



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

**CINTHYA CAVALCANTE DE ANDRADE**

**ANÁLISE DE EXPRESSÃO DOS GENES DE CONTROLE DO CICLO CELULAR E  
FUSO MITÓTICO COMO POSSÍVEIS BIOMARCADORES DE RESPOSTA AO  
TRATAMENTO COM ERITROPOETINA EM PACIENTES COM SÍNDROME  
MIELODISPLÁSICA**

**ORIENTADOR: Prof. Dr. Ronald Feitosa Pinheiro**

**FORTALEZA**

**2018**

CINTHYA CAVALCANTE DE ANDRADE

**ANÁLISE DE EXPRESSÃO DOS GENES DE CONTROLE DO CICLO CELULAR E  
FUSO MITÓTICO COMO POSSÍVEIS BIOMARCADORES DE RESPOSTA AO  
TRATAMENTO COM ERITROPOETINA EM PACIENTES COM SÍNDROME  
MIELODISPLÁSICA**

Dissertação apresentada ao curso de Mestrado Acadêmico em Patologia, do Departamento de Patologia e Medicina Legal, na Faculdade de Medicina, na Universidade Federal do Ceará, como requisito para obtenção de título de mestre.

**Orientador:** Prof. Dr. Ronald Feitosa Pinheiro

**FORTALEZA**

**2018**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação  
Universidade Federal do Ceará  
Biblioteca Universitária  
Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

---

A566a Andrade, Cinthya Cavalcante de.  
ANÁLISE DE EXPRESSÃO DOS GENES DE CONTROLE DO CICLO CELULAR E FUSO  
MITÓTICO COMO POSSÍVEIS BIOMARCADORES DE RESPOSTA AO TRATAMENTO COM  
ERITROPOETINA EM PACIENTES COM SÍNDROME MIELODISPLÁSICA / Cinthya Cavalcante de  
Andrade. – 2018.  
81 f. : il. color.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-  
Graduação em Patologia, Fortaleza, 2018.

Orientação: Prof. Dr. Ronald Feitosa Pinheiro.

Coorientação: Prof. Dr. Howard Lopes Ribeiro Junior.

1. Síndrome mielodisplásica. 2. expressão gênica. 3. biomarcadores. 4. Cutoff Finder. 5. resposta a  
tratamento. I. Título.

---

CDD 571.9

CINTHYA CAVALCANTE DE ANDRADE

**BANCA EXAMINADORA**

---

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

---

**Profa. Dra. Silvia Maria Meira Magalhães**  
Universidade Federal do Ceará - UFC

---

**Prof. Dr. Manoel Ricardo Alves Martins**  
Universidade Federal do Ceará - UFC

---

**Prof. Dr. Marcos Roberto Lourenzoni**  
Fundação Osvaldo Cruz - FIOCRUZ

*Aos Meus Filhos:  
João Vítor e Pedro Henrique*

*“A tarefa não é tanto ver aquilo que ninguém viu, mas pensar o que ninguém ainda pensou sobre aquilo que todo mundo vê.”*

(Arthur Schopenhauer)

*“Eu sou de uma terra que o povo padece mas não esmorece e procura vencer”*

(Patativa do Assaré)

## AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Jonas (in memoriam) e Ilzete por terem cuidado de mim e me deixado como herança as virtudes da honestidade, lealdade e de acreditar que a força do trabalho pode render bons frutos, além de todo o esforço em me dar educação e investir no meu futuro.

Aos meus filhos João Victor e Pedro Henrique por estarem comigo, por serem motivo da minha persistência diária, por serem inspiração para mim, pela honestidade, bom caráter e solidariedade que lhes é peculiar. E acima de tudo por terem entendido minhas ausências e os momentos que não disponibilizei para brincar, conversar e falar “besteira”...

As meus irmãos Liliane e Jonas por me motivarem, acreditarem em mim e me ensinarem a enxergar mais longe...., além de terem compreendido minhas ausências.

Ao amigo Lus Mário que desde muito tempo colocou uma pequena brasa nas minhas motivações em fazer mais do mesmo. Surtiu efeito.

À amiga-irmã que a vida me deu: Germana (bunita). Começamos juntas, seguimos separadas, mas temos um lugar especial no dia a dia uma da outra e na vida uma da outra.

Ao meu ORIENTADOR Prof. Dr. Ronald Feitosa Pinheiro por ter oportunizado minha caminhada, ter confiado e ter me visto como parte de sua equipe, além dos estímulos bem peculiares que me ensinaram a pensar e ser diferente. Fora mediocridade!

Ao meu “ CO-ORIENTADOR” e amigo Howard Lopes, que desde sempre se disponibilizou em ajudar, colaborar e me ensinar a crescer na pesquisa, na escrita, no raciocínio científico, além de me motivar durante a caminhada. Obrigada pela paciência.

A toda a equipe do Laboratório de Citogenômica do Câncer: Roberta, Daniela, Marília, Izabele, Kézia, Mayumi, Bruna, Wesley, Gabriel, Rinna, Bruna, Mayara, Manu, Ana Célia e Luis Ivando pela torcida desde o início, apoio, estímulo e palavras encorajadoras.

Aos meus colegas de sala de aula da pós graduação (braseiro), em especial à amiga Issis que sempre foi grande parceira durante todo o mestrado e ao grande amigo e exemplo, também colega, Roberto Feitosa, médico de todos e de um coração maior que ele próprio.

**À DEUS** porque antes de tudo ELE era, ELE é e SEMPRE será Deus (começo, meio e fim). Toda a nossa vida e nossos dias estão sob o seu governo e somos sustentados pela graça e por seu amor, que nos faz abrir os olhos todos os dias e seguir em frente!

## RESUMO

As síndromes mielodisplásicas (SMD) são doenças clonais heterogêneas que estão associadas á citopenias no sangue periférico, hematopoese ineficaz, medula óssea hiperclular com displasia morfológicamente definida em uma ou mais linhagens além do aumento do risco de progressão para leucemia mielóide aguda (LMA). O tratamento com agentes estimuladores eritróides, tal como o uso da Eritropoetina (EPO), é considerado como primeira linha na maioria das anemias na SMD. Tem sido demonstrado que alterações na expressão das proteínas relacionadas ao fuso mitótico (*AURORA A*, *AURORA B* e *TPX2*), ao ponto de checagem mitótico (*CDC20* e *MAD2*) e aos genes reguladores do ciclo celular (*CDKN1A*) estão envolvidas na instabilidade cromossômica e aneuploidias em diversos tumores. Este estudo tem como objetivo avaliar o perfil de expressão destes genes e sua associação com as variáveis clínico-laboratoriais, referentes à resposta ao tratamento com EPO em pacientes com SMD, no intuito de identificar novos possíveis biomarcadores de resposta ao tratamento. A análise da expressão gênica foi realizada (*Real Time-PCR*) a partir de dados provenientes do banco de expressão de genes do laboratório de Citogenômica do Câncer oriundos de 43 pacientes com SMD que fizeram uso de EPO. Inicialmente, identificou-se que a expressão dos genes *AURKA* ( $p=0.013$ ) e *AURKB* ( $p=0.021$ ) estava aumentada nos pacientes que responderam ao tratamento com EPO quando comparados aos pacientes que não responderam. Posteriormente, para avaliar o perfil de expressão, foi utilizado o software *Cutoff Finder* para definição dos pontos de corte e estratificação dos pacientes quanto à resposta ao tratamento com EPO. Baseando-se no gráfico de waterfall plot, foi identificado que os genes *AURKA* ( $p=0,023$ ;  $OR=4,0$ ) e *AURKB* ( $p=0,02$ ;  $OR=6,5$ ) apresentam uma importante associação entre o seu perfil de expressão gênica e a resposta ao tratamento com EPO. A partir destas análises, os pacientes foram estratificados frente ao aumento/diminuição de sua expressão e quanto à resposta ou não ao tratamento com EPO. Na avaliação pelo teste do qui-quadrado, seguido pela análise de regressão logística multinomial, verificou-se que o aumento de expressão de *AURKA* ( $OR=4,000$ ;  $p=0,064$ ) e *AURKB* ( $OR=6,500$ ;  $p=0,027$ ) estão associados a um aumento de chances do paciente responder à EPO em nosso estudo. Quanto à avaliação das variáveis clínico-laboratoriais, para o gene *AURKA*, observou-se que o aumento de sua expressão está associado a um aumento de chance do paciente apresentar uma citopenia periférica ( $OR=4,889$ ;  $p=0,037$ ), cariótipo normal ( $OR=1,114$ ;  $p=0,028$ ), não ser dependente transfusional ( $OR= 4,533$ ;  $p=0,031$ ). Para os demais genes (*MAD2*, *TPX2*, *CDC20* e *CKN1A*) não foram encontradas associações significativas entre o perfil de expressão e resposta ao tratamento ( $p>0,05$ ). Estes resultados, sugerem que a *AURKA* e *AURKB* podem ser consideradas como possíveis marcadores de resposta ao tratamento com Eritropoetina em pacientes com SMD.

**Palavras chave:** Síndrome mielodisplásica; expressão gênica; biomarcadores; Cutoff Finder; resposta a tratamento.

## ABSTRACT

The myelodysplastic syndromes (MDS) are heterogeneous clonal diseases that are associated with cytopenias in peripheral blood, ineffective hematopoiesis, bone marrow hyperplastic disease with morphologically defined dysplasia in one or more lineages in addition to increased risk of progression to acute myeloid leukemia (AML). Treatment with erythroid stimulatory agents, such as erythropoietin (EPO), is considered the first line in most MDS anemias. It has been shown that changes in the expression of proteins related to the mitotic spindle (AURORA A, AURORA B and TPX2), mitotic checkpoint (CDC20 and MAD2) and cell cycle regulator genes (CDKN1A) are involved in chromosomal instability and aneuploidies in several tumors. This study aims to evaluate the expression profile of these genes and its association with laboratory clinical variables, regarding the response to the treatment with of patients with MDS, in order to identify new possible biomarkers of response to the treatment. Gene expression analysis was performed (Real Time-PCR) based on data from the gene expression database of the Cancer Cytogenomics laboratory from 43 MDS patients who used EPO. Initially, it was identified that the expression of the AURKA ( $p = 0.013$ ) and AURKB ( $p = 0.021$ ) were increased in patients who responded to EPO treatment when compared to patients who did not respond. Afterwards, to evaluate the expression profile, the Cutoff Finder software was used to define cutoff points and stratification of patients regarding the response to EPO treatment. Based on the waterfall plot graph, the AURKA ( $p = 0.023$ , OR = 4.0) and AURKB ( $p = 0.02$ ; OR = 6.5) genes were found to have an important association between their gene expression profile and response to EPO treatment. From these analyses, the patients were stratified in face of the increase / decrease of their expression and regarding the responsiveness or not to the treatment with EPO. in the assessment through the chi-square test, followed by multinomial logistic regression analysis, it was found that the increase in expression of AURKA (OR = 4,000,  $p = 0.064$ ) and AURKB (OR = 6,500;  $p = 0.027$ ) were associated with an increase in the patient's chances of responding to EPO. As for the evaluation of the clinical-laboratory variables, for the AURKA gene, it was observed that the increase in its expression is associated with an increased chance of the patient having a peripheral cytopenia (OR = 4.889,  $p = 0.037$ ), normal karyotype = 1.114,  $p = 0.028$ ), does not be transfusional dependent (OR = 4.533,  $p = 0.031$ ). For the other genes (MAD2, TPX2, CDC20 and CKN1A, no significant associations were found between expression profile and response to treatment ( $p > 0.05$ ). These results suggest that AURKA and AURKB can be considered as possible markers of response to treatment with Erythropoietin in patients with MDS.

**Keywords:** Myelodysplastic syndrome; Gene expression; biomarkers; Cutoff Finder; Response to treatment.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Algoritmo de tratamento adaptado ao risco para tratamento da SMD.....	20
Figura 2: Estrutura primária da r HuEPO (Eritropoetina humana recombinante).....	24
Figura 3: Processo de segregação cromossômica.....	28
Figura 4: Funcionamento do ponto de controle de montagem do fuso (SAC).....	29
Figura 5: Ativação de <i>AURKA</i> por <i>TPX2</i> .....	34
Figura 6: Apresentação do Software Cutoff Finder® ( página da web).....	38
Figura 7: Representação esquemática do desenho do estudo .....	39
Figura 8: Nível de expressão do gene <i>AURKA</i> em pacientes com SMD quanto à resposta ao tratamento com EPO.....	49
Figura 9: Estratificação dos casos de acordo com o perfil de expressão do gene <i>AURKA</i> e o respectivo <i>cutoff point</i> , identificado pela linha vermelha no histograma. ....	50
Figura 10: Análise de associação entre o perfil de expressão do gene <i>AURKA</i> e a resposta ao tratamento com EPO no paciente com SMD, de acordo com o <i>cutoff point</i> . ....	50
Figura 11: Resposta a EPO em pacientes com SMD em relação a <i>AURKA</i> . ....	52
Figura 12: Nível de expressão do gene <i>AURKB</i> em pacientes com SMD quanto à resposta ao tratamento com EPO.....	55
Figura 13: Estratificação dos casos de acordo com o perfil de expressão do gene <i>AURKB</i> e o respectivo <i>cutoff point</i> , identificado pela linha vermelha no histograma.....	56
Figura 14: Análise de associação entre o perfil de expressão do gene <i>AURKB</i> e a resposta ao tratamento com EPO no paciente com SMD, de acordo com o <i>cutoff point</i> . ....	56
Figura 15: Associação entre a expressão de <i>AURKB</i> e resposta à EPO.....	58
Figura 16: Análise de associação entre os perfis de expressões do gene <i>CDKN1A</i> e a resposta ao tratamento com EPO no paciente com SMD, de acordo com o <i>cutoff point</i> .....	61
Figura 17: Análise de associação entre os perfis de expressões do gene <i>TPX2</i> e a resposta ao tratamento com EPO no paciente com SMD, de acordo com o <i>cutoff point</i> . ....	62
Figura 18: Análise de associação entre os perfis de expressões do gene <i>MAD2</i> e a resposta ao tratamento com EPO no paciente com SMD, de acordo com o <i>cutoff point</i> .....	62
Figura 19: Análise de associação entre os perfis de expressões do gene <i>CDC20</i> e a resposta ao tratamento com EPO no paciente com SMD, de acordo com o <i>cutoff point</i> . ....	63

## LISTA DE TABELAS

Quadro 1: Classificação da SMD segundo os critérios da OMS de 2008. ....	13
Quadro 2: Classificação da SMD segundo os critérios da OMS de 2016. ....	14
Quadro 3: Variáveis estabelecidas pelo IPSS (1997) .....	16
Quadro 4: Descrição das categorias citogenéticas conforme classificação prognóstica do IPSS-R .....	17
Quadro 5: Categorias de risco e valores prognósticos estabelecidas no IPSS-R.....	17
Quadro 6: Critérios de resposta ao tratamento com Eritropoetina.....	26
Tabela 1:Descrição das variáveis clínico laboratoriais analisadas no estudo frente à resposta ao tratamento com EPO.....	45
Tabela 2: Caracterização dos <i>cutoffs</i> na análise de associação entre os níveis de expressão dos genes <i>AURKA</i> , <i>AURKB</i> , <i>TPX2</i> , <i>MAD2</i> , <i>CDC20</i> e <i>CDKN1A(p21)</i> e pacientes com SMD que fizeram uso de EPO.....	47
Tabela 3: Identificação da razão de chances da associação entre o perfil de expressão do gene <i>AURKA</i> e a resposta ao tratamento com EPO no paciente com SMD, de acordo com o <i>cutoff</i> <i>point</i> .....	51
Tabela 4: Associação entre a expressão do gene <i>AURKA</i> , estratificado de acordo com o <i>cutoff point</i> , e as variáveis clínico-laboratoriais dos pacientes com SMD.....	53
Tabela 5: Identificação da razão de chances da associação entre o perfil de expressão do gene <i>AURKB</i> e a resposta ao tratamento com EPO no paciente com SMD, de acordo com o <i>cutoff point</i> .....	57
Tabela 6:Associação entre a expressão do gene <i>AURKB</i> , estratificado de acordo com o <i>cutoff</i> <i>point</i> , e as variáveis clínico-laboratoriais dos pacientes com SMD.....	59
Tabela 1: Níveis de expressão dos genes <i>CDKN1A</i> , <i>TPX2</i> , <i>MAD2</i> e <i>CDC20</i> em pacientes com SMD quanto a resposta ao tratamento com EPO.....	61

## LISTA DE ABREVIATURAS

ANC	<i>Contagem Absoluta de Neutrófilos</i>
AR	<i>Anemia Refratária</i>
AREB	<i>Anemia Refratária com Excesso de Blastos</i>
AREB-T	<i>Anemia Refratária com Excesso de Blastos em Transformação</i>
ARSA	<i>Anemia Refratária com Sideroblastos em Anel</i>
AURKA	<i>Aurora Kinase A</i>
AURKB	<i>Aurora Kinase B</i>
BUB1	<i>Budding uninhibited by benzimidazoles</i>
CCM	<i>Complexo de Controle Mitótico</i>
CDC20	<i>Cell division cycle 20</i>
CDKN1A (p21)	<i>Inibidor da quinase dependente de ciclina</i>
CPA	<i>Complexo Promotor da Anáfase</i>
Cq	<i>Ciclo threshold</i>
CRDM	<i>Citopenia Refratária com Displasia em Múltiplas Linhagem</i>
CRDU	<i>Citopenia Refratária com Displasia em Única Linhagem</i>
DNA	<i>Ácido Desoxirribonucleico</i>
EPO	<i>Eritropoetina</i>
ESA	<i>Erythropoiesis stimulating agents (agents estimuladores da eritropoiese)</i>
FAB	<i>Franco-Americano-Britânico</i>
G-CSF	<i>Fator estimulador de colônia de granulócitos</i>
Hb	<i>Hemoglobina</i>
IC	<i>Intervalo de confiança</i>
IPSS	<i>Sistema Internacional de Escore prognóstico</i>
IPSS-R	<i>Sistema Internacional de Escore prognóstico revisado</i>
LMA	<i>Leucemia Mielóide Aguda</i>
LMMC	<i>Leucemia Mielomonocítica Crônica</i>
MAD2	<i>Mitotic arrest defective type 2</i>
MO	<i>Medula Óssea</i>
NR	<i>Neutropenia Refratária</i>
OMS	<i>Organização Mundial de Saúde</i>

