ por 48hs.

Para cultura de sangue periférico foi utilizado meio de cultura incompleto, acrescentando: 1 mL da amostra, 1 mL de SFB, 100µL de L-glutamina, 100µL de fitohemaglutinina, enquanto para meio de cultura completo acrescentar somente 1ml da amostra de sangue.

4.5.1 Bloqueio da Cultura

- Acrescentava-se 75µL de colchicina (10µg/mL) após 47 horas do início da cultura. A amostra era devolvida para estufa a 37°C e 5% de CO₂ por 30 minutos.

- Posteriormente, o volume do frasco de cultura era transferido para um tubo cônico de 15 mL devidamente identificado, que foi e centrifugado a 1800 rpm durante 6 minutos.

- Desprezava-se o sobrenadante por aspiração e acrescentava-se, lentamente por gotejamento, 10 mL de solução hipotônica de cloreto de potássio a 0,075 M. Esta suspensão era incubada por 30 minutos a 37°C e 5% de CO₂.

- Completava-se o tubo até 14 mL com solução fixadora de *Carnoy* (3 partes de álcool metílico para 1 parte de ácido acético). Homogeneizava-se a suspensão lentamente por inversão e deixava-se repousar por 10 minutos a temperatura ambiente.

- Centrifugava-se por 6 minutos a 1800 rpm e aspirava-se o sobrenadante, deixando-se 2,0 mL da solução recobrando o bastão celular.

- Acrescentava-se lentamente por gotejamento e sob agitação constante até com solução de *Carnoy* até que completasse 14 mL no tubo..

- Repetiam-se os dois últimos passos por duas ou três vezes, até que a suspensão celular tivesse o sobrenadante límpido.

4.5.2 Preparação das Lâminas

- Para preparação das laminas, primeiramente centrifugava-se o material por 6 minutos a 1800 rpm e desprezava-se o sobrenadante deixando aproximadamente de 1,5 a 2,0 mL de solução, dependendo da quantidade do bastão celular.

- Limpavam-se muito bem as lâminas para desengordurá-las com uma solução de álcool etílico a 70%.

- Identificavam-se as lâminas com o código correspondente a cada caso.

- Preparava-se uma lamina teste e depois de observava-se o material preparar no mínimo, cinco lâminas.

- No momento do gotejamento, umedecia bem as lâminas com água destilada, preferencialmente a uma temperatura baixa e colocá-las no banho-maria a 60°C.

- Esta diferença de temperatura entre a água contida na superfície da lâmina e o vapor quente do banho-maria, irá facilitar o espalhamento dos cromossomos.

- Homogeneizava-se a solução de células antes do gotejamento, utilizando uma micropipeta de 250µL, sendo que o ideal é gotejar 3 vezes, sendo uma em cada extremidade e uma no centro da lâmina.

- Secavam-se as lâminas em temperatura ambiente e observava-se no microscópio invertido se há a presença de metáfases

4.5.3 Bandeamento

- Faziam-se alíquotas de 0,5 mL de tripsina (2,8%).

- Completa-se esta alíquota para um q.s.p de 50 mL de tampão PBS.

- Colocava-se a solução de tripsina (0,025%) em banho-maria até atingir 30°C.

- Usava-se metanol puro para inibir a ação da tripsina.

- Usava-se o corante Giemsa a 4%

- Colocava-se a lâmina gotejada com material na solução de tripsina após a mesma ter atingido 30°C deixando por aproximadamente 30 segundos.

- Mergulhava-se a lâmina no metanol para tirar o excesso desta enzima..

- Deixava-se por 3 minutos no corante.

- Mergulhava-se a lâmina na água para tirar o excesso de corante e em seguida secava esta lâmina.

4.5.4 Análise Citogenética

Um sistema de microscopia óptica motorizada, interligado a um computador equipado com *Software* específico para análise citogenética (IKAROS^R *Metasystems Germany*) foi utilizado como ferramenta de apoio para a análise citogenética convencional.

4.6 Preparo das Soluções

4.6.1 Preparo de solução hipotônica

- Preparava-se uma solução hipotônica de cloreto de potássio a 0,075M.

Exemplo para uma cultura:

KCl 0,055g

Água destilada..... 10 ML.

- Preparava-se 10 mL de solução para cada amostra.

4.6.2 Preparo de solução fixadora álcool-ácida de Carnoy

- Preparava-se a solução fixadora de *Carnoy* utilizando-se 3 partes de álcool metílico para 1 parte de ácido acético glacial.

Exemplo para uma cultura:

Álcool metílico..... 30 mL

Ácido acético glacial..... 10 mL

4.6.3 Preparo da solução de Giemsa a 4%

Giemsa..... 2 mL

Água destilada (q.s.p)..... 50 mL

Guardar a solução de Giemsa a 4% ao abrigo da luz.

Se houver a formação de precipitados, filtrar o corante antes do uso.

5. RESULTADOS

Os dados descritivos obtidos dos 15 pacientes com diagnósticos confirmados para SMD incluídos no presente estudo foram relacionados na Tabela IV

Tabela IV Dados descritivos dos pacientes estudados com diagnóstico de SMD.

Variável	n	%
Sexo		
Masculino	05	33,3
Feminino	10	66,7
Idade (anos)		
12 - 40	06	40,0
> 40	09	60,0
Total	15	100

O tamanho discreto do grupo amostral pode ser explicado pela incidência reduzida da síndrome mielodisplásica na população.

As médias de idade para os indivíduos do sexo masculino, sexo feminino e a média geral foram 46,0, 52,4 e 49,2 respectivamente.

Para a realização do teste citogenético convencional proposto neste estudo, foram utilizados como amostras biológicas dos pacientes, sangue periférico heparinizado e medula óssea heparinizada. A distribuição percentual dos pacientes com SMD quanto ao tipo de amostra coletada encontram-se ilustrados na Figura 01.