OR	<i>Odds Ratio</i>
qPCR	<i>PCR quantitativa em tempo real</i>
p53	<i>Proteína 53</i>
rHuEPO	<i>Eritropoetina humana recombinante</i>
SAC	<i>Ponto de controle de montagem de fuso</i>
SEERS	<i>Surveillance, Epidemiology and End Results</i>
sEPO	<i>Eritropoetina sérica</i>
SF3B1	<i>Splicing Factor 3b Subunit 1</i>
SMD	<i>Síndrome Mielodisplásica</i>
SMD EB	<i>Síndrome Mielodisplásica com excesso de blastos</i>
SMD-AS-DU	<i>Síndrome Mielodisplásica com displasia em única linhagem</i>
SMD-DM	<i>Síndrome Mielodisplásica com displasia em múltiplas linhagens</i>
SMD-i	<i>Síndrome Mielodisplásica inclassificável</i>
SMD-SA	<i>Síndrome Mielodisplásica com sideroblastos em anel</i>
TCTH	<i>Transplante de células tronco hematopoiéticas</i>
TPX2	<i>Xenopus kinesin-like protein 2</i>
t-SMD	<i>SMD relacionada à terapia</i>
WPSS	<i>Índice de Escore Prognóstico baseado na classificação da OMS</i>

## SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	10
1.1	ASPECTOS GERAIS DA SÍNDROME MIELODISPLÁSICA (SMD) .....	10
1.2	INCIDÊNCIA DA SMD.....	10
1.3	ETIOLOGIA.....	12
1.4	CLASSIFICAÇÃO CLÍNICA E PROGNÓSTICA DA SMD.....	12
1.4.1	Classificação clínica da SMD.....	12
1.4.2	Classificação prognóstica da SMD.....	15
1.5	PATOGÊNESE DA SMD .....	17
1.6	ABORDAGEM TERAPÊUTICA NA SMD .....	18
1.6.1	Anemia .....	20
1.6.3	Estrutura da Eritropoetina (EPO) .....	23
1.6.4	Resposta a Eritropoetina (EPO).....	25
1.7	EXPRESSÃO GÊNICA .....	27
1.8	CONTROLE E REGULAÇÃO DO CICLO CELULAR.....	27
1.8.1	Genes relacionados ao ponto de checagem mitótica ( <i>MAD2</i> e <i>CDC20</i> ).....	28
1.8.2	Genes relacionado ao fuso mitótico ( <i>AURKA</i> , <i>AURKB</i> e <i>TPX2</i> ) .....	30
2.	OBJETIVOS.....	36
2.1	OBJETIVO GERAL .....	36
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	36
3.	MATERIAIS E MÉTODOS.....	37
3.1.	COLETA DE DADOS.....	37
3.2.	CUTOFF FINDER®: UMA ABORDAGEM PARA A SELEÇÃO DE NOVOS BIOMARCADORES EM SMD.....	37
3.3	DESENHO EXPERIMENTAL .....	39
3.4	VARIÁVEIS CLÍNICO LABORATORIAIS:.....	40
3.5	ASPECTOS ÉTICOS .....	42
4	RESULTADOS .....	43
4.1	CARACTERIZAÇÃO DOS PACIENTES .....	43

4.2 Análise de associação entre o nível de expressão de genes relacionados ao controle do fuso mitótico e do ciclo celular e a resposta ao tratamento com EPO em pacientes com SMD.....	48
5.DISSCUSSÃO.....	64
6.CONCLUSÃO.....	71
REFERÊNCIAS .....	73

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 ASPECTOS GERAIS DA SÍNDROME MIELODISPLÁSICA (SMD)

As síndromes mielodisplásicas (SMD) representam alterações hematopoiéticas clonais heterogêneas pré-malignas que estão associadas às citopenias no sangue periférico, hematopoese ineficaz, medula óssea hiperclular com displasia morfológicamente definida de uma ou mais linhagens e aumento do risco de progressão para leucemia mielóide aguda. (GREENBERG et al., 2012; GREENBERG et al., 2013; MALCOVATI et al., 2011)

A hematopoese ineficaz surge em decorrência de anormalidades na proliferação, maturação e apoptose das células tronco hematopoiéticas, tornando a medula óssea incapaz de produzir e liberar uma quantidade adequada de células maduras no sangue periférico. (YOSHIDA, 2007; HELLSTROM-LINDBERG, 2008)

Com o aumento da susceptibilidade das linhagens progenitoras mieloides clonais ao processo de apoptose e a limitada capacidade de resposta dessas células aos fatores de crescimento, a hematopoese torna-se ineficiente, o que explica a presença das citopenias, ainda que o paciente possua uma medula hiperclular. (TEFFERI, VARDIMAN, 2009; ADES, 2014). Tais citopenias no sangue periférico podem tornar o paciente dependente transfusional e elevar o risco do surgimento de infecções e hemorragias.

Os achados morfológicos da SMD geralmente incluem a medula óssea hiperclular ou normocelular (apenas cerca de 10% dos pacientes apresentam medula hipocelular), displasias, bloqueio de diferenciação e aumento de blastos ou de sideroblastos em anel (YIN et al, 2010; ADES et al, 2014).

Entre as neoplasias, a SMD é uma das mais desafiadoras em relação ao diagnóstico e classificação, devido às variabilidades clínicas dos pacientes ou até mesmo ao comportamento da doença entre pacientes de um mesmo subgrupo (VARDIMAN et al, 2008; BEJAR, 2014)

## 1.2 INCIDÊNCIA DA SMD

A SMD é considerada uma doença de pessoas idosas, em que aproximadamente 80% dos pacientes têm mais de 60 anos ao diagnóstico (BALLEARI et al., 2015) e apenas 5% dos casos de SMD ocorrem em pacientes com menos de 50 anos (CAZZOLA et al. Al., 2011, BALLEARI et al., 2015).

É uma doença rara na infância, sendo observada em menos de 5% dos pacientes diagnosticados com SMD com idade inferior a 14 anos. E nesta população, a doença cursa com bom prognóstico clínico (HASLE, 2003; NIEMEYER, BAUMANN, 2008).

Embora a SMD seja uma doença hematológica comum em indivíduos idosos, a verificação da incidência sofre dificuldades em função das classificações em atualização, da não inclusão nos registros populacionais e da diminuta coleta de medula óssea de idosos para o diagnóstico. Esse cenário compromete os dados epidemiológicos, e por conseguinte, a verificação da incidência da SMD local, visto dificultar a comparação com outras regiões do mundo (GERMING, 2008; STROM, VELEZ-BRAVO, ESTEY, 2008), onde, mesmo com a influência desses fatores, observa-se uma incidência anual de um pouco mais de 25 casos por 100.000 pessoas, e esta proporção aumenta com a idade (HELLSTROM-LINDBERG, 2008).

O primeiro levantamento de SMD no Brasil foi estimado por Magalhães et al. (2010). Neste estudo, foi apresentado o Registro Brasileiro de Síndromes Mielodisplásicas - Aspectos demográficos, clínico-patológicos e terapêuticos em centros de atenção terciária, elaborado com base em estudo realizado com 476 pacientes com SMD em tratamento em 12 centros das regiões Nordeste, Sudeste, Sul e Centro-Oeste do Brasil, diagnosticados no período de 1º de janeiro de 2003 a 31 de dezembro de 2007 (MAGALHÃES et al., 2010). Um dos principais pontos abordados mostrou que a idade mediana do diagnóstico dos pacientes com SMD foi de 68,3 anos, número menor que observado nos EUA e Europa, mas muito similar a Japão e Coreia. Destes, 50,8% eram mulheres e 86,6% residentes em zona urbana (MAGALHÃES et al., 2010).

Destaca-se, atualmente, o estudo de Belli et al (2015), como o mais atual perfil epidemiológico de SMD na América do Sul, incluindo o Brasil. Nesse estudo, retrospectivamente, foram avaliados um total de 1.080 pacientes, sendo destes 635 argentinos, 345 brasileiros e 100 chilenos (BELLI, et al., 2015). Em relação aos achados brasileiros, Belli et al (2015) destacam que, na população avaliada, houve predomínio de pacientes do sexo masculino (193/345, razão de 1:3), com média de idade de  $65 \pm 17$  anos, com prevalência maior de casos de CRDM (105/345), seguidos de casos de AREB em 89 casos (BELLI et al., 2015). Coincidentemente, os principais achados, frente as observações do índice prognóstico (IPSS-R) dos pacientes com SMD, mostraram um predomínio de casos de pacientes com baixo risco (34%), seguidos de pacientes com risco intermediário, em 23% dos casos.

### 1.3 ETIOLOGIA

Quanto à etiologia, a SMD é classificada como primária ou secundária, com base no histórico do paciente. A SMD primária ou *de novo* ocorre sem um evento prévio conhecido de exposição a agentes quimioterápicos e/ou radioterapia (SEKERES, 2010; CHAMSEDDINE et al., 2016), correspondendo a 85 a 90% dos casos e tem como principal fator de risco a idade (ADES et al., 2014; CHAMSEDDINE et al, 2016). Já a SMD secundária ou relacionada com terapia (t-SMD), surge alguns anos após tratamentos agressivos, como quimioterapias e radioterapias (CHAMSEDDINE et al, 2016; ZHR et al, 2016). Sua incidência é de apenas 10 a 15% dos casos, porém, são acompanhadas de complicações mais graves e apresentam pior prognóstico. (ADES et al, 2014; CHAMSEDDINE et al, 2016)

Os estudos epidemiológicos têm identificado diversos fatores de risco, como a exposição a solventes orgânicos, radiação ionizante e o tabagismo (BOWEN et al, 2013; ADES et al, 2014). A exposição a medicamentos citotóxicos está associada a um risco maior de SMD secundária (t-SMD) (ADES et al, 2014; ZHOU et al, 2015).

A associação da SMD com o aumento da idade sugere dano genético causado pela exposição a agentes tóxicos ocupacionais /ambientais (ORAZI E CZADER, 2009). Já em crianças, pode ser secundária a anomalias congênitas, como a anemia de Fanconi e a anemia de Diamond-Blackfan (ADES et al, 2014).

### 1.4 CLASSIFICAÇÃO CLÍNICA E PROGNÓSTICA DA SMD

#### 1.4.1 Classificação clínica da SMD

Com o objetivo de estimar a sobrevida e o risco de transformação para Leucemia Mielóide Aguda (LMA) após o diagnóstico de SMD, vários sistemas de classificação foram desenvolvidos.

A primeira classificação para a SMD foi criada pelo grupo Franco-Americano-Britânico (FAB) que definiu subgrupos da SMD baseados na morfologia e percentual de blastos na medula óssea (30%) (BENNETT et al, 1982).

Em 2001, foi proposta uma nova classificação pela Organização Mundial de Saúde (OMS), que insere várias definições da classificação FAB, incorporando outras características relevantes, como a introdução da citogenética, e redefine o percentual de blastos na medula óssea (MO), delimitando as fronteiras entre a SMD e a LMA, diminuindo de 30% para 20% o

percentual de blastos na medula óssea (JAFJE et al, 2001; VARDIMAN et al, 2002, VARDIMAN et al, 2009; SENENT et al, 2013).

A classificação da OMS retirou o subgrupo AREB em transformação, devido às mudanças no percentual de blastos para a transformação leucêmica, e estratificou o subgrupo AREB em AREB 1 e AREB 2 (VARDIMAN et al, 2009; SENENT et al, 2013). A partir disso, o subgrupo LMMC passa a pertencer a uma nova categoria intermediária entre a SMD e as Síndromes Mieloproliferativas (SMD/SMP) (JAFJE et al, 2001; VARDIMAN et al, 2002; VARDIMAN et al, 2009; SENENT et al, 2013).

Em 2008 foi publicada uma atualização da classificação pela OMS, que divide a SMD em sete subgrupos, tendo como principal modificação, a estratificação do subgrupo Anemia Refratária (AR), agora incluso no subgrupo Citopenia Refratária com Displasia em Única Linhagem (CRDU), que se divide, além da AR, em Neutropenia Refratária (NR) e Trombocitopenia Refratária (TR) (SWERDLOW et al, 2008; VARDIMAN et al, 2009; SENENT et al, 2013) (**Quadro 1**)

**Quadro 1: Classificação da SMD segundo os critérios da OMS de 2008.**

Subtipos da SMD	Sangue Periférico	Medula Óssea
<b>Citopenia Refratária com Displasia em Única Linhagem (CRDU)</b> - Anemia Refratária (AR) - Neutropenia Refratária (NR) - Trombocitopenia Refratária (TR)	<1% de Blastos; Uni ou Bicitopenia	<5% de blastos; Displasia em uma única linhagem
<b>Anemia Refratária com Sideroblastos em Anel (ARSA)</b>	Anemia; ausência de blastos	<5% de blastos; ≥15% Sideroblastos em Anel; Displasia apenas eritróide
<b>Citopenia Refratária com Displasia em Múltiplas Linhagens (CRDM)</b>	<1% de blastos; Citopenia(s); Ausência de bastonetes de Auer	Displasia em 2 ou mais linhagens; <5% de blastos; Ausência de bastonetes de Auer
<b>Anemia Refratária com Excesso de Blastos 1 (AREB 1)</b>	<5% de blastos; Citopenia(s); Ausência de bastonetes de Auer	Displasia em 1 ou mais linhagens; 5-9% de blastos; Ausência de bastonetes de Auer
<b>Anemia Refratária com Excesso de Blastos 2 (AREB 2)</b>	Citopenia(s); 5-19% de blastos; Pode haver Bastonetes de Auer	Displasia em 1 ou mais linhagens; 10-19% de blastos; Presença de bastonetes de Auer
<b>SMD inclassificável (SMD-i)</b>	Citopenia(s); <1% de blastos	Displasia em <10% das células; acompanhada de citogenética sugestiva de SMD; <5% de blastos
<b>SMD com del(5q) isolada</b>	Anemia; contagem de plaquetas normal ou aumentada; <1% de blastos	Presença de del(5q) isolada; Aumento de megacariócitos; <5% de blastos; ausência de Bastonete de Auer

Em 2016, foi realizada uma nova revisão da classificação da OMS, que, apesar dos recentes avanços no estudo molecular da SMD, traz poucas mudanças com relação à classificação de 2008 (STEENSMA, 2016). As principais alterações foram a substituição dos termos “anemia refratária” e “citopenia refratária” por “síndrome mielodisplásica” e a adição da mutação do gene *SF3B1* para definir a porcentagem de sideroblastos em anel no subgrupo, agora intitulado como SMD com sideroblastos em anel (ARBER et al, 2016). **(Quadro 2)**

**Quadro 2: Classificação da SMD segundo os critérios da OMS de 2016.**

Subtipos da SMD	Sangue Periférico	Medula Óssea
<b>SMD com Displasia em Única Linhagem (SMD-DU)</b>	≤1% de Blastos; Uni ou Bicitopenia	Displasia em 1 linhagem; 5%* de Sideroblastos em anel; ≤5% de blastos
<b>SMD com Displasia em Múltiplas Linhagens (SMD-DM)</b>	Citopenia em 1 ou mais linhagens; ≤1% de blastos	Displasia em 2 ou 3 linhagens; 5% de Sideroblastos em anel*; ≤5% de blastos
<b>SMD com Sideroblastos em Anel (SMD-SA)</b> <b>SMD-AS com Displasia em Única Linhagem (SMD-AS-DU)</b>	≤1% de Blastos; Uni ou Bicitopenia	Displasia em 1 linhagem; ≥15% ou ≥5%* de Sideroblastos em anel; ≤5% de blastos
<b>SMD-AS com Displasia em Múltiplas Linhagens (SMD-AS-DM)</b>	Citopenia em 1 ou mais linhagens; ≤1% de blastos	Displasia em 2 ou 3 linhagens; ≥15% ou ≥5%* de Sideroblastos em anel; ≤5% de blastos
<b>SMD com Excesso de Blastos (SMD-EB)</b> <b>SMD com Excesso de Blastos 1 (SMD-EB1)</b>	Citopenia em 1 ou mais linhagens; 2 a 4% de blastos	Displasia em 0,1, 2 ou 3 linhagens; 5 a 9% de blastos
<b>SMD com Excesso de Blastos 2 (SMD-EB2)</b>	Citopenia em 1 ou mais linhagens; 5 a 19% de blastos	Displasia em 0,1, 2 ou 3 linhagens; 10 a 19% de blastos
<b>SMD inclassificável (SMD-i)</b> <b>SMD-i com 1% de blastos</b>	Citopenia em 1 ou mais linhagens; ≤1% de blastos	Displasia em 1 ou mais linhagens; ≤5% de blastos
<b>SMD-i com displasia em única linhagem e pancitopenia</b>	Citopenia em 3 linhagens; ≤1% de blastos	Displasia em 1 linhagem; ≤5% de blastos
<b>SMD-i baseada em alterações citogenéticas</b>	Citopenia em 1 ou mais linhagens; ≤1% de blastos	Ausência de displasias; ≤15% de Sideroblastos em anel; ≤5% de blastos
<b>SMD com del(5q) isolada</b>	≤1% de Blastos; Uni ou Bicitopenia	Displasia em 1 ou mais linhagens; ≤5% de blastos; del(5q) isolada ou com 1 alteração adicional, exceto del(7q)-7

\*Na presença de mutação do gene *SF3B1*. <sup>†</sup>1% de blastos deve ser encontrado em pelo menos duas situações isoladas.

**Fonte:** Adaptado de Arber et al (2016).

### 1.4.2 Classificação prognóstica da SMD

GREENBERG et al., desenvolveram, em 1997, um sistema de escore prognóstico, o International Prognostic Score System – IPSS, posteriormente revisado em 2012.

O Sistema Internacional de Escores Prognósticos (IPSS) é um sistema de classificação baseado em escores prognósticos, um método simples, que utiliza a citogenética, características morfológicas e clínicas para determinar o prognóstico, a categoria de risco de evolução para LMA e estima a sobrevida do paciente (GREENBERG et al, 1997; GREENBERG et al, 2012).

O IPSS de 1997 utilizou no seu estudo 816 pacientes classificados como SMD primária. As variáveis utilizadas foram o número de citopenias periféricas (0/1 e 2/3), a porcentagem de blastos na medula óssea e três grupos de citogenética, favorável (cariótipo normal, del (5q), Del (20q) e –Y), desfavorável (cariótipo complexo e alterações envolvendo o cromossomo 7) e intermediário (demais alterações) (GREENBERG et al, 1997). Cada variável recebe um escore diferente, e a soma dos escores leva à um grupo de risco, sendo eles: baixo risco, intermediário 1 e 2 e alto risco (GREENBERG et al, 1997) (**Quadro 3**).

O IPSS revisado em 2012 (IPSS-R) contou com um maior número de pacientes (7012 pacientes com SMD) de mais centros especializados, dentre eles destaca-se a participação do Brasil, através da pesquisadora Silvia Magalhães, da Universidade Federal do Ceará. Esse aumento possibilitou uma melhor estratificação dos grupos (GREENBERG et al, 2012). As categorias da citogenética aumentaram de três para cinco (Figura 1), a porcentagem de blastos foi melhor estratificada e o número de citopenias foi substituído pelo grau de citopenias nas três linhagens através da estratificação dos valores de hemoglobina (Hb), contagem absoluta de neutrófilos (ANC) e contagem de plaquetas (Figura 2) (GREENBERG et al, 2012). Os grupos de risco também aumentaram de quatro para cinco (Figura 2).