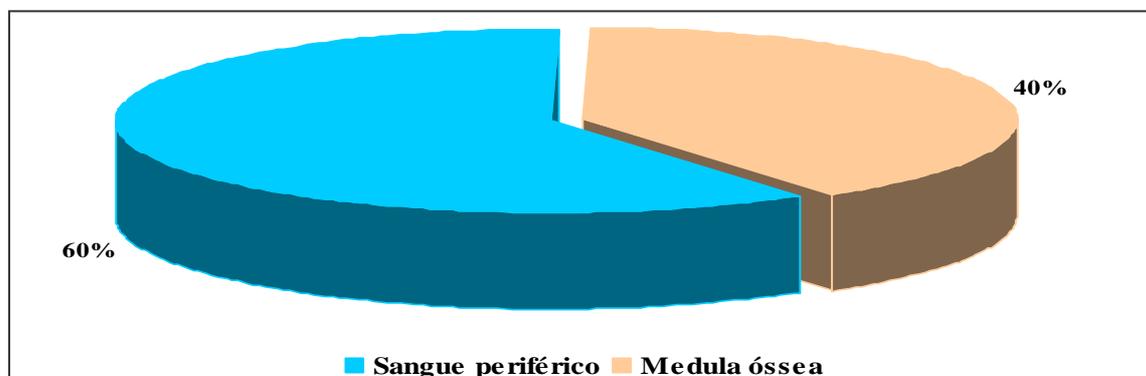


Figura 01. A distribuição dos pacientes com SMD quanto ao tipo de amostra coletada.

Para obtenção dos 15 pacientes incluídos neste estudo com diagnósticos confirmados de SMD foram realizadas culturas de amostras de sangue periférico ou medula óssea de 25 pacientes encaminhados para o laboratório com indicação clínica de SMD. No teste citogenético convencional culturas de 6 pacientes não tiveram expansão clonal e 4 pacientes tiveram resultado citogenético, mas não foi possível obter o termo de consentimento livre e esclarecido, logo estes também não foram incluídos no estudo.

Os cariótipos podem apresentar-se de várias formas, principalmente quando estiver associado a um tipo de distúrbio relacionado a linhagens celulares sanguíneas. No caso de pacientes com diagnóstico de síndrome mielodisplásica não é diferente. As alterações numéricas, identificadas como trissomias e monossomias e as estruturais, incluindo translocações e inversões e outras alterações consideradas complexas, os achados adicionais e os cariótipos normais, identificados neste estudo, estão descritos na Tabela V.

Tabela V. Alterações genéticas identificados nos pacientes estudados com SMD.

Alterações Genéticas	Descrição	Cariótipo
Numéricas	Trissomia	47,XX,+22 47,XX,+ mar 47,XX,+21
	Monossomia	45,XX,-17 45,X,- (Y)
Estruturais	Deleções	46,XX,del(12)(p23) 46,XY,del(7p) 46,XY,del(11)(q13) 46,XX,del(11)(q23) 46,XX,del(10)(q26) 46,XX,del(5)(q13q33)
	Translocações	46,XX,t(3;10)(q29;q25) 46,XX,t(8;16)(q22q22)
	Duplicações	46,XX,dup(1)(q3.2;4.2)
	Isocromossomo	i(17q)
	Achados Adicionais	Poliploidia
Normal	Normal	46,XY 46,XX

Além da citogenética, dados obtidos através da análise do hemograma e mielograma são de extrema importância para que seja realizada a classificação do prognóstico e tratamento do paciente. Os resultados da contagem dos leucócitos, neutrófilos, hemoglobina, plaquetas e blastos dos pacientes em estudo, estão demonstrados na Tabela VI.

Tabela VI. Resultados do hemograma e mielograma dos pacientes com SMD.

Pacientes	Leucócitos (mm^3)	Neutrófilos (mm^3)	Hemoglobina (g/dl)	Plaquetas (mm^3)	Blastos (%)
1	2.900	2.465	14,3	180.000	0
2	3.800	2.128	15,5	132.000	0
3	3.900	1.322	15,1	129.000	0
4	3.100	992	13,4	272.000	0
5	2.800	1.344	12,0	132.000	0
6	2.900	609	11,0	231.000	0
7	2.100	1.161	13,8	241.000	0
8	2.100	1.302	12,1	234.000	0
9	800	782	9,0	50.000	0
10	2.800	1.532	8,5	221.000	0
11	11.600	4.060	8,8	104.000	6
12	3.600	2.092	8,7	242.000	0
13	2.900	810	9,1	236.000	0
14	3.300	1.287	11,3	310.000	0
15	3.200	1.310	9,0	235.000	0

Com a proposta de um novo sistema de classificação o *IPSS (Internacional Prognostic Scoring System)* por Greenberg em 1997 foram definidos alguns fatores prognósticos de acordo com esta classificação, sendo que suas respectivas pontuações estão representadas na Tabela VII.

Tabela VII. Classificação *IPSS*.

Pontuação	0	0,5	1,0	1,5	2,0
Blastos na M.O.(%)	<5	5 a 10	-	11 a 20	21 a 30
Cariótipo	bom	intermediário	ruim		
Citopenias	0 a 1	2 a 3			

Fonte: Greenberg 1997.

1 – Cariótipo de baixo risco: normal, deleção do cromossomo Y, deleção do braço longo do cromossomo 5 ou deleção do braço longo do cromossomo 20. Cariótipo de risco intermediário: todas as demais alterações citogenéticas. Cariótipo de risco alto: alterações complexas (>3) ou alterações citogenéticas envolvendo o cromossomo 7.

2 – Citopenias Neutrófilos <1500/mm³ ou plaquetas < 100.000/mm³ ou hemoglobina < 10g/dl.

De acordo com a soma de pontos da classificação *IPSS*, foram definidos grupos de risco em que os pacientes estão incluídos. Esta pontuação esta representada na

Tabela VIII.

Tabela VIII. Grupos de risco de acordo com o *IPSS*.

Grupo de Risco	Pontuação
Baixo	0
Intermediário I	0,5 a 1,0
Intermediário II	1,5 a 2,0
Alto	>2,5

Fonte: Greenberg 1997.

As alterações citogenéticas identificadas por paciente e suas respectivas porcentagens neste estudo estão descritas a seguir na Tabela IX.

Tabela IX. Alterações citogenéticas e suas respectivas percentagens encontradas por paciente com diagnóstico para SMD.