**Quadro 3: Variáveis estabelecidas pelo IPSS (1997)**

Variável	Estratificação de risco / Valor dos escores					
	Baixo	Intermediário I	Intermediário II	Alto		
	0	0.5	1.0	1.5	2.0	≥2.5
<b>Blastos na MO</b>	<5%	5-10%	-	11-20%	21-30%	>30%
<b>Cariótipo*</b>	Bom	Intermediário	Ruim	-	-	-
<b>Citopenia**</b>	0 ou 1	2 ou 3	-	-	-	-
<b>Frequência de Evolução para LMA (%)</b>	19	30	-	33	-	45
<b>Sobrevida média (anos)</b>	<b>5.7</b>	<b>3.5</b>	-	<b>1.2</b>	-	<b>0.4</b>

\* Cariótipo: Bom= normal ou -Y, del(5q), del(20q); Intermediário = outras anormalidades;

Ruim=complexo (3 anormalidades) ou anormalidades do cromossomo 7.

\*\* Citopenias: contagem de neutrófilos < 100.000/ul, hemoglobina < 10 g/dl.

**Fonte:** Adaptado de Greenberg *et al* (1997).

As alterações na estratificação prognóstica dos pacientes com SMD foram 5 em vez de 3 subgrupos citogenéticos de prognóstico com classificações específicas, importância da idade do paciente ao diagnóstico, quantificação de ferritina sérica e lactato desidrogenase como importantes características para a sobrevivência, mas não para a transformação em leucemia mieloide aguda (GREENBERG et al., 2012). O IPSS-R avalia de forma mais precisa o prognóstico do paciente com SMD do que o IPSS inicial (GREENBERG et al., 1997; GREENBERG et al., 2012) (**Quadro 4 e Quadro 5**).

**Quadro 4: Descrição das categorias citogenéticas conforme classificação prognóstica do IPSS-R**

Muito favorável	Favorável	Intermediário	Desfavorável	Muito desfavorável
Única	Normal	Única:	Única:	Complexo:
	Única:	del(7q)	del(3q)	
	del (5q)	+8	-7	
del (11q)	del(12p)	i(17q)	<b>Dupla:</b>	> 3 alterações
- Y	del (20p)	+19	Incl.-7/7q-	
	<b>Dupla:</b>	qualquer outra	<b>Complexo:</b>	
	Incl.del (5q)	<b>Dupla:</b>	3 alterações	
		qualquer outra		

Fonte: Adaptado de Greenberg et al (2012)

**Quadro 5: Categorias de risco e valores prognósticos estabelecidas no IPSS-R**

Variável	Valor dos escores						
	0	0.5	1.0	1.5	2.0	3.0	4.0
<b>Blastos na MO</b>	≤2%	-	>2-<5%	-	5-10%	>10%	-
<b>Cariótipo*</b>	Muito Bom	-	Bom	-	Intermed.	Ruim	Muito Ruim
<b>Hemoglobina</b>	≥10	-	8 – 10	<8	-	-	-
<b>Plaquetas</b>	≥100	50-100	<50	-	-	-	-
<b>ANC</b>	≥0.8	<0.8	-	-	-	-	-
	<b>Estratificação de risco</b>						
	Muito baixo	Baixo	Intermed.	Alto	Muito Alto		
	≤1.5	>1.5 - 3	>3 - 4.5	>4.5 - 6	>6		
<b>Sobrevida (anos)</b>	8.8	5.3	3.0	1.6	0.8		
<b>Média de tempo de Evolução para LMA, 25%, ano</b>	-	10.8	3.2	1.4	0.7		

Fonte: Adaptado de Greenberg et al (2012)

## 1.5 PATOGÊNESE DA SMD

As síndromes mielodisplásicas (SMD) apresentam-se com uma variedade de manifestações clínicas e patológicas, tendo em comum um defeito clonal nas células progenitoras hematopoéticas (stem cells) (VASSALO e MAGALHÃES, 2009). No entanto, a

patogênese da SMD além de complexa, até o momento não está elucidada, sendo ainda pouco compreendida.

Os passos iniciais da patogênese da SMD envolvem danos no DNA nas células tronco hematopoiéticas pluripotentes, o que conduz ao desenvolvimento de um clone mielodisplásico, que apresenta vantagem de proliferação relativamente às outras células hematopoiéticas, caracterizando o perfil de citopenias bastante peculiar da doença.

Nas SMD as citopenias periféricas resultam do aumento da apoptose nas células progenitoras hematopoiéticas (JÄDERSTEN e HELLSTRÖM-LINDBERG, 2008).

O acúmulo gradual desses danos nas células tronco da medula óssea, determina a patogênese e a progressão da SMD (HUNTLY E GILLILAND, 2005; WANG E DICKY 2005; PINHEIRO et al., 2009). Além disso, a patogênese da SMD envolve mecanismos genéticos, epigenéticos e imunomediados.

## **1.6 ABORDAGEM TERAPÊUTICA NA SMD**

A heterogeneidade da SMD dificulta a avaliação da resposta ao tratamento. Os sintomas clínicos das SMD estão relacionados com as citopenias periféricas e são muito semelhantes entre os diferentes subtipos.

Os pacientes apresentam um espectro clínico amplo, que varia desde a ausência de sintomas, onde o diagnóstico é casual, até uma acentuada diminuição da qualidade de vida, provocadas por sintomas associados às citopenias (GERMING,2013).

Os critérios de resposta padronizados são essenciais para avaliar o resultado da terapia, refinar o tratamento de acordo com as características relacionadas ao paciente e à doença, além de possibilitar comparações entre os ensaios clínicos (CHESON,2006). A padronização dos critérios de resposta na SMD foram definidos pelo Grupo de Trabalho Internacional (IWG) em 2000 e revisados em 2006.

Os critérios (segundo IWG 2000) para avaliar a resposta clinicamente significativa no tratamento da SMD são:

1. Medidas de alteração da história natural da doença,
2. Melhoria hematológica
3. Resposta citogenética
4. Melhoria na qualidade de vida relacionada à saúde.

A adoção desses critérios é recomendada tanto para o manejo clínico quanto para o planejamento de ensaios clínicos (MALCOVATI et al.,2013)

A seleção do tratamento para SMD é baseada no risco (International Prognostic Scoring System - IPSS e IPSS -R) de evolução para LMA, na necessidade transfusional, no percentual de blastos na medula óssea, e mais recentemente, na citogenética e nos perfis de mutação (GARCIA-MANERO, 2015).

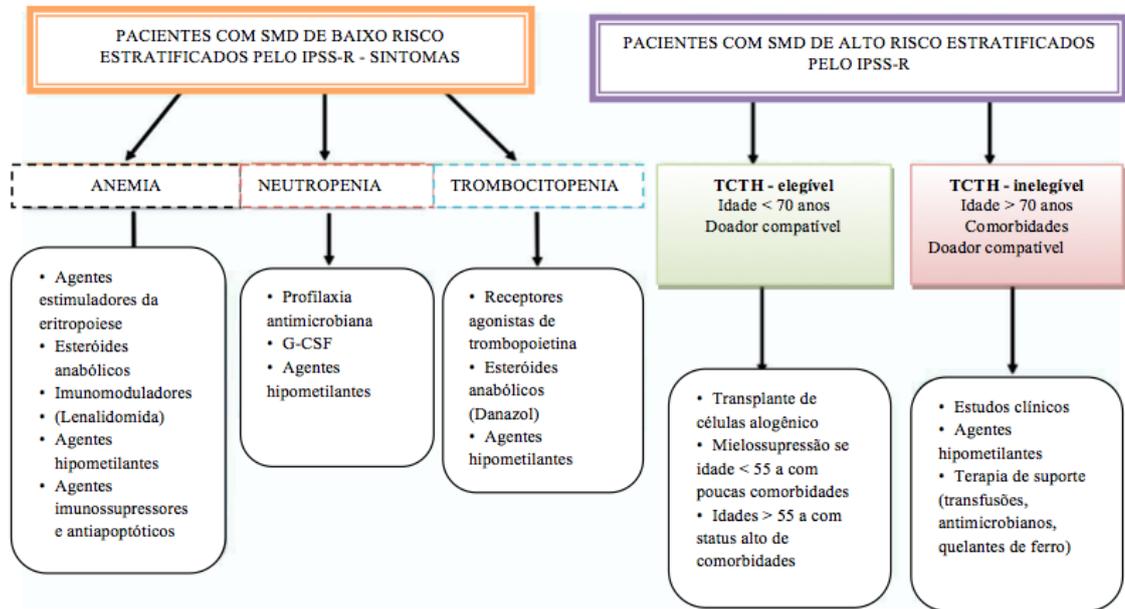
As metas do tratamento são direcionadas para o manejo adequado das citopenias e melhoria da qualidade de vida relacionada à saúde para os pacientes com SMD de baixo risco e alterar a história natural da doença para os pacientes com SMD de alto risco (CHESON et al 2006).

As questões clínicas frequentemente encontradas para o tratar pacientes com SMD incluem:

- Anemia com dependência de transfusão;
- Sobrecarga de ferro (hemossiderose) como consequência das transfusões sanguíneas;
- Aloimunização com refratariedade de transfusão;
- Trombocitopenia ;
- Neutropenia acompanhada de infecções recorrentes;
- Progressão da doença e / ou transformação leucêmica.

As terapias envolvidas incluem fatores de crescimento, lenalidomida, agentes hipometilantes, imunossuppressores, quimioterapias intensivas e transplante de células tronco hematopoiéticas (TCTH) alogênico (GARCIA-MANERO, 2015; GANGAT et al,2016) (Figura 1).

**Figura 1: Algoritmo de tratamento adaptado ao risco para tratamento da SMD**



Fonte: Adaptado de Gangat et al, 2016

A premissa do uso de imunossupressores e talidomida nas síndromes mielodisplásicas demonstra que o sistema imune tem participação na gênese da SMD e que os clones normais e neoplásicos perpassam juntos no início da doença (VELLOSO, 2006). Pressupõe-se que células do clone anormal interagem com o estroma medular e células imunes, levando a uma exacerbada produção de citocinas pró-inflamatórias na medula óssea e esse acúmulo de citocinas acaba por destruir células normais hematopoiéticas, de modo que o clone anormal acaba por se sobressair (VELLOSO, 2006). Desta forma, a ação de agentes imunomoduladores, imunossupressores e antiapoptóticos podem estimular a hematopoese residual e melhorar a pancitopenia. Fatores preditivos para uma boa resposta à terapia imunossupressora envolvem o IPSS baixo ou intermediário 1, idade < 60 anos, MO hipocelular, HLA DR 15 e clone HPN (VELLOSO, 2006)

### 1.6.1 Anemia

A SMD é considerada uma doença de pessoas idosas (BALLEARI et al., 2015) e a ineficiência da hematopoese explica a presença das citopenias, ainda que o paciente possua uma medula hiperplásica (ADES, 2014). Tais citopenias no sangue periférico podem tornar o paciente dependente transfusional e elevar o risco do surgimento de infecções e hemorragias. Conseqüentemente, pacientes com SMD freqüentemente sofrem de anemia sintomática, apresentam infecções recorrentes e episódios hemorrágicos. Sendo a anemia a citopenia

predominante, afeta aproximadamente 80-90% dos pacientes com SMD, dos quais 40% acabarão por se tornar dependentes de transfusão durante o curso da doença (SEASTONE e GERDS, 2015).

A anemia e a dependência transfusional devem constituir grandes problemas para pacientes com SMD e estão associados com a redução da qualidade de vida, menor sobrevida e aumento do risco de transformação para LMA (HELLSTROM e LOOSDRECHT, 2013).

A anemia está associada ao declínio significativo no desempenho físico em idosos e ao pior desfecho em indivíduos com insuficiência cardíaca, afetando assim a sua qualidade de vida (PENNINX et. al., 2003), especialmente em pacientes idosos com SMD (CHESON, 2006).

Segundo a OMS, os valores que definem a anemia referem a hemoglobina de 13 g / dL para homens e 12 g / dL para mulheres. A anemia ocorre em mais de 90% dos pacientes com SMD ao diagnóstico ou durante o curso da doença, evoluindo para a dependência transfusional.

Nenhuma concentração única de hemoglobina pode ser recomendada como sendo o nível ideal abaixo do qual o suporte de células vermelhas deve ser dado. A decisão deve ser baseada nos sintomas e comorbidades do paciente. Como recomendação geral, todos os pacientes com anemia grave (hemoglobina menor que 8 g / dL) e aqueles com anemia leve, mas sintomática, devem receber transfusão de hemácias. (MALCOVATI et al., 2013)

A dependência transfusional está associada ao risco de infecção ou de aloimunização, muito embora sejam baixo risco. Mas em pacientes com anemia crônica (níveis médios de hemoglobina, 10 g / dL), pode ocorrer aumento da morbidade, especialmente como resultado de insuficiência cardíaca, fadiga e baixa qualidade de vida. Além disso, a sobrecarga de ferro resultante da sucessivas transfusões pode ser deletérios para vários órgãos.

### **1.6.2 Tratamento da anemia**

Os agentes estimuladores da eritropoese (ESA) são indicados como primeira linha para pacientes com SMD de baixo risco.

Na prática, esses pacientes devem iniciar o tratamento para anemia com doses fixas dos agentes estimuladores da eritropoese (EPO), em vez de doses ajustadas pelo peso.

As doses ideais de tratamento são 30.000 a 80.000 U da EPO (LATAGLIATA et.al., 2008) e 150 a 300 mg de injeção subcutânea de darbepoetina (SC) por semana. (OLIVA et. Al., 2010)

A Eritropoetina humana recombinante (rHuEPO) pode ser eficaz em pacientes com SMD. Uma meta-análise de mais de 200 pacientes de 17 estudos mostraram que o tratamento

com Eritropoetina humana recombinante como monoterapia, induziram respostas eritróides em cerca de 15% dos pacientes (HELLSTROM et al.,2003). Além disso, a EPO leva à indução da angiogênese, inibição da apoptose e inflamação em tecidos não hematopoéticos (CHATEAUVIEUX et. al.,2011).

A resposta aos ESA é geralmente observada dentro de 12 semanas (SANTINI et. al.,2015). Entretanto, pode ser menor para casos de SMD de baixo risco com del (5q) .(KELAIDI et. al.,2008)

Em estudos mais recentes,esses agentes tem mostrado uma taxa de resposta de 40% a 50% em pacientes com SMD de baixo risco, com uma duração da resposta de aproximadamente 2 anos (SANTINI et al.,2011). O uso da Eritropoetina (EPO) está indicado para pacientes com hemoglobina <10 g / dL e Eritropoetina sérica <500U/l.

Quando uma resposta positiva é obtida, as doses de ESA podem ser ajustadas de maneira a alcançar a menor dose efetiva para manter os níveis de Hb dentro dos parâmetros de normalidade. Assim sendo, uma alta porcentagem de pacientes com SMD de baixo risco responderá ao tratamento com os agentes estimuladores da eritropoese (EPO), com obtenção de maiores taxas de resposta (até 70%), desde que os critérios de seleção sejam seguidos.(SANTINI 2015). Estes critérios definem resposta com base nos níveis de EPO sérica (< 100 U/L), na não dependência transfusional ou na necessidade de apenas 2 U/mês, ter citogenética, e prognóstico de baixo risco ou risco intermediário, conforme o IPSS-R (MOYO et. al.,2008; SANTINI et.al., 2015).

Vale ressaltar que os pacientes dependentes de transfusão têm um maior risco de morte e de progressão para LMA quando comparados aos não dependentes transfusionais, o que sugere que o efeito negativo da dependência é em parte devido a formas mais agressivas da doença. Além disso, os pacientes mostraram maior risco de morte relacionada à falência cardíaca, o que pode ser explicado pelos níveis médios de hemoglobina e a sobrecarga de ferro(HELLSTRÖM e MALCOVATI, 2008).

A sobrecarga de ferro é preocupante entre pacientes com SMD, que recebem 4 unidades ou mais de concentrados de hemácias durante 8 semanas. Cada unidade do concentrado contém de 200-250 mg de ferro, e não há mecanismo para excretar o excesso de ferro. Além disso, os pacientes com SMD tendem a aumentar a absorção de ferro devido á hematopoese ineficaz. (GANGAT, 2015 ; SANTINI,2011). Como resultado, ao longo do tempo, ocorre deposição de ferro no fígado e coração, podendo predispor a cardiomiopatia, arritmias, e morte súbita. Alguns estudos sugeriram redução da sobrevivência (GANGAT,2015)

As mutações somáticas individuais recorrentes (SF3B1, TET2, ASXL1 e DNMT3A) avaliadas em um grupo de pacientes com SMD de baixo risco com anemia não, mostrou impacto na resposta aos ESA. Entretanto, a presença de > 2 mutações foi confirmada como sendo preditivo de menor sobrevida. (BEJAR et. al., 2015 ; KOSMIDER et. al., 2016)

A adição de G-CSF ao tratamento com EPO pode contribuir para o aumento da resposta, especialmente em para os pacientes com ARSA. Entretanto, mais estudos prospectivos randomizados para essa sinergia é escassa. (HELSTROM et. al., 1998)

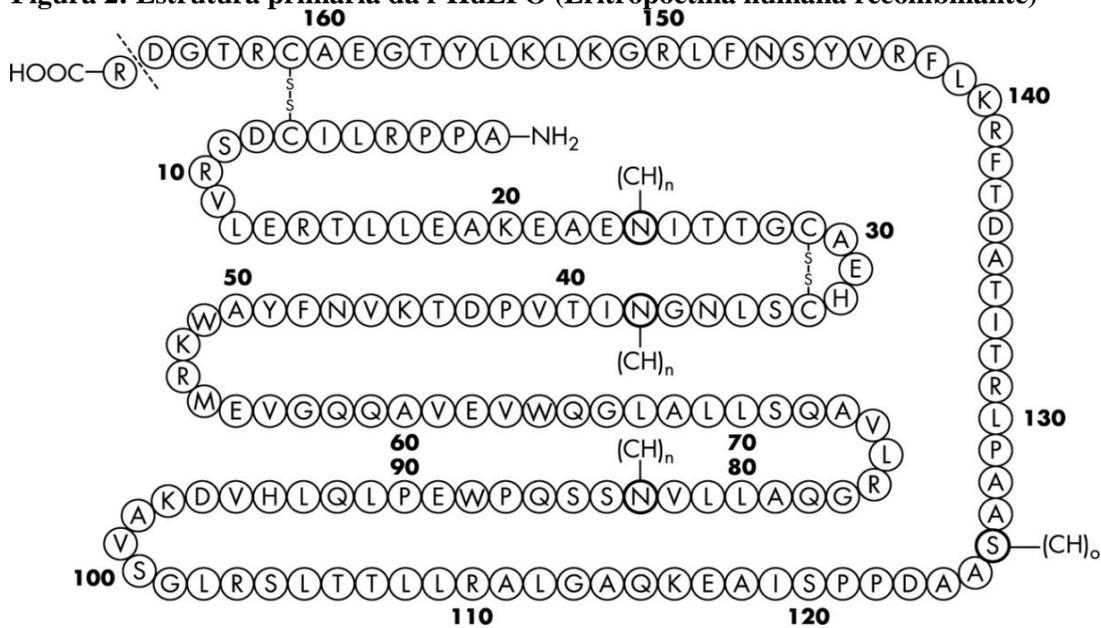
### **1.6.3 Estrutura da Eritropoetina (EPO)**

A EPO é um fator de crescimento hematopoiético, sendo a hipóxia o estímulo primário para a sua síntese. Os níveis da EPO sérica podem se elevar em até centenas de vezes, dependendo da condição hipóxica (HAASE, 2010). Nestas condições, ocorre um aumento da sua expressão e de seu receptor rEPO, em vários tecidos.

A EPO liga-se a moléculas específicas sobre a superfície celular, os receptores de EPO, estes receptores específicos foram identificados apenas em células eritróides humanas e murinas, linhagens celulares eritroleucêmicas, tecido hepático fetal rico em elementos eritróides, em placenta de camundongo e rato, e em megacariócitos (WINTROBE, 1998).

Além de fator de crescimento EPO é um hormônio endógeno glicoproteico com peso molecular de 30,4 Kdalton com aproximadamente metade do seu peso composto de hidratos de carbono. A presença dos hidratos de carbono é importante no controle do metabolismo da eritropoetina. Possui uma cadeia de 165 aminoácidos e duas a quatro cadeias sialiladas. Os resíduos de ácido siálico funcionam como importante sinalizador biológico da eritropoetina para que esta não seja depurada pelo fígado antes de chegar no seu alvo fisiológico (BENTO et al., 2003). A EPO possui ainda quatro cadeias glicosiladas com um importante papel na sua atividade biológica e pode proteger a EPO da degradação por radicais livres de oxigênio. A atividade biológica está relacionada às duas pontes dissulfeto entre caseínas (Figura 2)

**Figura 2: Estrutura primária da r HuEPO (Eritropoetina humana recombinante)**



**Legenda:** (CH) n, local de glicosilação ligado a N em resíduos de aspartil 24, 38, 83; (CH) o, sítio de glicosilação ligado a O em seril resíduo 126. NB: o ARG-166 em o terminal carboxílico é removido antes que a Eritropoetina seja liberada para a circulação.

**Fonte:** adaptado de T Ng et al, 2003.

O gene da eritropoetina está localizado no braço longo do cromossomo 7 e codifica uma cadeia de 193 aminoácidos. Durante a síntese e secreção da EPO, 27 aminoácidos são clivados e uma arginina carboxi-terminal é removida, resultando numa proteína madura de 165 aminoácidos (MAIESE et al., 2008).

No adulto, a EPO é sintetizada basicamente pelo rim, nos fibroblastos peritubulares intersticiais, localizados principalmente no cortex renal e na zona medular externa. O rim é estimulado por condições de hipoxemia a produzir eritropoetina na tentativa de reverter a condição de baixa tensão de oxigênio, aumentando o número de eritrócitos e consequentemente a capacidade de transporte desta molécula (PALIEGE et al., 2010)

Atualmente, a rHuEPO é utilizada no tratamento da anemia em pacientes com doença renal crônica em diálise, em pacientes com AIDS em uso de zidovudina e em pacientes oncológicos em uso de quimioterapia, entre outros.

Hoje, existem diversas formas de agentes eritropoéticos: as epoetinas (alfa, beta, delta, omega) diferem-se nas cadeias glicosiladas, quanto maior o grau de glicosilação maior é o tempo de meia-vida; os agentes Biosimilares; a Darbepoetina alfa; Proteína Eritropoética Sintética (MACDOUGALL, 2007)

Efeitos adversos relacionados ao uso da rHuEPO estão diretamente associados ao aumento da hemoglobina e são mais notáveis com níveis de hemoglobina >12 g/dl, principalmente quando mantidos por algum tempo (FDA, 2013)

Nos pacientes com hipertensão arterial, a rHu-EPO pode elevar significativamente a pressão arterial média com um aumento da viscosidade do sangue, tanto na administração aguda como na continuada, motivo pelo qual o perfil tensional deve ser monitorizado (KANBAY et al.,2007).

Nos pacientes com doença renal crônica ou oncológicos, o tratamento com a rHUEPO está associado a um aumento da morbidade: trombose e eventos cardiovasculares, além do aumento da mortalidade. Os riscos de morte ou eventos cardiovasculares estão relacionados provavelmente, a uma má resposta eritróide inicial, com aumento das doses de agentes estimulantes eritróides para alcançar níveis satisfatórios de hemoglobina (MAIESE et al., 2008).

Em pacientes oncológicos, o uso de rHu-EPO deve ser bem avaliado, pelo possível risco de progressão do tumor, pois tem sido associada ao bloqueio da apoptose de células tumorais, com aumento do tumor e da doença metastática, bem como diminuição dos efeitos da radioterapia, por potencializar a angiogênese tumoral (MAIESE et al., 2005).

#### **1.6.4 Resposta a Eritropoetina (EPO)**

O tratamento de primeira linha para anemia nos pacientes com SMD de baixo risco é a EPO, e os principais fatores pronósticos favoráveis a sua resposta são pacientes não dependentes transfusionais, ou os que necessitam apenas de 2 unidades transfundidas por mês, tendo o nível sérico de EPO de 500 UI/L.( HELLSTROM-LINDBERG et al ,2003).

A resposta a EPO é maior em pacientes não transfundidos com diferença de sobrevida observada que responderam ao tratamento.As principais complicações com esta terapia são tromboembolismo, convulsões e insuficiência cardíaca congestiva, apesar deste último ser um fenômeno raro.(GANGAT,2015) .

A duração mediana da resposta a EPO é de aproximadamente 2 anos, sendo ela mais duradoura em pacientes que responderam mais, de acordo com os critérios do IWG 2006 (ADÉS,2013).

Curiosamente, cerca de 70% das recidivas da anemia após resposta inicial aos agentes estimuladores da Eritropoetina (AEE) não estão associadas à progressão para SMD de alto risco, mas simplesmente à perda de sensibilidade dos progenitores eritróides aos AEE. A

segunda linha para tratamento desses pacientes pode ser diferente daqueles necessários aos pacientes que apresentam progressão concomitante para SMD de alto risco. (CHESON, 2006)

A maioria das respostas aos AEE ocorre dentro de 8 semanas de tratamento, embora alguns pacientes respondam após apenas 12 semanas.

O IWG,2006, sugere os seguintes critérios de resposta a tratamento :

**Quadro 6: Critérios de resposta ao tratamento com Eritropoetina**

<b>Melhora hematológica</b>	<b>Critérios de resposta (as respostas devem durar pelo menos 8 semanas)</b>
<b>Resposta eritroide (pré-tratamento, &lt; 11 g / dL)</b>	Hb $\geq$ 1,5 g / dL Redução relevante de unidades de transfusões de hemácias por um número absoluto de pelo menos 4 transfusões de hemácias / 8 semanas com o número de transfusão de pré-tratamento nas 8 semanas anteriores. Apenas transfusões de hemácias administradas para um Hb $\leq$ 9,0 g / dl no pré-tratamento, contará na avaliação da resposta transfusional aos glóbulos vermelhos

Fonte: CHESON,2006

Dois variáveis podem ser utilizadas como preditoras de resposta a EPO: o nível basal de EPO e a quantidade de transfusões realizadas ao diagnóstico. Uma boa resposta estaria relacionada com os pacientes que requeriam menos de duas unidades (bolsas) de concentrado de hemácias por mês e com valor de sEPO  $\leq$  500U/L ,com uma chance de responder ao tratamento com EPO em torno de 74%. Apesar do benefício da terapêutica com fatores de crescimento, nomeadamente a Eritropoetina, ter sido demonstrado em estudos retrospectivos, que os níveis séricos de EPO (< 500 IU/L) podem ser considerados como preditivos de resposta. Entretanto, a EPO sérica não demonstrou impacto na evolução para leucemia mieloide aguda(CORTESÃO et.al,2015).

Além disso, o papel dos níveis de EPO como fator de risco prognóstico na SMD não foi ainda estabelecido, e por outro lado, uma resposta ruim era prevista para os pacientes que requeriam mais de duas unidades de concentrado de hemácias ao mês e sEPO > 500U/L ( nível sérico de eritropoetina) ,com chance de resposta em torno de 7% (HELLSTROM-LINDBERG; MALCOVATI, 2008).

## 1.7 EXPRESSÃO GÊNICA

Sabe-se que as neoplasias podem desenvolver-se a partir de uma predisposição genética constitucional seguida de mutações somáticas adquiridas ou de um acúmulo dessas mutações que levam ao desenvolvimento do fenótipo neoplásico.

Cada vez mais, dados sugerem que defeitos citogenéticos e moleculares estão associados ao curso clínico e ao prognóstico da SMD.

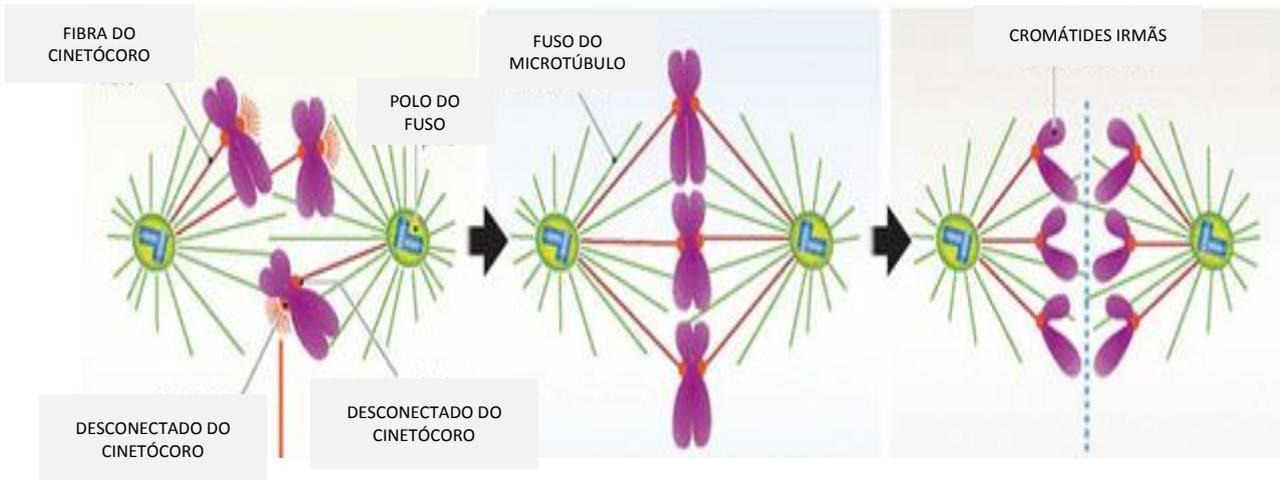
Essas alterações citogenéticas e moleculares podem servir como marcadores diagnósticos ou / ou prognósticos ou até mesmo alvos terapêuticos. No entanto, na maioria dos casos, o impacto exato e função de cada gene alterado e sua contribuição para a patogênese da SMD, ainda permanecem desconhecidos (VALENT; WIESER, 2009)

## 1.8 CONTROLE E REGULAÇÃO DO CICLO CELULAR

Um dos desafios fundamentais que a célula enfrenta é copiar com precisão o seu material genético para as células filhas. Quando este processo ocorre de forma incorreta, leva ao dano no DNA, contribuindo para a instabilidade genômica e o desenvolvimento de malignidade (ABBAS et al, 2013). A integridade do genoma é monitorada ao longo do ciclo celular por mecanismos de vigilância que garantem a ordem e a fidelidade adequadas da replicação e segregação do DNA através da mitose e meiose (LAWRENCE et al., 2015)

A segregação cromossômica correta é essencial para a herança do genoma e a aptidão celular, sendo o ponto de verificação do fuso a garantia que esta segregação ocorra de maneira apropriada durante o processo de divisão celular (LONDON E BIGGINS, 2014). A segregação precisa é conseguida ligando as cromátides irmãs após a replicação e depois segregando-as para os pólos opostos do fuso antes da divisão celular (citocinese). A segregação é mediada por microtúbulos de fuso que se ligam aos cromossomos através de cinetócoros, que são complexos de proteínas grandes que se reúnem no DNA centromérico permitindo o alinhamento dos cromossomos (LONDON E BIGGINS, 2014) (Figura 3). Um único cinetócoro que ainda não foi anexado ao fuso, atrasará a segregação cromossômica e o início da anafase. O sinal inibitório nos cinetócoros não ligados é gerado por um mecanismo de vigilância chamado de checkpoint do fuso ou o checkpoint mitótico (LUO, 2000).

**Figura 3: Processo de segregação cromossômica**



**Legenda:** as cromátides irmãs são ligadas após a replicação e depois segregadas para os pólos opostos antes do processo de citocinese . Essa segregação é mediada por microtúbulos do fuso, que estabelece uma conexão estável e bi-orientada.

**Fonte:** adaptado de Holland et al (2012).

A desmontagem dos microtúbulos fornece a força para segregar os cromossomos na anáfase .A tensão gerada nos cinetócoros irmãos faz com que os microtúbulos do fuso sinalizem a bi-orientação apropriada e o processo de divisão celular siga sem erros .

Problemas nos pontos de checagem mitótico permitem que as células prossigam com a mitose antes da formação de todo o maquinário apropriado, levando a erros de segregação e a instabilidade genômica (SCHUYLER et al.,2012).

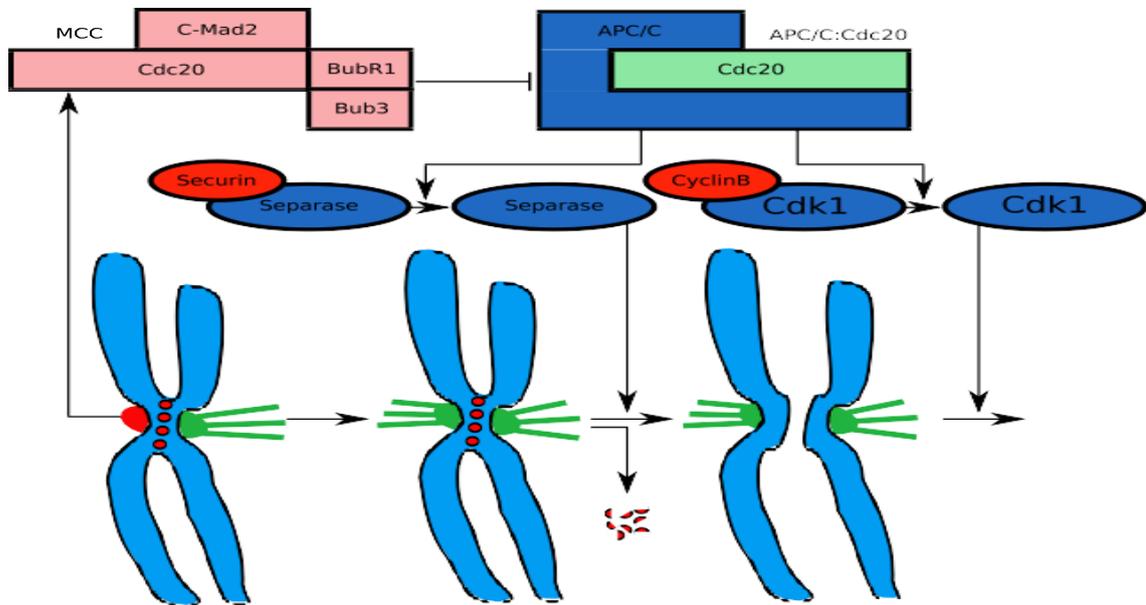
### 1.8.1 Genes relacionados ao ponto de checagem mitótica (*MAD2* e *CDC20*)

O ponto de controle da montagem do fuso (SAC) é um sinal ativo produzido por cinetócoros indevidamente ligados aos microtúbulos (HENZEL et al.,2017). Trata-se de um mecanismo de vigilância que monitora os cromossomos para garantir que eles estejam ligados adequadamente aos microtúbulos do fuso na anáfase (SCHUYLER et al., 2012). O SAC coordena a ligação correta de cinetócoros de cromátides irmãs ao fuso mitótico com ativação do complexo / ciclossoma promotor de anafase (APC / C)(ALFIERI et al., 2016).

O Complexo Promotor da Anáfase (CPA) é um regulador primário do ciclo celular na transição da metáfase-anáfase, que é ativado pelo *CDC20* , permitindo que o CPA se ligue aos seus substratos, tais como securina e ciclina B, levando à anáfase (SCHUYLER et al, 2012; WANG et al., 2013). O APC/C, considerado o alvo final do ponto de checagem mitótico é uma ligase de ubiquitina E3 que promove a degradação de várias proteínas reguladoras da mitose.

Quando o ponto de checagem é ativado a atividade do CPA é inibida, impedindo a transição da metáfase para a anáfase (SCHUYLER et al., 2012; HEINRICH et al., 2013) (Figura 4).

**Figura 4: Funcionamento do ponto de controle de montagem do fuso (SAC)**



**Legenda:**ilustração esquemática da atividade SAC. Os cinetócoros não ligados catalisam a formação do complexo de checagem mitótico (CCM) que inibe o APC / C que é ativado por CDC20. Uma vez que todos os cinetócoros estão conectados (verde), a APC / C ubiquitina a securina e a ciclina B, resultando na destruição da coesina pela separase, tendo Cdk1 não bloqueado se inicia a metáfase e progride o ciclo celular.

**Fonte:** HENZE,2017.

O SAC compõem o complexo de checagem mitótico (CCM), que inclui proteínas do SAC, *MAD2 / MAD3 (Mitotic arrest defective type 2)*, *BUB1 e BUB3 (Budding uninhibited by benzimidazole)* e *CDC20 (Cell division cycle protein 20)*. Outras proteínas envolvidas no SAC incluem *MAD1, BUB1, MPS1 e Aurora B*.