Pacientes	Amostra Biológica	Cariótipos	n (%)
1	SP	46,XX	80
		46,XX,del(12)(p23)	10
		47,XX,+22	10
2	SP	46,XY	100
3	SP	46,XY	52
		46,XY,del(11)(q13)	48
4	MO	46,XX	85
		46,XX,del(10)(q26)	5
		46,XX,del(11)(q23)	5
		Poliploidia	5
5	MO	46,XX	100
6	SP	46,XX	100
7	SP	46,XX	95
		46,XX,t(3;10)(q29;q25)	5
8	SP	46,XX	100
9	MO	46,XX	49
		46,XX,dup(1)(q3.2;4.2); i(17q)	51
10	MO	46,XY	100
11	MO	46,XY	55,6
		45,XY,-17	7,0
		47,XY,+21	10,0
		46,XY,del(7p)	15,0
		47,XY,+mar	2,4
		46,XX	94
12	SP	46,XX,t(8;16)(q22q22)	6,0
		46,XY	6,6
13	MO	45,X,del(Y)	93,4
		46,XX	87
14	SP	46,XX,del(5)(q13q33)	13
15	SP	46,XX	100

1- SP: Sangue Periférico Heparinizado.

2- MO: Medula Óssea Heparinizada.

A classificação IPSS tem como objetivo determinar o prognóstico para conseqüentemente os médicos assistentes possam determinar um tratamento mais específico e direcionado para cada paciente. A classificação IPSS dos quinze pacientes com diagnóstico de síndrome mielodisplásica incluídos neste estudo está demonstrada na tabela X.

Tabela X. Classificação *IPSS* dos pacientes estudados de acordo com o grupo de risco dos quinze pacientes com diagnóstico para SMD.

Pacientes	Pontuação (IPSS)	Grupo de Risco (IPSS)
1	0,5	Intermediário I
2	0,0	Baixo
3	0,5	Intermediário I
4	1,0	Intermediário I
5	0,5	Intermediário I
6	0,0	Baixo
7	0,5	Intermediário I
8	0,0	Baixo
9	1,5	Intermediário II
10	0,0	Baixo
11	2,0	Intermediário II
12	0,5	Intermediário I
13	0,0	Baixo
14	0,5	Intermediário I
15	0,5	Intermediário I

Depois que os pacientes foram classificados no grupo de risco, os médicos assistentes puderam determinar o protocolo terapêutico mais individualizado para o paciente e observar a perspectiva evolutiva da doença, como esta sendo citado na Tabela XI.

Tabela XI. Tratamento e evolução dos pacientes estudados.

Pacientes	Tratamento	Evolução
1	Suporte	Estável
2	Suporte	Estável
3	Suporte	Estável
4	Suporte	Estável
5	Suporte	Estável
6	Suporte	Estável
7	Suporte	Estável
8	Suporte	Estável
9	Suporte	Óbito
10	Suporte	Estável
11	Quimioterápico	LMA/Óbito
12	Suporte	Estável
13	Suporte	Estável
14	Suporte	Estável
15	Suporte	Estável

1 – Suporte - Vitaminas B-12, ácido fólico e fatores de crescimento celular como (eritropoetina).

2 – Quimioterápico – AraC.

6. DISCUSSÃO

Todo e qualquer estudo e análise com relação ao diagnóstico, prognóstico e evolução da SMD é muito importante, pois a incidência reduzida na população dessa patologia, aliada a diversidade e complexidade dos quadros clínicos, dificulta as condutas terapêuticas, com impacto significativo na sobrevida individual. Assim, o sucesso terapêutico, que permite aos profissionais envolvidos ampliar a sobrevida individual e oferecer uma melhor qualidade de vida aos pacientes, depende de uma ação multidisciplinar, que promova a definição correta do prognóstico. Sob este ponto de vista há méritos nos resultados citogenéticos descritos no presente estudo, pois ampliam as chances de se compreender a complexa biologia da Síndrome Mielodisplásica.

O diagnóstico, de SMD para os pacientes, que compõem o grupo do presente estudo, foi baseado nos diversos tipos de alterações cromossômicas observadas, juntamente com a presença de alterações displásicas celulares em uma ou mais linhagens hemopoéticas no estudo do sangue periférico e da medula óssea.

Em diversos estudos (Norman *et al.*, 1993; Bain, 1997) argumentam que um protocolo de exclusão para SMD deve incluir dosagem de ferro, ácido fólico e vitamina B-12, além de realizar o teste anti-HIV. Todos os pacientes com SMD que participaram do presente estudo foram submetidos a estes ensaios sugeridos para o protocolo de exclusão. A deficiência dos níveis séricos de ferro, ácido fólico e vitamina B-12 pode levar o paciente ao desenvolvimento de anemias. A infecção por HIV pode causar alterações na hematopoese devido tanto à infecção viral propriamente dita como efeito colateral devido os medicamentos antivirais usados para o tratamento dos pacientes.

De acordo com Pinheiro e colaboradores (2006), quando é observada uma síndrome mielodisplásica secundária, as displasias e as citopenias são mais agressivas, o que possibilita um maior processo de fibrose no ambiente medular, observa-se uma

hipocelularidade da medula óssea e com cariótipos mais alterados e complexos. Todos estes fatores são considerados mais agressivos e aumentam a taxa de transformação para uma leucemia aguda. Assim, pacientes com diagnóstico de SMD secundária possuem, em comparação com a SMD primária, um prognóstico desfavorável. A SMD secundária também é o tipo da doença que pode acometer indivíduos mais jovens, ao contrário da SMD primária que acometem geralmente indivíduos com maior idade. Os pacientes incluídos neste estudo não foram submetidos a nenhum tipo de exposição recente a substâncias tóxicas e ou agentes citotóxicos. Nenhum paciente foi submetido à quimioterapia ou radioterapia anteriormente ao diagnóstico de SMD. Portanto, todos os casos foram diagnosticados como síndrome mielodisplásica primária.

Para alguns casos não foi possível realizar a coleta de medula óssea. As causas não foram justificadas pelos médicos assistentes nos prontuários. No entanto, foram realizadas coletas de sangue periférico. Em 60% dos pacientes a análise cromossômica foi conduzida em metáfases obtidas a partir da expansão clonal de sangue periférico. Nestas situações eleva-se o risco de análise excessiva de clones normais, que não representam o processo alterado de hematopoese que está ocorrendo no paciente com o diagnóstico de SMD.

Com relação aos resultados citogenéticos individuais, os cariótipos podem expressar uma variação muito grande de alterações, em SMD. Esta diversidade cariotípica evidencia aspectos importantes da complexa biologia dos grupos de doenças, comumente chamadas de SMD, demonstrando uma grande instabilidade genômica desta doença, o que conseqüentemente influencia sobremaneira no prognóstico do paciente.

De acordo com Greenberg e colaboradores (1997), não só as alterações cromossômicas, mas outras variáveis são de extrema importância para a classificação da doença e também possuem um grande valor prognóstico, como os graus variados de

citopenias no sangue periférico e a porcentagem de blastos na medula óssea. Então foi proposto um novo sistema que é o *IPSS*, sendo que atualmente é o sistema mais utilizado para classificação e determinação do prognóstico em SMD.

A correta classificação da SMD tem como objetivo oferecer um tratamento mais eficaz, direcionado e individualizado. Uma vez que cada paciente com esta doença pode apresentar um comportamento evolutivo diferenciado e, conseqüentemente, se enquadrar em um protocolo terapêutico mais específico.

Para os pacientes do presente estudo, a classificação dentro de um grupo ou categoria, buscou principalmente o direcionamento para o tratamento. Através da descrição das equipes que acompanhava os pacientes, os tratamentos oferecidos foram de suporte ou quimioterápico. No tratamento de suporte, sendo (14/15) dos pacientes incluídos foram utilizados fármacos com funções de fatores de crescimento, por exemplo, estimulando a produção de células vermelhas ou eritrócitos através da administração de eritropoetina (EPO) [Jacobs *et al.*, 1989] e também receberam administração de vitamina B-12 e ácido fólico. O tratamento de suporte tem como objetivo manter a normalização e a volemia dos tecidos sanguíneos, proporcionando uma melhora na qualidade de vida do paciente.

O tratamento para SMD também pode ser mais agressivo, mediante a administração de medicamentos quimioterápicos, como o AraC. Neste caso (1/15) dos pacientes incluídos neste estudo, buscou eliminar as células ou clones malignos. Porém, a intervenção quimioterápica pode causar muitos efeitos colaterais nos pacientes. A adversidade dos efeitos dos quimioterápicos é ainda mais agressiva quando administrada em pacientes de idade mais avançada. Portanto, os efeitos deletérios do tratamento são esperados nos pacientes com diagnóstico de SMD, uma vez que a doença aparece mais freqüentemente após os 40 anos.

Por outro lado, o tratamento quimioterápico, juntamente com transplante de células-tronco hematopoiéticas, são as modalidades que podem oferecer uma possibilidade de cura para o paciente.

Quando o teste citogenético revela perda de material genético, por deleções, monossomias ou nulissomias cromossômicas, sendo as alterações que ocorreram com mais frequência nos pacientes em estudo, pode ocorrer à inativação de genes supressores tumorais. Por outro lado, os oncogenes são geralmente, ativados pelas translocações, sendo que foram identificadas em apenas 2 pacientes em estudo. Logo, perdas e ganhos de funções gênicas são as causas subjacentes a etiopatologia da SMD.

De acordo com List e colaboradores (2005), 12% dos casos de SMD com diagnóstico recente e cariótipos normais, com o decorrer do tempo podem adquirir algum tipo de alteração tanto a nível cromossômico quanto molecular. Então é muito importante para os pacientes com cariótipos normais isolados (6/15) incluídos neste estudo, que os médicos assistentes solicitem no mínimo a cada seis meses um novo teste citogenético se houver mudanças no curso clínico da doença, porque alterações no cariótipo podem ser detectadas com a evolução da SMD.

Uma informação importante é que as alterações não devem ser analisadas de forma isolada pelos profissionais envolvidos e sim devem ter uma visão global da instabilidade gênica da célula. Neste estudo foram observados 60% dos pacientes com mais de uma alteração e o restante apresentando somente um cariótipo específico. O método de definição de prognóstico *IPSS* utilizado pelos médicos assistentes que acompanham os pacientes incluídos neste estudo leva em consideração esta informação, fazendo com que o tratamento posterior à classificação do grupo de risco para cada paciente não seja interpretado e realizado de forma errônea.

De acordo com Chauffaille (2006) a síndrome 5q- consiste na alteração cromossômica mais frequentemente identificada em SMD. Para Balduini e colaboradores (1999) a deleção parcial do braço longo do cromossomo 5 está associada com bom prognóstico para o paciente e uma baixa probabilidade de transformação leucêmica. Neste estudo foi identificado apenas uma del(5)(q13q33). De acordo com a classificação de prognóstico *IPSS*, o paciente foi classificado como pertencente ao grupo de risco intermediário I, recebendo o tratamento de suporte. Até o momento, o estado evolutivo deste paciente é estável. Mhaweck & Saleem (2001) ressaltaram que pacientes com del(5q-) respondem melhor ao fármaco Talidomida, tornando-se independentes de transfusão. O paciente não foi incluído no protocolo de tratamento com Talidomida.

De acordo com Olney & LeBeau (2001) e Mhaweck & Saleem (2001), em síndrome 5q-, observam-se que vários genes são perdidos. Alguns destes genes possivelmente estão ligados ao mecanismo patogênico da doença. Em 5q- há vários genes responsáveis por codificar proteínas que atuam como fatores de crescimento hematopoéticos, por exemplo: *IL-4*, *IL-5*, *IRF1*, *IL3*, *CSF-2*, *IL9*, *EGR-1*, *CD14* e *CSF-1R*. A perda destes genes pode desregular o processo hematopoiético e levar conseqüentemente ao desenvolvimento de displasias e citopenias.

Foi identificada uma alteração envolvendo o cromossomo 7, mais especificamente del(7p), que relaciona-se com o aumento do risco relativo para a evolução leucêmica.

A expressão clínica da monossomia do cromossomo 7, principalmente em crianças, está associada para (Balduini *et al.*, 1999), à Leucemia Mielóide Crônica (LMC) juvenil. Portanto, vale ressaltar que não se sabe quais genes estão situados no cromossomo 7 que seriam responsáveis pelo fenótipo da doença.

Dentre os casos estudados, um paciente com 12 anos de idade no período do diagnóstico apresentou juntamente com deleção de 7(p-), trissomia do cromossomo 21, monossomia do cromossomo 17, um cromossomo marcador de origem não identificada e linhagens de células normais. Um cariótipo complexo como este indica alterações que podem incluir vários genes candidatos, como os de controle de ciclo celular, apoptose, replicação e genes que codificam proteínas que atuam como fatores de transcrição. Todos estes genes alterados podem ter levado a um processo hematopoiético ineficaz e consequentemente ter sido a causa da evolução para uma LMA deste paciente.

A trissomia do cromossomo 21 em SMD tem sido observada em casos mais avançados de SMD com uma evolução mais agressiva e rápida transformação da doença, possivelmente para leucemia.