A proteína *CDC20* é sintetizada de forma contínua durante a prometáfase e a metáfase. Se o resultado do ponto de checagem for satisfatório, o *CDC20* poderá ativar o CPA e promover a anáfase. Por outro lado, o ponto de checagem inibe as funções do CPA através da inativação do *CDC20* pelo complexo de checagem mitótico (CCM) que se liga ao *CDC20* impedindo a ativação do CPA (SCHUYLER et al., 2012; LONDON E BIGGINS, 2014; FAESEN et al., 2017). Essa inativação ocorre devido a ligação do *MAD2* em sua forma livre (“aberta”) com o *CDC20*, formando o CCM, que se liga ao CPA, tornando-o inativo e levando ao bloqueio do ciclo celular até o completo e correto alinhamento dos cromossomos ao fuso mitótico. A formação do complexo *MAD2-CDC20* envolve a conversão de *MAD2* de uma conformação

“aberta” para uma conformação “fechada” com o *CDC20* (SCHUYLER et al, 2012; HEINRICH et al., 2013; LONDON E BIGGINS, 2014).

O CPA não é ativado enquanto *MAD2* estiver ligado ao *CDC20*. Só após todos os cromossomos estarem alinhados corretamente na metáfase, o *MAD2* dissocia-se de *CDC20*, permitindo a ativação do CPA (BRAUNSTEIN et al., 2007).

Vários estudos têm descrito o papel oncogênico do *CDC20*, estando relacionado ao desenvolvimento e progressão de cânceres humanos. *MAD2* tem se apresentado superexpresso em vários tipos de tumores, geralmente associado a prognóstico desfavorável e promovendo a instabilidade genética em estudos com cultura de células (SOTILLO et al., 2007).

Heredia e colaboradores (2014) demonstraram a associação entre o aumento da expressão dos genes *MAD2* e *CDC20* e o aumento de chances de desenvolvimento de uma medula óssea normo ou hiperclular em pacientes com SMD, relacionando a um pior prognóstico. Ainda neste estudo, demonstrou-se que os genes *MAD2* e *CDC20* estão superexpressos em pacientes idosos (com idade superior a 60 anos) (HEREDIA et al., 2014). Sabe-se que alterações na expressão dessas proteínas estão fortemente relacionadas à instabilidade cromossômica, aneuploidia e progressão tumoral em diferentes tumores sólidos e neoplasias hematológicas.

Genga e colaboradores (2015) também encontraram associações significativas entre os níveis de expressão desses genes em pacientes com SMD.

### **1.8.2 Genes relacionado ao fuso mitótico (*AURKA*, *AURKB* e *TPX2*)**

Aurora quinases desempenham papéis críticos na segregação cromossômica e na divisão celular. Eles estão implicados no ciclo centrossomo, na montagem do fuso, na condensação cromossômica, na ligação microtúbulo-cinetócoro, no ponto de checagem do fuso e na citocinese. Vários substratos Aurora foram identificados e seus papéis estão sendo elucidados. A desregulação de Aurora quinases prejudica a montagem do fuso, a função do ponto de checagem e a divisão celular, a falta de segregação de cromossomos individuais ou a poliploidização acompanhada de amplificação do centrossoma. As quinases Aurora são freqüentemente superexpressas em cânceres e a identificação de Aurora A como um gene de susceptibilidade ao câncer fornece uma forte ligação entre erros mitóticos e carcinogênese.

A família da proteína quinase, as Auroras (constituída por AuroraA, Aurora B e Aurora C) é um importante grupo de enzimas que controla vários aspectos da divisão celular em células

de mamíferos. A disfunção destas quinases tem sido associadas com a incapacidade de manter o conteúdo cromossômico estável, um estado que pode contribuir para a tumorigênese.

Além disso, Aurora A é frequentemente encontrada amplificada em uma variedade de tipos de tumor e exibe atividade oncogênica.(VADER,2008)

A família dos genes Aurora quinases tem sido amplamente estudada em virtude de ser essencial para a regulação da segregação cromossômica e citocinese durante a mitose (HEREDIA et al.,2014).Esses genes, *AURK A* e *AURK B* são membros da família de serinas / treoninas que regulam a maturação do centrossomo, montagem do fuso mitótico e segregação cromossômica. Foi relatado que a superexpressão ou amplificação de Aurora A / B desencadeia a instabilidade cromossômica e induz a formação de tumores (WANG,2014). Estudos demonstraram que Aurora A e Aurora B promovem a progressão do ciclo celular (OLIVEIRA et al.,2012).

Embora as aurora quinases compartilhem domínios de cinases catalíticas muito semelhantes, as cinases Aurora A e Aurora B possuem funções distintas que estão relacionadas às suas distribuições subcelulares (YU et al.,2017).

#### 1.8.2.1 AURORA A (*AURKA*)

A Aurora A (*AURKA*) é uma serina / treonina quinase envolvida na regulação , maturação e separação dos centrossomos, montagem do fuso bipolar e nos processos de segregação cromossômica . A Aurora A localiza-se nos centrossomos e microtúbulos de fuso proximal durante a mitose e são reguladas de maneira dependente do ciclo celular; os níveis são baixos em G1 / S, regulares durante a fase G2 / M e rapidamente reduzidos após a mitose (BAI et al.,2014). A Aurora A desempenha funções na maturação e separação do centrossomos antes da mitose e na subsequente formação do fuso bipolar durante a mitose. Também é necessária para entrada mitótica eficiente e alinhamento cromossômico.

Na ausência da *AURKA*, o ponto de checagem detecta defeitos no alinhamento dos cromossomos e interrompe a divisão celular, porém, algumas células com defeitos na *AURKA* podem escapar do bloqueio e terminar o processo de divisão, levando a erros de segregação cromossômicas (GOLDENSON E CRISPINO, 2015).

Em um estudo realizado por Herédia e colaboradores envolvendo análise de expressão gênica, cariótipo e FISH (Hibridização in situ por fluorescência) , foram encontradas várias correlações entre a Aurora A e as características clinico-laboratoriais de pacientes portadores

de SMD. Neste estudo foi encontrada amplificação do gene Aurora A por FISH, em pacientes com hiperexpressão em relação ao grupo controle. Esses pacientes apresentavam prognóstico desfavorável, com presença de alterações citogenéticas, dependência transfusional e maior número de citopenias periféricas (HEREDIA et al., 2014).

A superexpressão de *AURKA* tem sido estudada em diversos tipos de tumores por induzir a transformação oncogênica. Assim, as Aurora quinases podem ser bons alvos terapêuticos moleculares para o câncer (DAMODARAN et al., 2017)

Diversos fatores moduladores têm sido estudados como ativadores da Aurora A com relação à atividade, localização e estabilidade. O regulador mais bem caracterizado é o *TPX2* (*Target Protein for Xklp2*) (ASTERITI et al., 2010).

#### 1.8.2.2 AURORA B (*AURKB*)

A Aurora B (*AURKB*), é uma proteína quinase membro da família de serina / treonina, sendo fundamental no processo de segregação cromossômica. Esta proteína é parte integrante do chromosomal passenger complex (CPC) e tem um papel importante na correção das ligações cinetócoro-microtúbulos aberrantes (RUCHAUD et al., 2007). A Aurora B controla a citocinese e a bi-orientação cromossômica no alinhamento dos cromossomos e no monitoramento do ponto de checagem mitótico, regulando ainda a dinâmica do cromossomo mitótico (GOLDENSON E CRISPINO, 2015).

A *AURKB* se concentra no início da mitose na proximidade dos centrômeros e cinetócoros, contribuindo para uma série de processos que conferem fidelidade à divisão celular, incluindo a estabilização do cinetócoro, a conexão aos microtúbulos e a regulação do ponto de controle da montagem do fuso (KRENN e MUSACCHIO, 2015).

Neste processo, a proteína *AURKB* identifica e desestabiliza as ligações aberrantes, permitindo uma nova orientação e alinhamento dos cromossomos, evitando, desta forma, a aneuploidia (DELUCA et al., 2011; SILVA et al., 2011;). Enquanto todos os cromossomos não estiverem bi orientados, através da ação da *AURKB*, o CPA permanece desativado, apenas sendo liberado pelo ponto de checagem após a correta reorganização cromossômica, possibilitando a anáfase. Assim, o ponto de checagem mitótico é comprometido pela falta de atividade de Aurora B (KITZEN et al, 2010; GOLDENSON E CRISPINO, 2015).

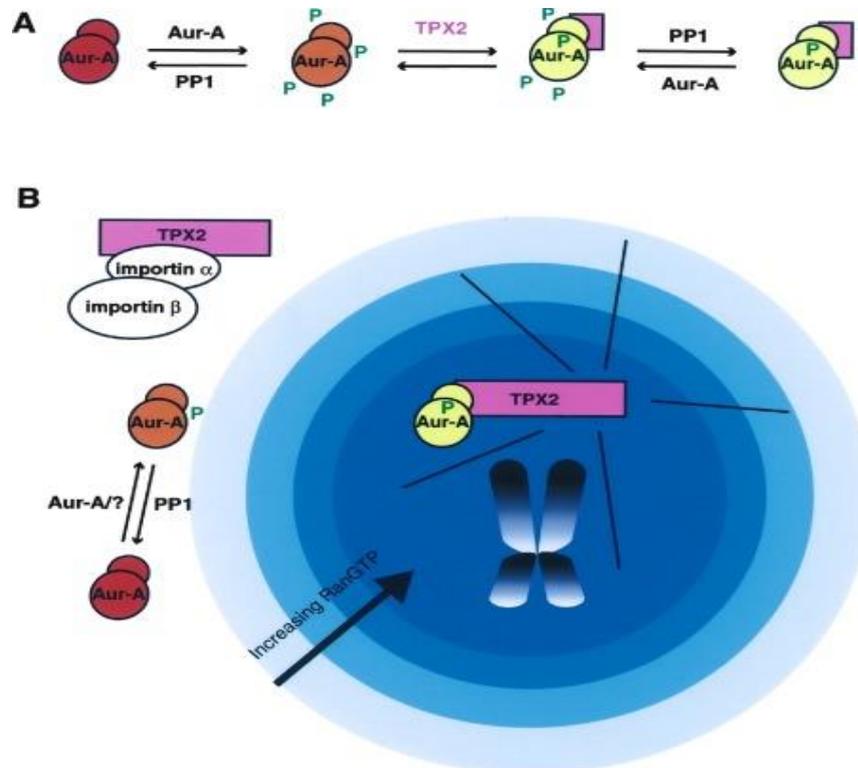
Aurora B também é essencial para a realização correta da citocinese. Sem sua ação, as células filhas permanecem ligadas através de pontes citoplasmáticas, gerando defeitos de formação cromossômicos (GOLDENSON E CRISPINO, 2015).

### 1.8.2.3 *TPX2*

*TPX2* é uma proteína associada aos microtúbulos e desempenha um papel importante na formação do fuso mitótico (LIANG et al., 2016). A sua expressão é rigorosamente controlada durante a progressão do ciclo celular, ou seja, aparece entre as fases G1 e S e desaparece após a conclusão da citocinese das células (LIANG et al., 2016). As funções e localização do *TPX2* estão relacionadas à sua função como regulador da Aurora A (DE LUCA et al., 2016). Além de permitir que a Aurora A realize suas funções, a *TPX2* também a protege contra a degradação prematura (GARRIDO E VERNOS, 2016). A Aurora A é ativada pela fosforilação durante a mitose e inativada por desfosforilação (MARUMOTO et al., 2002) A autoativação da Aurora A depende da fosforilação do resíduo Thr288. A fosforilação da Thr288 não é obrigatória para a ligação do *TPX2* a *AURKA*, porém, a ativação só é completa quando *TPX2* se liga à Aurora A fosforilada, pois o *TPX2* protege o resíduo Thr288 de ser desfosforilado pela ação da Proteína Fosfatase 1 (PP1) (ASTERITI et al., 2010; LEE et al., 2014; BERTOLIN et al., 2016). Quando Aurora A não está ligada ao *TPX2*, o resíduo Thr288 é neutralizado pela fosfatase PP1, gerando uma ativação parcial da Aurora A. Com a ligação do *TPX2*, a Aurora A sofre uma mudança na sua forma, fazendo com que o resíduo Thr288 esteja inacessível ao PP1, tornando a Aurora A totalmente ativada e podendo então se ligar aos microtúbulos do fuso e realizar suas funções corretamente (Figura 5) (ASTERITI et al., 2010; BERTOLIN et al., 2016).

A associação da *TPX2* com Aurora A resulta em uma unidade funcional que, quando superexpressa, tem propriedades cancerígenas, provavelmente devido a ativação oncogênica da Aurora A pelo *TPX2* (GUPTA et al., 2015). O aumento da expressão do *TPX2* está relacionado à instabilidade cromossômica, o que pode levar ao desenvolvimento de tumores (CASTRO e MALUMBRES, 2013; NEUMAYER et al., 2014). Muitos estudos têm demonstrado que o *TPX2* se encontra hiperexpresso nos cânceres de colo, de fígado, mama, entre outros, evidenciando seu papel como possível marcador da proliferação de tumores (NEUMAYER et al., 2014). A hiperexpressão do *TPX2* nesses tumores tem sido associada à amplificação anormal dos centrossomos, presença de aneuploidias, proliferação celular e a redução da apoptose. Além disso, esse aumento de expressão também tem sido associado com a presença de metástase tumoral em várias neoplasias (LIANG et al., 2016; LEE et al., 2016). Este é o primeiro estudo a avaliar os níveis de expressão gênica do *TPX2* em pacientes portadores de SMD que fizeram tratamento com EPO.

Figura 5: Ativação de *AURKA* por *TPX2*



**Legenda:** (A) A Aurora-A em vermelho não fosforilada (inativada), em laranja, parcialmente ativada, fosforilada e em amarelo, fosforilada (ativada), ligada a *TPX2*. *TPX2* é indicado em rosa. Na ausência de *TPX2*, a fosfatase PP1 é capaz de desfosforilar completamente e desativar a *AURKA*.

(B) Um gradiente de RanGTP (azul), mais concentrado na proximidade da cromatina, regula a formação e organização da rede de microtúbulos, regularizando a polimerização dos microtúbulos durante a mitose. Na baixa concentração de RanGTP, o *TPX2* (rosa) está ligado a fatores de importação nuclear e não pode ligar e ativar Aurora-A. Na alta concentração de RanGTP, o *TPX2* é liberado e fora o complexo *TPX2-AURKA* permite a ligação de *AURKA* ao centrômero e sua migração pelo fuso mitótico.

Fonte: BAYLISS, 2003

#### 1.8.2.4 Genes reguladores do ciclo celular (*CDKN1A*)

Um controle apropriado sobre a progressão do ciclo celular depende de muitos fatores.

As ciclinas dependentes de quinases (CDK) são uma família de proteínas que atuam nas transições de G1 para S e de G2 para mitose (PRIVES E GOTTIFREDI, 2008; CAZZALINI et al., 2010; KARIMIAN et al., 2016). Vários estudos relacionam a função do inibidor de ciclina dependente de quinase à carcinogênese de diversos tumores. (PRIVES E GOTTIFREDI, 2008; CAZZALINI et al., 2010; KARIMIAN et al., 2016).

O inibidor p21 (*CDKN1A*) é um desses fatores que promovem a parada do ciclo celular em resposta a uma variedade de estímulos. O efeito inibitório da P21 na progressão do ciclo

celular correlaciona-se com sua localização nuclear (KARIMIAN et al., 2016). O p53 é o principal regulador transcricional da p21. Estudos recentes têm demonstrado que a Aurora B pode fosforilar p53, suprimindo a ação desse supressor tumoral. Da mesma forma, a inativação da *AURKB* leva a um aumento da atividade do p53 e indução do *CDKN1A* (TRAKALA et al., 2013).

Níveis muito elevados de *CDKN1A*, devido a lesões no DNA, resultam no bloqueio do ciclo celular em G2 sem que haja a segregação cromossômica. O aumento intermediário dos níveis de *CDKN1A* permite que a célula inicie a mitose, porém, resulta em uma saída prematura, devido a baixa atividade das CDKs (TRAKALA et al., 2013). Além disso, o *CDKN1A* tem apresentado influência na expressão de genes relacionados ao ciclo celular, ao reparo do DNA e na regulação da apoptose (PRIVES E GOTTIFREDI, 2008; CAZZALINI et al., 2010; KARIMIAN et al., 2016).

Estudos prévios demonstram a importância do estudo dos genes relacionados à regulação do ciclo celular, aos mecanismos de checagem mitóticos e ao fuso mitótico em pacientes portadores de SMD, mostrando associação entre os níveis de expressão gênica e o prognóstico dos pacientes, além das alterações laboratoriais, demonstrando o papel desses genes no melhor entendimento da SMD (HEREDIA et al., 2014; GENGA et al., 2015).

## **2. OBJETIVOS**

A SMD é uma doença epidemiologicamente importante e o arsenal terapêutico para tratamento dessa neoplasia ainda é escasso. Além disso, a necessidade de se avaliar possíveis novos biomarcadores de resposta a tratamento utilizando análises de expressão de genes relacionados à sua patogênese é algo que pode contribuir também para avaliar sobrevida e progressão da doença em pacientes com SMD.

### **2.1 OBJETIVO GERAL**

Estabelecer associações entre os níveis de expressão dos genes de controle de fuso mitótico (*AURKA,AURKB,TPX2*), dos genes relacionados ao ponto de checagem mitótico (*CDC20 e MAD2*) e reguladores do ciclo celular (*CDKN1A*) e variáveis clínico-laboratoriais referentes à resposta ao tratamento com Eritropoetina.

### **2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

1. Definir ponto de corte para cada gene através da utilização do software *Cutoff Finder*® e estratificar os grupos de acordo com as variáveis clínico-laboratoriais a serem estudadas.
2. Avaliar a associação do nível de expressão dos genes com as variáveis clínicas referentes à resposta ao tratamento de pacientes com SMD que fizeram tratamento com EPO.
3. Associar os achados moleculares com as variáveis clínico-laboratoriais encontradas nos pacientes com SMD.
4. Categorizar os níveis de expressão dos genes avaliados de acordo com o agrupamento das associações clínicas significantes apresentadas.

### 3. MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1. COLETA DE DADOS

Neste estudo foram incluídos 43 pacientes portadores de SMD diagnosticados de acordo com critérios da Organização Mundial de Saúde (OMS,2008), seguidos no Ambulatório de Síndrome Mielodisplásica do Hospital Universitário Walter Cantídio da Universidade de Federal do Ceará (HUWC/UFC), no período de 2007 a 2015, que fizeram uso de Eritropoetina e que possuíam dados de expressão gênica disponibilizados pelo Laboratório de Citogenômica do Câncer da UFC.

#### 3.2 CUTOFF FINDER®: UMA ABORDAGEM PARA A SELEÇÃO DE NOVOS BIOMARCADORES EM SMD.

O *Cutoff Finder* é uma ferramenta on-line disponível gratuitamente (<http://molpath.charite.de/cutoff>) que disponibiliza um conjunto de métodos de otimização e visualização de pontos de *cut-off* para avaliação de novos potenciais biomarcadores de dados moleculares (BUDCZIES et al., 2012).