Quando se identifica uma alteração envolvendo o cromossomo 17, sendo na forma de monossomia ou isocromossomo, de acordo com (Pinheiro *et al.*, 2006; Steensma *et al.*, 2004) temos que relacionar e citar um gene muito importante o *gene P53*, devido ser um GST e por sua grande importância em transcrever uma proteína relacionada à regulação da replicação do DNA, proliferação e apoptose celular. Em aproximadamente 15% dos casos de SMD mostra-se o *gene P53* inativo, logo a doença apresenta-se em um estágio mais avançado, de prognóstico ruim e existindo uma grande possibilidade de progressão para leucemia aguda.

Neste estudo foram identificados clones de células em um paciente apresentado i(17q) e uma alteração não conhecida que é uma dup(1)(q3.2;4.2). Este paciente foi incluído na classificação prognostica intermediário II. O tratamento suporte que estava sendo realizado pelos médicos assistentes seguiam um protocolo terapêutico, em não realizar tratamento agressivo para pacientes muito idosos devido ao próprio processo e resposta imunológica e também do ajuste fisiológico do metabolismo.

Monossomia do cromossomo Y de acordo com (Balduini *et al.*, 1999), é classificada como sendo uma alteração de bom prognóstico, e foi identificada em quase 94% dos clones de um paciente classificado como de baixo risco de acordo com o prognóstico *IPSS*.

Alterações no cromossomo 11 mais especificamente del(11)(q13) e del(11)(q23) foram identificadas, sendo alterações consideradas como de bom prognóstico para o paciente com SMD. De acordo com (Olney & LeBeau, 2001), alterações do tipo rearranjos através das translocações envolvendo 11q, diferentemente das deleções 11q, são indicativos de prognóstico intermediário.

De acordo com (Appelbaum, 2004; Hirai, 2002), devido ao grande número de alterações gênicas que estão envolvidas na SMD, mutações em genes que codificam as citocinas, que atuam como Fator de Necrose Tumoral (TNF) também podem causar um processo de hematopoese ineficaz, devido estas proteínas constituírem fatores importantes na expressão do receptor *faç* acelerando o programa de morte dos precursores hematopoiéticos.

Todas as alterações que envolvam genes que expressam proteínas que atuam como fatores de crescimento, controlam replicação do DNA, controle do ciclo celular e apoptose podem desregular o processo hematopoiético e levar ao desenvolvimento das displasias e citopenias celulares, fenótipos estes observados nos pacientes em estudos com diagnóstico de SMD.

Alterações não conhecidas e não citadas na literatura como, por exemplo, poliploidia, cromossomo marcador, algumas translocações como t(8;16)(q22q22) e t(3;10)(q29;q25), trissomia do cromossomo 22, del(12)(p23) são classificadas como de prognóstico intermediário, devido serem alterações que apresentam ainda muitos aspectos por serem entendidos e definidos.

A citogenética por fazer parte do processo de classificação e fornecer informações que contribuem para definição do prognóstico, deve ser considerado um teste diferencial e ser obrigatoriamente utilizado para o diagnóstico da síndrome mielodisplásica.

7. CONCLUSÕES

- A identificação das alterações cromossômicas, juntamente com todos os dados clínicos dos pacientes com SMD incluídos neste estudo foram de extrema importância para que fosse definido o prognóstico, o diagnóstico, a classificação, o acompanhamento, a escolha terapêutica e um melhor entendimento em função da grande diversidade e complexidade biológica da doença e conseqüentemente determinar um tratamento mais individualizado para cada paciente.

- Também o cariótipo consiste em um dos fatores usados pelo *IPSS* que é o sistema internacional mais utilizado para classificação da Síndrome Mielodisplásica.

- Foi determinada uma diversidade muito grande de alterações citogenéticas nos pacientes em estudo, possibilitando correlacioná-las com as diferentes características, formas variadas de apresentação e evolução da doença. Estas diversas formas de alterações genéticas, demonstram uma grande instabilidade genômica, o que apresentam-se em curso clínico com a doença.

- As parcerias entre a Universidade Católica de Goiás (Laboratório Núcleo de Pesquisa Replicon), Secretaria de Estado da Saúde, (Laboratório de Citogenética Humana e Genética Molecular – LaGene), Hospital Araujo Jorge e Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Goiás, foram importantes para a realização deste estudo e serão para estudos posteriores, à medida que forem agregados novos casos de SMD e outras doenças, podendo realizar pesquisas e oferecer um serviço de referência e de qualidade, principalmente para a população mais carente da sociedade.

Também irá contribuir para realização de estudos futuros principalmente nesta área, onde com certeza temos muito que pensar e aprender.

- A capacitação profissional vem em conseqüência de muito estudo, convivência no laboratório, em hospitais e com pessoas que diretamente necessitam

dela. Tudo o que foi realizado durante estes dois anos de curso foi com muito carinho e dedicação, buscando oferecer para os pacientes que realmente necessitam e merecem uma melhor qualidade de vida e também para seus familiares.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Aggerholm A, Holm MS, Guldberg P, Olesen LH, Hokland P. Promoter hypermethylation of p15INK4B, CDH1, and ER is frequent in myelodysplastic syndrome and predicts poor prognosis in early-stage patients. *Eur J Haematol* 2006; 76 (1): 23-32.
2. Apa AG, Gutz CNRM. Fatores prognósticos nas síndromes mielodisplásicas. *Rev. Bras. Hematol Hemoter* 2006; 28 (3): 198-200.
3. Appelbaum FR. Immunobiologic therapies for myelodysplastic syndrome. *Best Practice & Research Clinical Haematology* 2004; 17 (4): 653-661.
4. Aul C, Gattermann N, Schneider W. Epidemiological and etiological aspects of myelodysplastic syndromes. *Leuk Lymphomaa* 1995; 16: 247-262.
5. Bain BJ. The haematological features of HIV infections. *Br J Haematol* 1997; 99: 1-8.
6. Balduini CL, Guarnone R, Pecci A, Cente-nara E, Invernizzi R, Ascari E. The myelodysplastic syndromes: predictive value of eight prognostic systems in 143 cases from a single institution, *Haematologica* 1999; 84: 6-12.
7. Barch MJ, Knustsen T, Spurbeck. *The AGT Cytogenetics Laboratory Manual*, 3rd Lippincott-Raven, Philadelphia 1997.
8. Bennett JM, Catovsky D, Daniel MT, Flandrin G, Galton DAG, Gralnick HR, *et al.* Proposals for the classification of the myelodysplastic syndromes. *Br J Haematol* 1982; 51: 189.
9. Bennett JM, Komrokji RS. The myelodysplastic syndromes: diagnosis, molecular biology and risk assessment. *Hematology* 2005; 10 (1): 250-269.
10. Biesma DH, van den Tweel JG, Verdonck LF. Immunosuppressive therapy for hypoplastic myelodysplastic syndrome. *Cancer* 1997; 79 (8): 1548-1551.
11. Boultonwood J, Filder C, Lewis S, Kelly S, Sheridan H, Littlwood TJ, *et al.* Molecular mapping of uncharacteristically small 5q deletions in two patients with the 5q- syndrome: delineation of the critical region 5q and identification of a 5q-breakpoint. *Genomics* 1994; 19: 425-432.

12. Botelho TC. Classificações morfológicas das síndromes mielodisplásicas: da classificação Franco-Americana-Britânica (FAB) à classificação da Organização Mundial da Saúde (OMS). Rev. Bras. hematol. Hemoter 2006; 28 (3): 194-197.
13. Chauffaille MLLF. Alterações cromossômicas em síndromes mielodisplásicas. Rev. Bras. Hematol. Hemoter 2006 28 (3): 182-187.
14. Chauffaille MLLF. Alterações moleculares em síndromes mielodisplásicas. Rev. Bras. Hematol. Hemoter 2006; 28 (3): 188-193.
15. Farhi DC. Bone marrow dysplasia – a continuing diagnostic challeng. Am J Clin Pthol 1992; 98: 473-475.
16. Fenaux P, Lai JL. Cytogenetics of myelodysplastic syndromes. Semin Hematol 1996; 33: 127-138.
17. Fenaux P. Myelodysplastic syndromes – Review articles. Hematol Cell Ther 1996; 38: 363-380.
18. Pinheiro RF, Chauffaille MLLF. Myelodysplastic syndromes secondary to chemo – and radiotherapy MDS related to the tretment. Rev. Bras. Hematol. Hemoter 2006; 28 (3): 201-203.
19. Preisler HD, Perambakam S, Li B, Hsu WT, Venugopal P, Creech, *et al.* Alterations in IRF1/IRF2 espresion in acute myeloid leukemia. Am J Hematol 2001; 68: 23-31.
20. Greenberg P, Bishop M, Deeg J, et al. NCCN practice guidelines for Myelodysplastic syndromes. Cancer Genet Cytogenet 1998; 53-80.
21. Greenberg P, Cox C, Le Beau MM, *et al.* International scoring system for evaluation prognosis of myelodysplastic syndrome: a multivariate analysis of prognosis in MDS. Blood 1997; 89: 2079-2088.
22. Gurkan E, Tanriverdi K, Baslamish F. Telomerase activity in MDS. Leuk Res 2005; 29 (1): 131-139.
23. Heim S, Mitelman F. Cancer Cytogenetics. Chomosomal and molecular genetc aberrations of tumor cells. 2and ed Wiley Liss. N York 1995.

24. Hindsgav, C Funen, D. The 2nd International Symposium on Myelodysplastic Syndromes in Childhood, May 11-14, 2000. *Leukemia* 2000; 14: 956-971.
25. Hirai H. Molecular pathogenesis of MDS. *International Journ of Hematology* 2002; 76: 213-221.
26. Hofmann WF, Koeffler HP. Important features of myelodysplastic syndrome. *Int J Hematol* 2002; 76 (2): 222-227.
27. ISCN. An International System for Human Cytogenetics Nomenclature, Recommendations of the International Standing Committee on Human Cytogenetics Nomenclature. Published in colloration with "Citogenetic and Genome Research" Editor (s): Shaffer LG. (Spokane, Wash); Tommerup N. (Copenhagen) 2005.
28. Jaffe, ES. Harris, NL., Vardiman, J. World Health Organization classification of neoplastic diseases of the hematopoietic and lymphoid tissues 2001.
29. Jacobs A, Janowska-Wieczorek A, Caro J *et al.* Circulating erythropoietin in patients with myelodysplastic syndromes. *Br J Haematol* 1989; 73 (1): 36-39.
30. Koc S; Harris JW. Sideroblastic anemias: variations on imprecision in diagnostic criteria, proposal for na extented classification of sideroblastic anemias. *Am J Hematol* 1998; 57: 1-6.
31. Kouides PA, Bennett JM. Morphology and classification of the myelodysplastic syndrome and pathologic variants. *Sem Hematol* 1996; 33: 95-110.
32. Laird PW. Cancer Epigenetics. *Hum Mol Genetics* 2005; 14: 65-76.
33. Lopes LF, Lorand-Metze I. Childhood myelodysplastic syndromes in a Brazilian population. *Pediatr Hematol Oncol* 1999; 16: 347-353.
34. Lopes LF, Lorand-Metze I; Wellington LM, Adriana S, Ligia NM. Myelodysplastic syndromes in childhood. *Rev. Bras. Hematol. Hemoter* 2006; 28 (3): 226-237.
35. List A, Kurtin S, Roe DJ, Buresh A, Mahadevan D, Fuchs D, *et al.* Efficacy of lenalidomide in MDS. *The New Engl J of Med* 2005; 352 (6): 549-557.