O *Cutoff Finder* otimiza pontos de corte de dados provenientes de expressão gênica ou proteica. Esses dados moleculares são apresentados em forma de variáveis contínuas ou ordinais, e para transformá-las em variáveis de decisão clínica, é necessário a definição de pontos de corte para a estratificação de pacientes de forma dicotômica. Esta ferramenta computacional oferece uma infinidade de métodos para determinação do cutoff point, utilizando um pacote estatístico R como suporte para a visualização e análise dos dados (CORE TEAM, 2012).

As etapas de processamento de dados são mostradas abaixo:

- Os dados são carregados a partir de um ficheiro separado por tabulações, linhas que representam pacientes e colunas que representam variáveis.
- O usuário seleciona o biomarcador e opcionalmente as variáveis de resultado e sobrevivência das colunas da tabela.
- O usuário seleciona o método para determinação de corte.
- O usuário escolhe o conjunto de gráficos a serem gerados.
- O banco de dados é enviado ao modelo estatístico R. O ponto de corte ótimo é determinado e os gráficos de análise são gerados.

- O usuário é direcionado para a página da Web de resultados, onde o ponto de corte e os gráficos são mostrados(Figura 6).

**Figura 6:** Apresentação do Software Cutoff Finder® ( página da web)

The screenshot shows the Cutoff Finder web application interface. The header includes the CHARITÉ logo and the title 'Cutoff Finder'. A navigation menu on the left contains links for Documentation, Example data, Load data, Find cutoff (highlighted in orange), and Contact. The main content area is divided into several sections:

- Data set:** "An?lises\_CutoffFinder\_Daniela\_EPRES" includes 12 variables and 43 patients.
- Assignment of variables:** biomarker: (no data) ▾, outcome: (no data) ▾, survival time: (no data) ▾, event: (no data) ▾
- Method for cutoff determination:**
  - None
  - Fit of mixture model
  - Outcome: significance (Fisher's exact test)
  - Outcome: ROC curve (Euclidean distance)
  - Outcome: ROC curve (Manhattan distance)
  - Outcome: minimum sensitivity
  - Outcome: minimum specificity
  - Survival: significance (log-rank test)
  - Enter cutoff value:
- Overview plots:**
  - Histogram
  - Odds Ratio (outcome information required)
  - ROC curve (outcome information required)
  - Hazard Ratio (survival information required)
  - Difference in survival (survival information required)
- Plots at cutoff point:**
  - Waterfall plot (outcome information required)
  - Kaplan-Meier plot (survival information required)

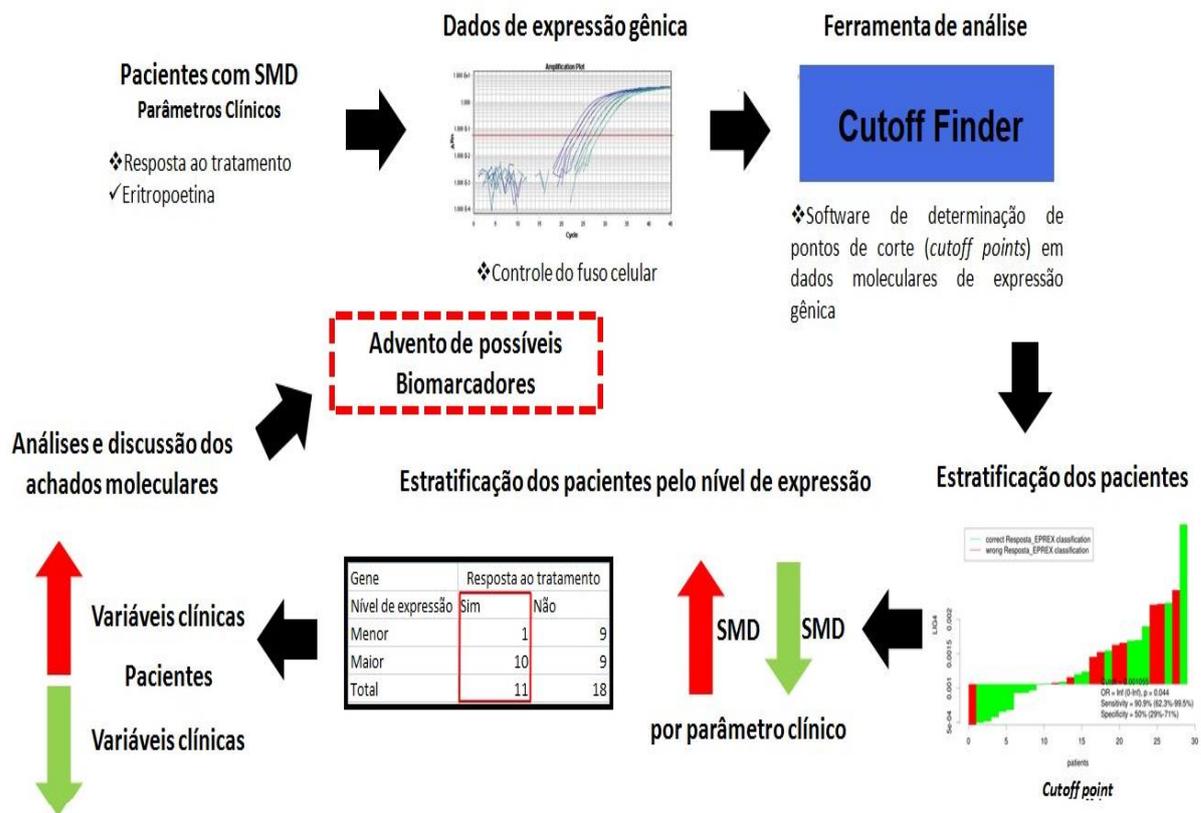
**Fonte:** Budczies, 2013. <http://molpath.charite.de/cutoff>

Este método se encaixa para os modelos de análises de risco proporcional de *Cox* para uma variável dicotomizada (binária) e uma variável de análise de sobrevivência (BUDCZIES et al., 2012). A análise de sobrevivência é executada utilizando-se das funções *coxph* e *survfit* do pacote estatístico R (THERNEAU; LUMLEY, 2011). O ponto de corte ideal é definido como o ponto com o desdobramento mais significativo obtido pelo teste de *log-rank* (BUDCZIES et al., 2012) aumentando o poder do teste em afastar a hipótese nula dos resultados. O *odds-ratio*, incluindo intervalos de confiança de 95%, também é calculado por essa ferramenta do software *Cutoff Finder* (BUDCZIES et al., 2012).

### 3.3 DESENHO EXPERIMENTAL

A representação esquemática da metodologia a ser utilizada neste projeto encontra-se apresentada na figura 7.

**Figura 7: Representação esquemática do desenho do estudo**



A partir dos dados de expressão dos genes de controle de fuso mitótico (*AURKA, AURKB, TPX2*), dos genes relacionados ao ponto de checagem mitótico (*CDC20* e *MAD2*) e reguladores do ciclo celular (*CDKN1A*), oriundos de 43 pacientes com SMD submetidos ao tratamento com EPO, realizamos as comparações das médias de expressão desses genes entre os pacientes que responderam ou não ao tratamento com EPO, utilizando-se do teste *t* de student (dados normalizados pelo teste de Shapiro-Wilk). Todos os outliers foram removidos por não representarem os resultados que o estudo tinha o objetivo de generalizar (p-valor >0.05 para o teste de Shapiro-Wilk).

Para avaliar a intensidade da força de associação destas variáveis foi utilizado o método de Phi e Cramer's V, onde o intervalo de 0,1 - < 0,3 indica uma associação fraca, de 0,3 - < 0,5 associação moderada e > 0,5 uma forte associação.

Após estas análises, os casos, dicotomizados quanto à resposta ou não ao tratamento com EPO, e os dados de expressão dos referidos genes, foram plotados no software *Cutoff Finder*, a fim de obtermos o ponto de corte do perfil de expressão e verificarmos a existência de associação com a resposta ao tratamento com EPO. Tal associação foi obtida pela análise do gráfico *Waterfall Plot* e pelo modelo estatístico *Fit of mixture model*, fornecido pelo software.

De acordo com a análise dos gráficos *Waterfall Plot*, os genes que apresentaram associação significativa, tiveram seus casos estratificados em duas variáveis distintas: **1º**) Casos estratificados com aumento de expressão (valores maiores que o ponto de corte) e diminuição de expressão (valores menores que o ponto de corte) de expressão e **2º**) casos estratificados de acordo com a resposta ao tratamento com EPO (com resposta e sem resposta). A partir dessa avaliação, foram realizadas as análises de associação entre os casos e as variáveis clínico-laboratoriais (seção 5.4) dos pacientes com SMD pelo teste de qui-quadrado, seguido da análise de regressão logística multinomial.

Os dados sobre o nível de expressão gênica (valores de  $\Delta Cq$ ) foram expressos em média  $\pm$  desvio padrão (SD), com intervalo de confiança (CI) (máximo e mínimo), com nível de significância estatística de  $p < 0,05$ . Todas as análises foram efetuadas com recurso do software SPSS para Windows (versão 22.0).

### **3.4 VARIÁVEIS CLÍNICO LABORATORIAIS:**

As variáveis analisadas neste estudo foram assim subdivididas:

1. Sexo: masculino e feminino;
2. Idade (categorização 1):  $\leq 60$  anos e  $> 60$  anos;
3. Idade (categorização 2):  $\leq 60$  anos,  $> 60 - \leq 70$  anos,  $> 70$  anos;
4. Origem: urbano e rural;
5. Quanto à classificação da OMS (2008): CRDU (Citopenia Refratária com Displasia de Linhagem Única), ARSA (Anemia Refratária com Sideroblastos em Anel), CRDM (Citopenia Refratária com Displasia em Múltiplas Linhagens), AREB I (Anemia Refratária com Excesso de Blastos I), AREB II (Anemia Refratária com Excesso de Blastos II), t-SMD (SMD Secundária ao tratamento),

- LMMC (Leucemia Mielomonocítica Crônica);
6. Forma da SMD: Iniciais (CRDU, ARSA e CRDM) e Avançadas (AREB I e AREB II);
  7. Celularidade da medula óssea: Hipocelular, Normocelular e Hipercelular;
  8. Fibrose na medula óssea: Presença e Ausência;
  9. Displasias na medula óssea: 0, 1 displasia, 2 displasias e 3 displasias;
  10. Diseritropoiese: Sim e Não;
  11. Disgranulopoiese: Sim e Não;
  12. Dismegacariopoiese: Sim e Não;
  13. Presença de Micromegacariócito: Sim e Não;
  14. Sideroblastos em anel: Presença e ausência;
  15. Faixas de porcentagens de Sideroblastos em anel: 0, 1-14% e >15%;
  16. Porcentagens de Blastos (IPSS-R):  $\leq 2\%$ ,  $>2\% - <5\%$ ,  $5\%-10\%$  e  $>10\%$ ;
  17. Cariótipo:
  18. Quanto à alteração: normal e alterado;
  19. Cariótipo (Aneuploidia): normal, alterado não aneuplóide e alterado aneuplóide;  
Cariótipo (Alteração no cromossomo 5): normal, alterado com  $-5/5q$  e alterado sem  $-5/5q$ ; Cariótipo (Alteração no cromossomo 7): normal, alterado com  $-7/7q$  e alterado sem  $-7/7q$ ;
  20. Cariótipo (Número de alterações): normal, 1 alteração, 2 alterações e Complexo (3 ou mais alterações);
  21. Classificação dos valores de hemoglobina (Hb) (IPSS-R):  $\geq 10g/dL$ ,  $8-<10g/dL$  e  $<8g/dL$ ;
  22. Classificação dos valores de neutrófilos (ANC) (IPSS-R):  $\geq 800$  por  $mm^3$  e  $<800$  por  $mm^3$ ;
  23. Classificação dos valores de plaquetas (IPSS-R):  $\geq 100.000$  por  $mm^3$ ,  $50.000 - <100.000$  por  $mm^3$  e  $\leq 50.000$  por  $mm^3$ ;
  24. Classificação do número de citopenias no sangue periférico: 0/1 citopenia e 2/3 citopenias;
  25. Classificação do grupo de risco de acordo com o IPSS-R: muito baixo, baixo, intermediário, alto e muito alto;
  26. Classificação do grupo de risco de acordo com o WPSS: muito baixo, baixo, intermediário, alto e muito alto;
  27. Dependência Transfusional: sim e não (utilizando-se o critério de 1 transfusão a cada 8 semanas durante período de 4 meses (IWG,2006));
  28. Tratamento com Eritropoetina: Com resposta e sem resposta.

### **3.4 ASPECTOS ÉTICOS**

A presente pesquisa foi submetida e aprovada (Nº do processo: 2.108.480) pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos PROPESQ da Universidade Federal do Ceará -UFC, através do sistema da Plataforma Brasil.

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

## 4 RESULTADOS

### 4.1 CARACTERIZAÇÃO DOS PACIENTES QUANTO À RESPOSTA À EPO.

Neste estudo foram avaliados os dados de expressão para os genes de controle de fuso mitótico e regulação do ciclo celular, *AURKA*, *AURKB*, *MAD2*, *TPX2*, *CDC20* e *CDKN1A* de 43 pacientes com SMD que fizeram uso de Eritropoetina (EPO), numa população de 15 pacientes que responderam a tratamento.

Dos 43 pacientes avaliados, 21 (48,8%) eram do sexo masculino e 22 (51,2%) do sexo feminino. Observou-se que 80% (12/15) dos indivíduos que responderam a EPO eram do sexo feminino. A média de idade do grupo estudado foi de 69,58 anos (mediana= 71 anos / mínimo de 33 anos e máximo de 89 anos), e destes, 80% (12/15) dos que responderam ao tratamento tinham mais de 65 anos (**Tabela 1**).

Quanto à origem dos pacientes, 25 (62,5%) eram da capital e 15 (37,5%) da zona rural, sendo que a predominância da resposta foi identificada nos pacientes da zona urbana, com 78,6% (11/14).

Em se tratando dos achados da medula óssea, observou-se que 25 (67,5%) pacientes apresentaram predominantemente medula óssea hipercelular, seguido de uma taxa de resposta de 71,4% (10/14) (**Tabela 1**). No grupo do estudo, houve predominância de ausência de fibrose em 28 (75,6%) indivíduos, dos quais, 64,3% (9/14) responderam ao tratamento com EPO. (**Tabela 1**).

Quanto à presença de displasias na medula óssea, observou-se que 16 (40%) pacientes apresentaram displasias em duas linhagens, seguidos de 15 (37,5%) para displasia em uma linhagem e 9 (22,5%) para as três linhagens celulares. Identificou-se quanto a esses achados, que os pacientes que mais responderam ao tratamento representavam 50% (7/14) dos que tinham displasias em duas linhagens.

Dentre as principais displasias, observou-se que houve um predomínio de achados para a diseritropoiese, em 39 (88,63%) casos, seguidos de disgranulopoiese 19 (47,5%) e dismegacariopoiese 16 (40%). De acordo com os valores apresentados, os pacientes que mais responderam possuíam como citopenia a diseritropoiese, representando 14 (35%) contra 25 (62,5%) dos pacientes que não responderam para a mesma variável.

Em relação à variável sideroblastos, observamos a predominância de pacientes com ausência destes ao mielograma, representados em 29 (70,7%) casos. Desses, 78,6% (11/14) responderam à EPO.

Quanto à porcentagem de blastos observados no mielograma, identificou-se um predomínio de 38 (90,4%) pacientes que estavam na faixa de < 10%, e deste grupo, 98,5% (13/14) mostraram resposta ao tratamento quando utilizaram Eritropoetina (**Tabela 1**).

Ao se analisarem os 43 pacientes, apenas 32 tinham cariótipo com metáfase (74,4%). Destes, 24 (75%) apresentaram cariótipo normal, frente a 8 (25%) pacientes com cariótipo alterado. Para os pacientes com cariótipo normal, observou-se que 84,6% (11/13) responderam ao tratamento com EPO (**Tabela 1**).

Quanto ao grupo de risco, os pacientes foram classificados de acordo com o IPSS-R e com o WPSS. Em ambas as classificações de risco, observou-se o predomínio de pacientes de baixo risco 15 (50%), seguido dos de risco intermediário 9 (30%). Dos pacientes de baixo risco, 63,6% (7/11) responderam a Eritropoetina (**Tabela 1**).

Quanto aos achados no sangue periférico, as variáveis analisadas em relação aos pacientes que fizeram tratamento com Eritropoetina foram hemoglobina, contagem de neutrófilos e plaquetas, categorizada conforme o IPSS-R, como também as citopenias.

Para a variável hemoglobina observou-se o predomínio de pacientes com Hb < 8 (46,5%), seguidos de 12 pacientes com valores  $\geq 10$  (27,9%) e 11 casos com valores de intervalo entre 8-10 de Hb (25,6%). Entretanto, os pacientes que mais responderam a Eritropoetina representavam um percentual de 66,7% (10/15) para valores de Hb  $\geq 10$  mg/dL.

Em relação à contagem de neutrófilos, identificou-se um predomínio de casos para a faixa de valores  $\geq 0,8$  mg/dL, representadas quando utilizaram EPO (**Tabela 1**).

Considerando a contagem de plaquetas nos 43 pacientes, identificou-se que 25 (58,1%) casos apresentaram valores de plaquetas na faixa  $\geq 100.000/\text{mm}^3$ , seguidos de 11 (25,6%) para a faixa < 50.000/ $\text{mm}^3$  e por fim, 7 (16,3%) casos com valores na faixa entre 50 - < 100.000/ $\text{mm}^3$ . Para pacientes com o número de plaquetas entre 50 - < 100.000/ $\text{mm}^3$  houve predomínio de resposta ao tratamento em 60% (9/15) dos casos.

Dos achados quanto às citopenias, observou-se o predomínio de pacientes com 0/1 citopenia por linhagem, representado por 31 (72%) casos, seguidos de 12 (28%) que apresentaram citopenias em 2/3 linhagens celulares. Identificamos que os pacientes que mais responderam a EPO foram os que se enquadraram nas citopenias de 0/1 linhagem, representados por 93,3% (14/15) casos.

Todos os 43 pacientes avaliados foram classificados de acordo com a OMS 2008, sendo 21 (48,8%) pacientes classificados como CRDM, 8 (18,6%) pelo subtipo ARSA, 5 (11,6%) como CRDU, 3 (7%) para ambos os casos de AREB1 e AREB 2. Para os pacientes com SMD relacionada à terapia, LMMC e Síndrome 5q, todos os casos foram representados cada um por

1(2,32%). Das SMD primárias, a mais prevalente foi a CRDM, e os pacientes que mais responderam a EPO, 57,1% (8/15) estavam distribuídos nesta classificação.