36. List AF, Vardiman J, Issa JPJ, DeWitte T. MDS. Hematology Education Book 2004; 297-317.
37. Look T. Molecular Pathogenesis of MDS. Hematology. Education Book. 2005; 156-160.
38. Lorand-Metze I, Arruda VR, Vassalto J. Differential Diagnosis between HIV-related marrow abnormalities and primary myelodysplasia. Path Res Pract 1991; 187-719.
39. Maeck L, Haase D, Schoch C, *et al.* Genetic instability in myelodysplastic syndromes: detection of microsatellite instability and loss of heterozygosity in bone marrow sample with karyotype alterations. Br J. Haematol 2000; 109: 842-846.
40. Magalhães SMM, Lorand-Metze I. Síndromes Mielodisplásicas. Rev. Bras. Hematol. Hemoter 2004; 26 (4): 263-267.
41. Mhaweck P & Saleem A. Myelodysplastic syndrome: review of the cytogenetic and molecular data. Crit Rev in Oncol Hematol 2001; (40): 229-238.
42. Morel P, Hebbard M, Lai JL, Duhamel A, Preudhomme C, Wattel E *et al.* Cytogenetic analysis has strong independent prognostic value in de novo myelodysplastic syndromes and can be incorporated in a new scoring system: a report on 408 cases. Leukemia 1993; 7 (1): 315-323.
43. Maucovati L, Porta MG, Pascutto C, Invernizzi R, Boni M, Travagliano E, *et al.* Prognostic factors and life expectancy in myelodysplastic syndromes classified according to WHO criteria: a basis for clinical decision making. Journal of Clinical Oncology 2005; 23 (7): 594-603.
44. Norman EJ, Morrison JA. Screening elderly populations for cobalamin (vitamin B12) deficiency using the urinary methylmalonic acid assay by gas chromatography mass spectrometry. Am J Med 1993; 94: 589-594.
45. Olney HJ & LeBeau MM. The Cytogenetic in myelodysplastic syndromes. Best Practice & Research Clin Hematol 2001; 14 (3): 479-495.
46. Pinheiro RF, Chauffaille ML, Silva MR. Isochromosome 17q in MDS: a marker of a distinct entity. Cancer Genetics and Cytogenetics 2006; 166 (2): 189-190.

47. Preisler HD, Perambakam S, Li B, Hsu WT, Venugopal P, Creech S, *et al.* Alterations in IRF1/IRF2 expression in acute myeloid leukemia. *Am J Hematol* 2001; 68: 23-31.
48. Ramos F, Fernández-Ferrero S, Suárez D *et al.* Myelodysplastic syndromes search for minimal diagnostic criteria. *Leuk Res* 1999; 23: 283-290.
49. Ribeiro E, Lima CSP, Metze K, Lorand-Metze I. Flow cytometric analysis of the expression of fas/fasL in bone marrow CD34+ cells in myelodysplastic syndromes: relation to disease progression. *Leuk & Lymphoma* 2004; 45: 309-313.
50. Ribeiro FSN, Wunsch FV. Avaliação retrospectiva da exposição ocupacional a cancerígenos: abordagem epidemiológica e aplicação em vigilância em saúde. *Cad. Saúde Pública [S. l.]* 2004; 20 (4): 881-890.
51. Romeo M, Chauffaille ML, Silva MRR, Bahia DMM, Kerbaui J. Comparison of cytogenetics with FISH in 40 patients. *Leuk Res* 2002; 26: 993-996.
52. Rosenfeld C, List A. A hypothesis for the pathogenesis of myelodysplastic syndromes: implications for new therapies *Leukemia* 2000; 14: 2-8.
53. Sasai Y, Roriike S, Misawa S, Kaneko H, Kobayashi M, Fujii H *et al.* Genotype of glutathione S-transferase and other genetic configurations in myelodysplasia. *Leuk Res* 1999; 23: 975-981.
54. Serio FM. Detecção de perda de heterozigose no gene IRF-1 em pacientes portadores de SMD e LMA. Tese de mestrado, Unifesp/EPM 2002.
55. Shih LY, Huang CF, Wang PN, Wu JH, Lin TL, Dunn P *et al.* Acquisition of FLT3 or N-RAS mutations is frequently associated with progression of MDS to AML. *Leukemia* 2004; 18: 466-475.
56. Solé F, Luño E, Sanzo C, Espinet B, Sanz GF, Cervera J, *et al.* Identification of novel cytogenetics markers with prognostic significance in a series of 968 patients with primary myelodysplastic syndrome. *Haematologica* 2005; 90: 1168-1178.
57. Steensma DP, Bennett JM. The myelodysplastic syndrome: diagnosis and treatment. *Best Practice Res Clin Hematol* 2004; 17 (4): 543-557.

58. Stirewalt D, Radich JP. The role of FLT3 in haematopoietic malignancies. *Nature Rev* 2003; 3: 650-666.
59. Yunis JJ, Lobel M, Arnesen MA, *et al.* Refined chromosome study helps define prognostic subgroups in most patients with primary myelodysplastic syndrome and acute myelogenous leukaemia. *Br J Haematol* 1988; 68: 189-194.
60. Verma, R.S e Babu, A. *Human chromosomes Principles and Techniques*. Second edition Inc. MacGraw-Hill 1995; 419.
61. Wells RA. Na updape on myelodysplastic syndrome. *Geriatrics & Aging* 2003; 6: 29-32.
62. White AD, Culligan DJ, Hoy TG, *et al.* Extended cytogenetic follow-up of patients with myelodysplastic syndrome (MDS). *Br J Haematol* 1992; 81: 499-502.

8. ANEXOS

8.1 – Anexo I. Termo de consentimento livre e esclarecido.

UNIVERSIDADE CATÓLICA DE GOIÁS
Pró-Reitoria de Pós-Graduação e Pesquisa
Departamento de Biologia - Mestrado em Genética

Termo de consentimento livre e esclarecido

Você está sendo convidado (a) a participar, como voluntário, em uma pesquisa científica. Após ser esclarecido (a), pelo responsável da pesquisa, sobre as informações a seguir e caso aceite fazer parte do estudo, assine ao final deste documento. Você deverá assinar duas vias, uma delas é sua e a outra é do pesquisador responsável. Em caso de dúvida sobre a pesquisa, você poderá entrar em contato com o pesquisador responsável, **Cristiano Luiz Ribeiro**, nos telefones 3201 1443 ou 84612665, ou no momento da entrega do termo de consentimento livre e esclarecido. Em caso de dúvidas sobre os seus direitos como participante nesta pesquisa, você poderá entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Goiás telefone: 3254 4161.

Informações importantes que você deve saber sobre a pesquisa:

Título do Projeto: Importância do diagnóstico citogenético convencional como fator prognóstico na síndrome mielodisplásica.

Responsável pela Pesquisa: Cristiano Luiz Ribeiro, Esp.

Coordenador Geral: Dr. Aparecido Divino da Cruz, PhD.

Co-Orientador: Cláudio Carlos da Silva, MsC.

Telefone para Contato: 3201 1443 ou 84612665 (Cristiano Luiz Ribeiro)

O estudo tem como objetivo avaliar as alterações genéticas em pacientes com indicação clínica para síndrome mielodisplásica, incluindo somente os casos com diagnóstico confirmado, buscando correlacionar os achados genéticos com o diagnóstico, acompanhamento e escolha terapêutica, permitindo que os médicos tenham um melhor entendimento sobre a doença.

O Serviço de Hematologia do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Goiás, realizará as coletas de medula óssea e/ou sangue periférico para o estudo morfológico e/ou imunofenotípico destas amostras, logo serão retirados 2,0 mL para o presente estudo. Não haverá risco para você, apenas um desconforto no momento da coleta, pois a coleta será feita por profissionais do setor de hematologia com todos os recursos necessários e este procedimento já faz parte da rotina para fazer o diagnóstico da doença, portanto a coleta não será realizada apenas para a pesquisa genética.

Você não terá nenhuma despesa ao concordar em participar do projeto e não haverá nenhum tipo de pagamento ou gratificação financeira pela participação, ela é voluntária. Os seus dados pessoais serão mantidos em absoluto sigilo. Os resultados obtidos serão utilizados somente nesta pesquisa, se publicada em revistas e jornais especializados, igualmente será guardado sigilo.

O presente estudo deverá ser concluído até o mês de março de 2009.

A equipe médica do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Goiás assegurará o tratamento adequado de todos os pacientes, independente destes optarem por participar ou não no estudo. Você terá liberdade de recusar ou retirar o consentimento sem penalização ou perda do tratamento habitual.

Declaração de Consentimento

Eu,-----, RG/CPF-----,
declaro ter lido os Termos Desse Consentimento Livre e Esclarecido, ter entendido as informações contidas nesse documento, cuja cópia fica em meu poder. Declaro, ainda, que fui devidamente informado e esclarecido pelo pesquisador-----
----- sobre a pesquisa, os procedimentos nela envolvidos, assim como os possíveis riscos e benefícios decorrentes de minha participação. Foi-me garantido que posso retirar meu consentimento a qualquer momento, sem que isto leve a qualquer penalidade ou prejuízo no tratamento e acompanhamento médico.

Local e data:-----

Assinatura:-----

Assinatura Datiloscopia (Quando necessário)

Assinatura do Pesquisador Responsável:-----

Presenciamos a solicitação de consentimento, esclarecimento sobre a pesquisa e aceite de sujeito em participar.

Testemunhas:

Nome:----- Assinatura-----

Nome:----- Assinatura-----

8.2 – Anexo II. Termo de consentimento livre e esclarecido para menores.

UNIVERSIDADE CATÓLICA DE GOIÁS
Pró-Reitoria de Pós-Graduação e Pesquisa
Departamento de Biologia - Mestrado em Genética

Termo de consentimento livre e esclarecido para menores de idade

Seu filho (a) está sendo convidado (a) a participar, como voluntário, em uma pesquisa científica. Após ser esclarecido (a), pelo responsável da pesquisa, sobre as informações a seguir e caso aceite fazer parte do estudo, assine ao final deste documento. Você deverá assinar duas vias, uma delas é sua e a outra é do pesquisador responsável. Em caso de dúvida sobre a pesquisa, você poderá entrar em contato com o pesquisador responsável, **Cristiano Luiz Ribeiro**, nos telefones 3201 1443 ou 84612665, ou no momento da entrega do termo de consentimento livre e esclarecido. Em caso de dúvidas sobre os seus direitos como participante nesta pesquisa, você poderá entrar em contato com o comitê de Ética em Pesquisa do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Goiás telefone: 3254 4161.

Informações importantes que você deve saber sobre a pesquisa:

Título do Projeto: Importância do diagnóstico citogenético convencional como fator prognóstico na síndrome mielodisplásica.

Responsável pela Pesquisa: Cristiano Luiz Ribeiro, Esp.

Coordenador Geral: Dr. Aparecido Divino da Cruz, PhD.

Co-Orientador: Cláudio Carlos da Silva, MsC.

Telefone para Contato: 3201 1443 ou 84612665 (Cristiano Luiz Ribeiro)

O estudo tem como objetivo avaliar as alterações genéticas em pacientes com indicação clínica para síndrome mielodisplásica, incluindo somente os casos com diagnóstico confirmado, buscando correlacionar os achados genéticos com o diagnóstico, acompanhamento e escolha terapêutica, permitindo que os médicos tenham um melhor entendimento sobre a doença.

O Serviço de Hematologia do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Goiás realizará as coletas de medula óssea e/ou sangue periférico para o estudo morfológico e/ou imunofenotípico destas amostras, logo serão retirados 2,0 mL para o presente estudo. Não haverá risco para seu filho, apenas um desconforto no momento da coleta, pois a coleta será feita por profissionais do setor de hematologia com todos os recursos necessários e este procedimento já faz parte da rotina para fazer o diagnóstico da doença, portanto a coleta não será realizada apenas para a pesquisa genética.

Você e seu filho não terão nenhuma despesa ao concordar em participar do projeto e não haverá nenhum tipo de pagamento ou gratificação financeira pela participação, ela é voluntária. Os dados pessoais de cada voluntário serão mantidos em absoluto sigilo. Os resultados obtidos serão utilizados somente nesta pesquisa, se publicada em revistas e jornais especializados, igualmente será guardado sigilo.

O presente estudo deverá ser concluído até o mês de março de 2009.

A equipe médica do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Goiás assegurará o tratamento adequado de todos os pacientes, independente destes optarem por participar ou não no estudo. Os participantes da pesquisa terão liberdade de recusar ou retirar o consentimento sem penalização ou perda do tratamento habitual.

Declaração de Consentimento

Eu,-----, RG/CPF-----,
declaro ter lido os Termos Desse Consentimento Livre e Esclarecido, ter entendido as informações contidas nesse documento, cuja cópia fica em meu poder. Declaro, ainda, que estou de acordo que meu filho (a) participe do estudo que me foi apresentado. Fui devidamente informado e esclarecido pelo pesquisador----- sobre a pesquisa, os procedimentos nela envolvidos, assim como os possíveis riscos e benefícios decorrentes de minha participação. Foi-me garantido que posso retirar meu consentimento a qualquer momento, sem que isto leve a qualquer penalidade ou prejuízo no tratamento e acompanhamento médico.

Local e data:- -----

Assinatura do responsável (pais, tutor)-----

Assinatura:- -----

Assinatura Datiloscopia (Quando necessário)

Assinatura do Pesquisador Responsável:- -----

Presenciamos a solicitação de consentimento, esclarecimento sobre a pesquisa e aceite de sujeito em participar.

Testemunhas:

Nome:- ----- Assinatura-----

Nome:- ----- Assinatura-----