Quanto à variável dependência transfusional, houve predomínio de pacientes não dependentes, representado por 22 casos (51,2%), seguidos de 21 (48,8%) que eram dependentes transfusionais. Observou-se nesse estudo, o predomínio de resposta a tratamento em 100% (15/15) dos pacientes que não eram dependentes transfusionais.

**Tabela 1: Descrição das variáveis clínico laboratoriais analisadas no estudo frente à resposta ao tratamento com EPO.**

VARIÁVEIS	RESPOSTA À ERITROPOETINA				
	COM RESPOSTA (N=15)		SEM RESPOSTA (N=28)		
	N	%	N	%	
<b>Variáveis sócio-demográficas dos pacientes com SMD.</b>					
<b>Sexo</b>	Feminino	12	80,0	10	35,7
	Masculino	3	20,0	18	64,3
<b>Idade categorizada 1</b>	≤60 anos	3	20,0	7	25,0
	>60 anos	12	80,0	21	75,0
<b>Idade categorizada 2</b>	≤60 anos	3	20,0	7	25,0
	>60-70 anos	2	13,3	9	32,1
	>70-80 anos	5	33,3	6	21,4
	>80 anos	5	33,3	6	21,4
<b>Origem</b>	Urbano	11	78,6	14	53,8
	Rural	3	21,4	12	46,2
<b>Achados da medula óssea</b>					
<b>Celularidade</b>	Hipocelular	1	7,1	2	8,7
	Normocelular	3	21,4	6	26,1
	Hiper celular	10	71,4	15	65,2
<b>Fibrose</b>	Ausência	9	64,3	19	82,6
	Presença	5	35,7	4	17,4
<b>Displasia</b>	1	5	35,7	10	38,5
	2	7	50,0	9	34,6
	3	2	14,3	7	26,9
<b>Diseritropoiese</b>	Não	0	0,0	1	3,8
	Sim	14	93,9	25	89,28
<b>Disgranulopoiese</b>	Não	9	64,3	12	46,2
	Sim	5	35,7	14	53,8
<b>Dismegacariopoiese</b>	Não	8	57,1	16	61,5
	Sim	6	42,9	10	38,5
<b>Presença de sideroblasto</b>	Presença	3	21,4	9	33,3
	Ausência	11	78,6	18	66,7
	0	11	78,6	18	66,7

<b>Sideroblasto categorizado</b>	1-14	0	0,0	1	3,7
	>15	3	21,4	8	29,6
<b>Percentual de blastos IPSS-R</b>	<10	13	92,9	25	89,3
	>10	1	7,1	3	10,7
<b>Variáveis clínicas relacionadas aos achados do sangue periférico</b>					
<b>Hb IPSS-R</b>	>=10	10	66,7	2	7,1
	8-10	3	20,0	8	28,6
	<8	2	13,3	18	64,3
<b>ANC IPSS-R (contagem absoluta de neutrófilos)</b>	<0,8	2	13,3	11	39,3
	>=0,8	13	86,7	17	60,7
<b>Plaquetas IPSS-R</b>	>=100	9	60,0	16	57,1
	50-<100	4	26,7	3	10,7
	<50	2	13,3	9	32,1
<b>Citopenias</b>	0/1	14	93,3	17	60,7
	2/3	1	6,7	11	39,3
<b>Caracterização citogenética e seu impacto prognóstico</b>					
<b>*Cariótipo norm/alterado</b>	Normal	11	84,6	13	68,4
	Alterado	2	15,4	6	31,6
<b>Prognóstico IPSS-R</b>	Favorável	9	81,8	16	84,2
	Intermediário	2	18,2	2	10,5
	Muito desfavorável	0	0,0	1	5,3
	Muito baixo	4	36,4	1	5,3
<b>Grupo risco IPSS-R</b>	Baixo risco	7	63,6	8	42,1
	Risco intermediário	0	0,0	7	36,8
	Alto risco	0	0,0	2	10,5
	Risco muito alto	0	0,0	1	5,3
	Muito baixo	2	18,2	1	5,6
<b>WPSS</b>	Baixo	7	63,6	8	44,4
	Intermediário	2	18,2	7	38,9
	Alto	0	0,0	2	11,1
<b>Classificação OMS 2008</b>					
<b>WHO (2008)</b>	CRDU	3	20	2	7,14
	ARSA	2	13,3	6	21,43
	CRDM	8	53,3	13	46,43
	AREB I	0	0,0	3	10,71
	AREB II	0	0,0	3	10,71
	Síndrome 5q	0	0,0	1	3,6
	LMMc	1	6,7	0	0,0
	SMD relacionada à terapia	1	6,7	0	0,0
	<b>Formas SMD</b>	Baixo risco	13	100,0	22
	Alto risco	0	0,0	6	21,4
<b>Dep .transfusional</b>	Sim	0	0,0	21	75,0
	Não	15	100,0	7	25,0

\*Cariótipos com metáfase.

Fonte: banco de dados dos pacientes com SMD do laboratório de Citogenômica do câncer da UFC

Conforme a tabela 2, estão descritos os pontos de corte disponibilizados pelo software Cutoff Finder para cada gene e sua associação entre perfil de expressão e a resposta ao tratamento com EPO.

**Tabela 2: Caracterização dos *cutoffs* na análise de associação entre os níveis de expressão dos genes *AURKA*, *AURKB*, *TPX2*, *MAD2*, *CDC20* e *CDKN1A*(p21) e pacientes com SMD que fizeram uso de EPO**

Gene	Cutoff*	Faixa**		p
		Superior	Inferior	
<i>AURKA</i>	0,001539	27 (62,8%)	16 (37,2%)	<b>0,023</b>
<i>AURKB</i>	0,002585	26 (60,5%)	17 (39,5%)	<b>0,02</b>
<i>TPX2</i>	0,01377	17 (39,5%)	26 (60,5%)	<b>0,21</b>
<i>MAD2</i>	0,01358	17 (39,5%)	26 (60,5%)	<b>0,21</b>
<i>CDC20</i>	0,01354	15 (34,9%)	28 (65,1%)	<b>0,09</b>
<i>CDKN1A</i>	0.001944	33 (76,7%)	10 (23,3%)	<b>0,28</b>

\* Algoritmo estabelecido pelo software *Cutoff Finder*

\*\* Faixas de pacientes com os níveis de expressão superior ou inferior ao *cutoff* estabelecida

## 4.2 Análise de associação entre o nível de expressão de genes relacionados ao controle do fuso mitótico e do ciclo celular e a resposta ao tratamento com EPO em pacientes com SMD.

As análises de comparações de médias entre os níveis de expressão dos genes *AURKA*, *AURKB*, *TPX2*, *MAD2*, *CDC20* e *CDKN1A* nos pacientes com SMD que responderam, ou não ao tratamento com EPO serão apresentadas nas seções a seguir.

Para a verificação das associações entre os níveis de expressão dos referidos genes e a resposta ao tratamento com EPO nos pacientes com SMD, foi definido o *cutoff point* (**Tabela 2**) baseando-se no algoritmo estabelecido pelo software *Cutoff Finder*® de cada perfil de expressão, individualmente. A partir desta análise foi possível obter:

1º) um gráfico do tipo histograma, que estratifica os pacientes de acordo com o perfil de expressão, frente ao *cutoff point*;

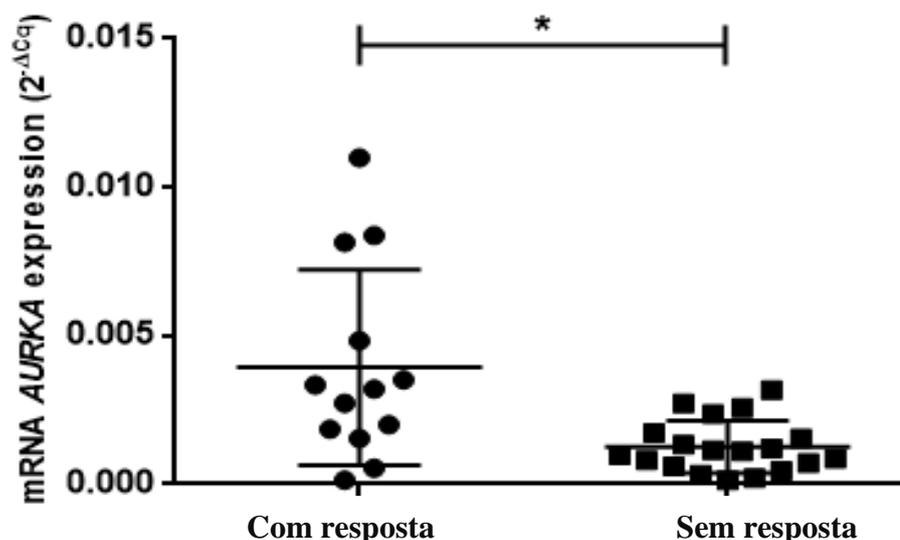
2º) um gráfico do tipo *Waterfall plot*, que caracteriza a importância da associação entre o nível de expressão gênica e a variável dicotômica de resposta ou não ao tratamento com EPO.

Para uma melhor compreensão, os resultados serão demonstrados individualmente para cada gene do estudo.

### 4.2.1. Análise do nível de expressão do gene *AURKA*

Para o gene *AURKA*, identificamos que pacientes que responderam ao tratamento com EPO apresentaram um aumento de expressão desse gene em relação aos pacientes que não responderam ( $p=0.013$ ; IC= 0.0006583792 - 0,0046972062).

**Figura 8:** Nível de expressão do gene *AURKA* em pacientes com SMD quanto a resposta ao tratamento com EPO.

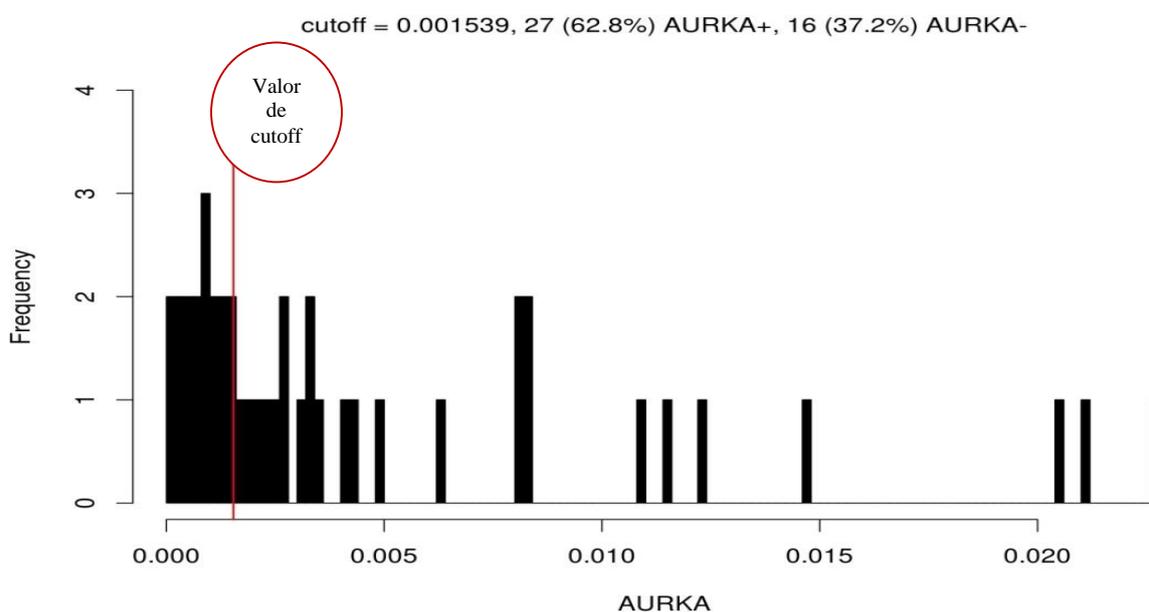


		Nível de Expressão ( $\Delta Cq$ )						Teste de Levene	p-valor†
		N	%	Média	Desvio Padrão	Mínimo	Máximo		
Resposta a EPO	Sim	13	40,62	0,00394	0,00329	0,000139	0,010997	0.000	<b>0.013</b>
	Não	19	59,38	0,00126	0,00088	0,000133	0,003171		

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

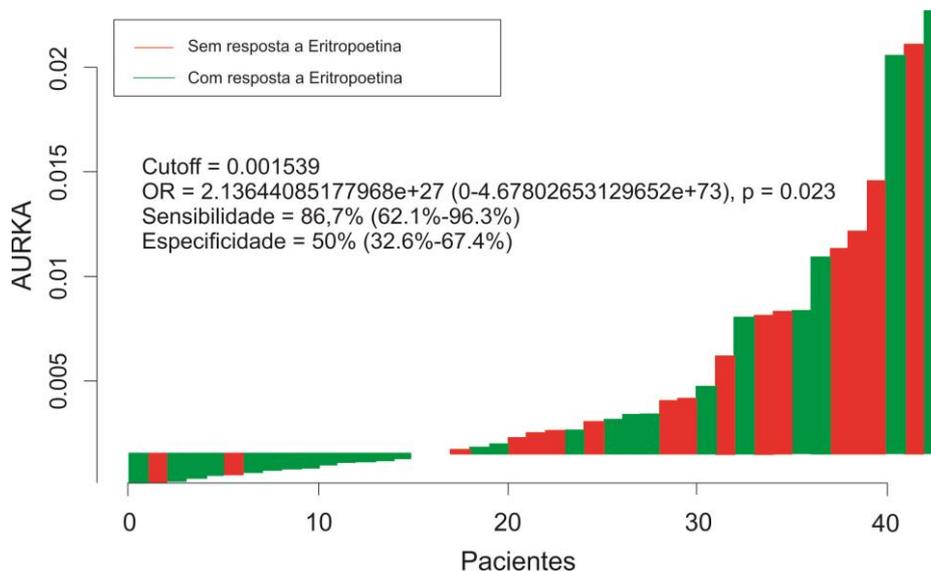
Inicialmente, quanto às análises pelo *Cutoff Finder*, ao avaliarmos a estratificação dos casos pelo gráfico de histograma (**Figura 8**), foi identificado que, a partir do cutoff point de 0,001539, observamos que 27 (62,8%) casos apresentaram um aumento de expressão ( $>0,001539$ ) e 16 (37,2%) casos apresentaram expressão diminuída ( $<0,001539$ )(**Figura 9**).

**Figura 9: Estratificação dos casos de acordo com o perfil de expressão do gene *AURKA* e o respectivo *cutoff point*, identificado pela linha vermelha no histograma.**



Na avaliação do gráfico *Waterfall plot*, através do teste *Fit of mixture model*, estabelecido pelo software *Cutoff Finder*, identificamos uma importante associação entre o perfil de expressão do gene *AURKA* e a resposta ao tratamento com EPO no paciente com SMD ( $p=0.023$ ;  $OR= 2.14e+27$ ;  $IC= 0 - 4.69e+73$ ) (**Figura 10**).

**Figura 10: Análise de associação entre o perfil de expressão do gene *AURKA* e a resposta ao tratamento com EPO no paciente com SMD, de acordo com o *cutoff point*.**



A partir desta análise significativa, os pacientes foram estratificados de acordo com seu perfil de expressão em duas categorias:

1. pacientes que responderam, ou não, ao tratamento com EPO, apresentando aumento de expressão do gene *AURKA* (cutoff point  $>0,001539$ ); e 2. pacientes que responderam, ou não, ao tratamento com EPO, apresentando diminuição de expressão do gene *AURKA* (cutoff point  $<0,001539$ ) (**Figura 10**)

Ao estratificarmos a amostra, observamos que 26 pacientes apresentaram aumento de expressão, sendo 12 casos com resposta a EPO e 14 casos sem resposta a EPO. Para os 17 pacientes que apresentaram diminuição de expressão de *AURKA*, 3 casos apresentaram resposta a EPO e 14 casos não responderam.

A partir desta estratificação, foi realizado o teste de associação de qui-quadrado, no qual foi observado que houve uma associação ( $p=0.05$ ) entre a expressão de *AURKA* e a resposta ao tratamento com EPO, demonstrando que pacientes que apresentaram um aumento de expressão de *AURKA* estão associados a um aumento de chance significativo de responder à EPO ( $p=0.064$ ; OR= 4.000; IC= 0.923 - 17.329) (**Tabela 3**).

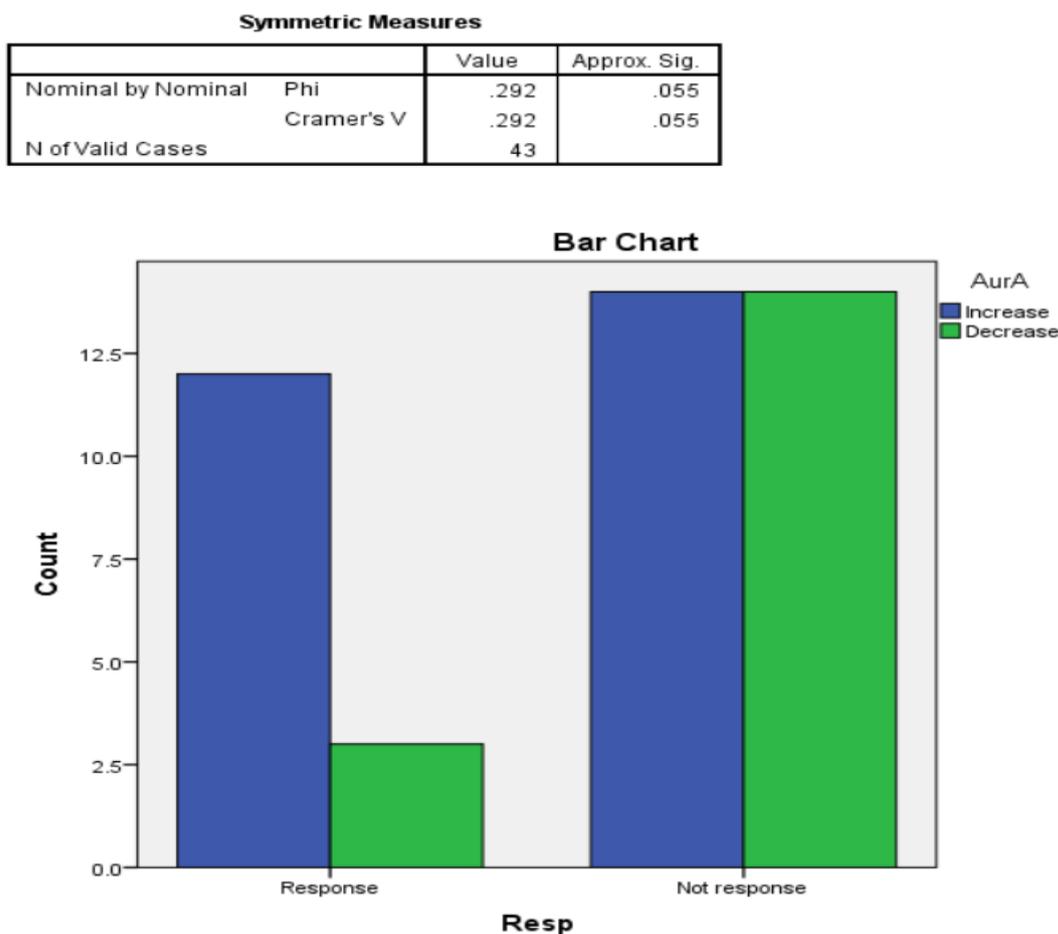
**Tabela 3: Identificação da razão de chances da associação entre o perfil de expressão do gene *AURKA* e a resposta ao tratamento com EPO no paciente com SMD, de acordo com o cutoff**

Tratamento com EPO	Tipo de resposta	Expressão de <i>AURKA</i>		$\chi^2$	Regressão Logística Multinomial				
		Aumento	Diminuição		p-valor	Wal d	OR	IC 95%	
								Mín	Máx
	Com resposta	12 (46,2)	3 (17,6)	<b>0,05</b>	0.064	3.435	4.00	0.923	17.329
	Sem resposta	14 (53,8)	14 (82,4)						

Valor estatisticamente significativo para  $p \leq 0,05$ .

Ao analisarmos as variáveis foi observado a associação estatisticamente significativa entre os pacientes que responderam a EPO e apresentaram aumento de expressão de *AURK A* ( $p = 0,055$ ), mostrando uma associação destas variáveis pelo método de Phi e Cramer's V (0,292) (Figura 11).

**Figura 11 : Resposta a EPO em pacientes com SMD em relação à *AURKA*.**



Teste de associação Phi e Cramer's V.

Por fim, ainda a partir da estratificação realizada, foram obtidas associações importantes entre o perfil de expressão do gene *AURKA* e as variáveis clínico laboratoriais do paciente com SMD. Dentre todas as variáveis analisadas (sessão 4.3), foi identificado que o aumento de expressão de *AURKA* está associado a um aumento de chance do paciente com SMD apresentar 1 (uma) citopenia ( $p=0,030$ ;  $OR=0,205$ ;  $IC=0,049 - 0,854$ ), ter cariótipo normal ( $p=0,037$ ;  $OR=6,333$ ;  $IC=1,114 - 35,997$ ); não ser dependente transfusional ( $p=0,025$ ;  $OR=4,533$ ;  $IC=1,212 - 16,963$ ) e estar vivo ( $p=0,017$ ;  $OR=6,857$ ;  $IC=1,412 - 33,289$ ) (**Tabela 4**).

**Tabela 4: Associação entre a expressão do gene *AURKA*, estratificado de acordo com o *cutoff point*, e as variáveis clínico-laboratoriais dos pacientes com SMD.**

VARIÁVEL	SUB-GRUPO	EXPRESSÃO		X <sup>2</sup>	REGRESSÃO LOGÍSTICA MULTINOMINAL**				
		CASOS (N/%)			p	Wald	OR	IC 95%	
		Aumento (26)	Diminuição (17)					Mín	Máx
<b>VARIÁVEIS SÓCIO DEMOGRÁFICAS</b>									
Gênero	Masculino	10 (38,5)	11 (64,7)	0,124	-	-	-	-	-
	Feminino	16 (61,5)	6 (35,3)		-	-	-	-	-
Idade	<60a	6 (23,1)	4 (23,5)	1,0	-	-	-	-	-
	>60a	20 (76,9)	13 (76,5)		-	-	-	-	-
Idade categorizada	<= 60a	6 (23,1)	4 (23,5)	0,395	-	-	-	-	-
	>60-70a	6 (23,1)	5 (29,4)		-	-	-	-	-
	>70-80a	9 (34,6)	2 (11,8)		-	-	-	-	-
	>80a	5 (19,2)	6 (35,3)		-	-	-	-	-
Origem	Urbano	16 (66,7)	9 (56,2)	0,740	-	-	-	-	-
	Rural	8 (33,3)	7 (43,8)		-	-	-	-	-
<b>ACHADOS DE MEDULA ÓSSEA</b>									
Celularidade da medula óssea	Hipo	2 (8,7)	1 (7,1)	0,865	-	-	-	-	-
	Normo	5 (21,7)	4 (28,6)		-	-	-	-	-
	Hiper	16 (69,6)	9 (64,3)		-	-	-	-	-
Fibrose	Ausente	17 (73,9)	11(78,6)	1,0	-	-	-	-	-
	Presente	6 (26,1)	3 (21,4)		-	-	-	-	-
Displasias da medula óssea	1	10 (41,7)	5 (31,3)	0,597	-	-	-	-	-
	2	10 (41,7)	6 (37,5)		-	-	-	-	-
	3	4 (16,6)	5 (31,2)		-	-	-	-	-
Diseritropoiese	Sim	24 (100)	15 (93,8)	0,400	-	-	-	-	-
	Não	0 (0)	1 (6,3)		-	-	-	-	-
Disgranulopoiese	Sim	10 (41,7)	9 (56,2)	0,520	-	-	-	-	-
	Não	14 (58,3)	7 (43,8)		-	-	-	-	-
Dismegacariopoiese	Sim	8 (33,3)	8 (50,0)	0,339	-	-	-	-	-
	Não	16 (66,7)	8 (50,0)		-	-	-	-	-
% Sideroblastos em anel	0%	16 (64,0)	13 (81,3)	0,110	-	-	-	-	-
	1-14%	0 (0)	1(6,2)		-	-	-	-	-
	>15%	9 (36,0)	2 (12,5)		-	-	-	-	-
% Blastos mo	<10%	23 (92,0)	15 (88,2)	1,00	-	-	-	-	-
	>10%	2 (8,0)	2 (11,8)		-	-	-	-	-
<b>ACHADOS NO SANGUE PERIFÉRICO</b>									
Hemoglobina IPSS-R	>= 10	10 (38,5)	2 (11,8)	0,095	-	-	-	-	-
	8-10	7 (26,9)	4 (23,5)		-	-	-	-	-
	<8	9 (34,6)	11 (64,7)		-	-	-	-	-
ANC (neutrófilos)	<0,8	6 (23,1)	7 (41,2)	0,310	-	-	-	-	-
	>=0,8	20 (76,9)	10 (58,8)		-	-	-	-	-
	<=50	5 (19,2)	6 (35,3)		0,295	-	-	-	-
Plaquetas	>50	21(80,8)	11(64,7)	-		-	-	-	
Citopenias	0-1	22 (84,6)	9 (52,9)	<b>0,037</b>	<b>0,030</b>	<b>4,738</b>	<b>0,205</b>	<b>0,049</b>	<b>0,854</b>
	2-3	4 (15,4)	8 (47,1)		<b>0,030</b>	<b>4,738</b>	<b>4,889</b>	<b>1,1171</b>	<b>20,408</b>
<b>CARACTERIZAÇÃO CITOGENÉTICA E IMPACTO PROGNÓSTICO</b>									
Cariótipo	Normal	19 (86,4)	5 (50,0)	<b>0,028</b>	<b>0,037</b>	<b>4,335</b>	<b>6,333</b>	<b>1,114</b>	<b>35,997</b>
	Alterado	3 (13,6)	5 (50,0)		<b>0,037</b>	<b>4,335</b>	<b>0,158</b>	<b>0,28</b>	<b>0,897</b>
Cariótipo (aneuploidia)	Normal	19 (86,4)	5 (50,0)	0,089	-	-	-	-	-
	Com aneuplo	2 (9,1)	2 (20,0)		-	-	-	-	-
	Sem aneuplo	1(4,5)	3 (30,0)		-	-	-	-	-
Cariótipo (alteração 5q)	Normal	19 (86,4)	5 (50,0)	0,089	-	-	-	-	-
	Com alt.5q	1(4,5)	3 (30,0)		-	-	-	-	-
	Sem alt.5q	2 (9,1)	2 (20,0)		-	-	-	-	-
Cariótipo (alteração 7q)	Normal	19 (86,4)	5 (50,0)	0,072	-	-	-	-	-
	Alt. Sem 7q	3( 13,6)	5 (50,0)		-	-	-	-	-

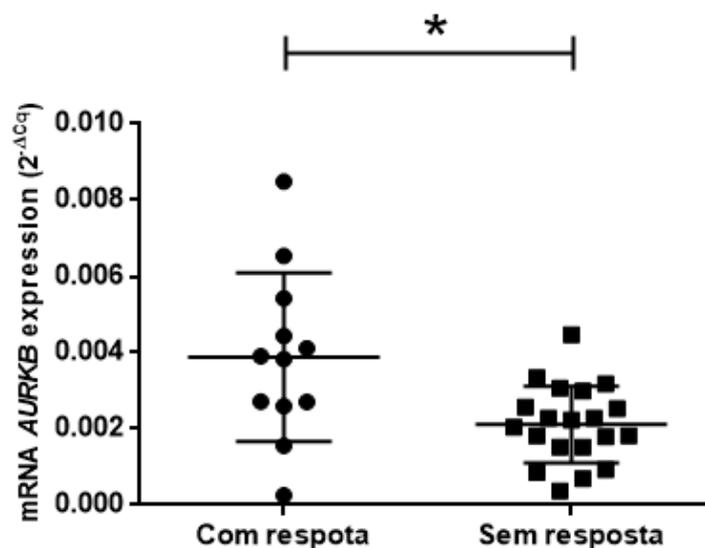
Cariótipo complexo	Normal	19 (86,4)	5 (50,0)	0,080	-	-	-	-	-
	1 alterações	2 (9,1)	2 (20,0)		-	-	-	-	-
	2 alterações	1 (4,5)	1 (10,0)		-	-	-	-	-
	3 alterações	0 (0,0)	2 (20,0)		-	-	-	-	-
Prognóstico IPSS-R	Favorável	19 (90,5)	6 (66,7)	0,219	-	-	-	-	-
	Intermediário	2 (9,5)	2 (22,2)		-	-	-	-	-
	Muito desfavorável	0 (0,0)	1 (11,1)		-	-	-	-	-
	Muito baixo	5 (23,8)	0 (0,0)		-	-	-	-	-
Grupo de risco IPSS-R	Baixo	11 (52,4)	4 (44,5)	0,257	-	-	-	-	-
	Intermediário	4 (19)	3 (33,3)		-	-	-	-	-
	Alto	1 (4,8)	1 (11,1)		-	-	-	-	-
	Muito alto	0 (0,0)	1 (11,1)		-	-	-	-	-
<b>CLASSIFICAÇÃO OMS 2008</b>									
WHO 2008	CRDU	4(15,4)	1(6,7)	0,713	-	-	-	-	-
	ARSA	7 (27,0)	2(13,3)		-	-	-	-	-
	CRDM	11(42,3)	8(53,3)		-	-	-	-	-
	AREB I	2(7,7)	1(6,7)		-	-	-	-	-
	AREB II	1(3,8)	2(13,3)		-	-	-	-	-
	Síndrome 5q	0(0,0)	1(6,7)		-	-	-	-	-
	SMD relacionada a terapia	1(3,8)	0 (0,0)		-	-	-	-	-
	LMMC	0 (0,0)	1(5,9)		-	-	-	-	-
Formas de SMD	iniciais	22 (88)	13 (81,2)	0,662	-	-	-	-	-
	avanzadas	13 (12,0)	3 (18,8)		-	-	-	-	-
Dependência transfusional	Sim	9 (34,6)	12 (70,6)	<b>0,031</b>	<b>0,025</b>	5,040	0,221	0,059	0,825
	Não	17 (65,4)	5 (29,4)		<b>0,025</b>	5,040	4,533	1,212	16,963
Tratamento com EPO	Com resposta	12(46,2)	3(17,6)	<b>0,05</b>	<b>0,064</b>	3,435	4	0,923	17,329
	Sem resposta	14 (53,8)	14 (82,4)		<b>0,064</b>	3,435	4	0,058	1,083
Óbito	Sim	3 (15,8)	9 (56,2)	<b>0,017</b>	<b>0,017</b>	5,704	0,146	0,030	0,708
	Não	16 (84,2)	7 (43,8)		<b>0,017</b>	5,704	6,857	1,412	33,289
Evolução para LMA	Sim	1 (4,0)	4 (23,5)	0,055	-	-	-	-	-
	Não	24 (96,0)	13 (76,5)		-	-	-	-	-

Valor estatisticamente significativo para  $p \leq 0,05$ . Teste Qui-quadrado e Regressão logística multinomial.

#### 4.2.2 Análise do nível de expressão do gene *AURKB*

Para o gene *AURKB*, identificamos que pacientes que responderam ao tratamento com EPO apresentaram um aumento de expressão em relação aos pacientes que não responderam a EPO ( $p=0,021$ ; IC= 0.0006583792 - 0,0046972062) (**Figura 12**).

Figura 12: Nível de expressão do gene *AURKB* em pacientes com SMD quanto a resposta ao tratamento com EPO.

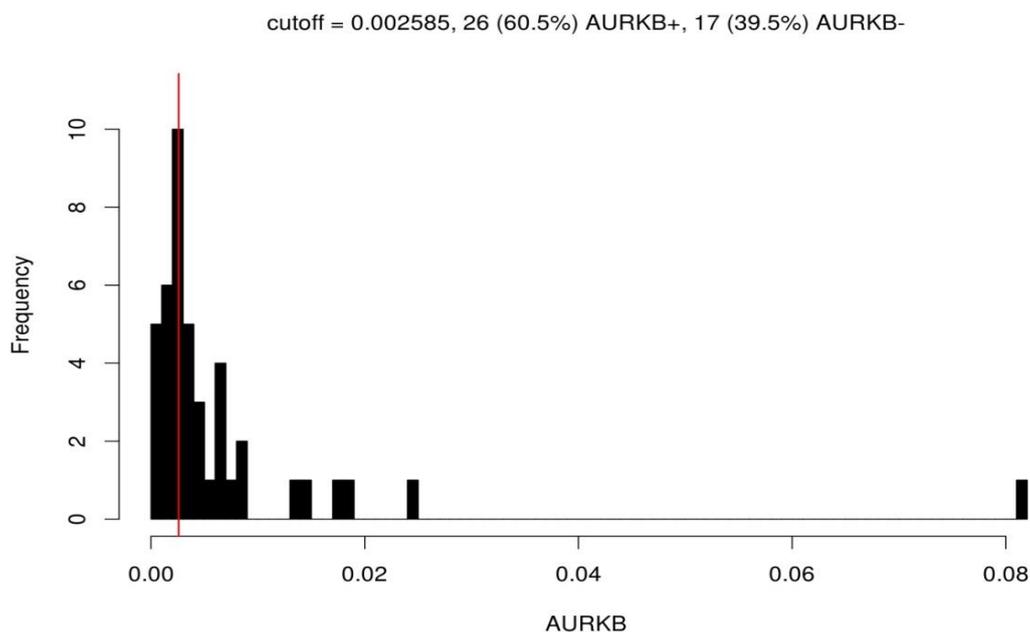


		Nível de Expressão ( $\Delta Cq$ )						Teste de Levene	p-valor†
		N	%	Média	Desvio Padrão	Mínimo	Máximo		
<b>Resposta a EPO</b>	<b>Sim</b>	12	37,5	0,003877	0,002216	0,000251	0,008488	0.032	<b>0.021</b>
	<b>Não</b>	20	62,5	0,002115	0,001008	0,000370	0,004469		

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

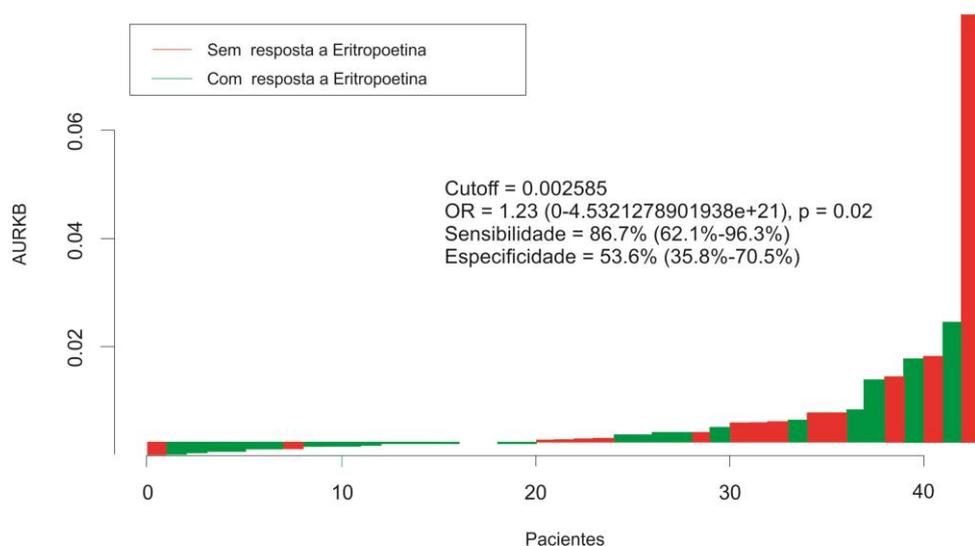
Quanto às análises pelo *Cutoff Finder*, inicialmente, na avaliação da estratificação dos casos pelo gráfico de histograma foi identificado que, a partir do cutoff point de 0,002585 observamos que 26 (62,8%) casos apresentam um aumento de expressão ( $>0,002585$ ) e 17 (37,2%) apresentaram diminuição de expressão ( $<0,002585$ ), ficando abaixo desse valor (**Figura 13**).

**Figura 13: Estratificação dos casos de acordo com o perfil de expressão do gene *AURKB* e o respectivo *cutoff point*, identificado pela linha vermelha no histograma**



Na análise do gráfico *Whatterfall plot*, pela análise do teste *Fit of mixture model*, estabelecido pelo software *Cutoff Finder*, identificamos uma importante associação entre o perfil de expressão do gene *AURKB* e a resposta ao tratamento com EPO no paciente com SMD ( $p=0.02$ ; OR= 1,23; IC= 0 - 4.532+21) (**Figura 13**)

**Figura 14: Análise de associação entre o perfil de expressão do gene *AURKB* e a resposta ao tratamento com EPO no paciente com SMD, de acordo com o *cutoff point*.**



A partir desta análise significativa, os pacientes foram estratificados de acordo com seu perfil de expressão em duas categorias: 1. pacientes que responderam, ou não, ao tratamento com EPO, apresentando aumento de expressão do gene *AURKB* (cutoff point  $>0,002585$ ); e 2. pacientes que responderam, ou não, ao tratamento com EPO, apresentando diminuição de expressão do gene *AURKB* (cutoff point  $<0,002585$ ).

Nesta estratificação, observamos que 26 pacientes apresentaram aumento de expressão, sendo 12 casos com resposta a EPO e 14 casos sem resposta a EPO. Além disto, identificamos que 17 pacientes apresentaram diminuição de expressão do gene *AURKB*, sendo que 3 casos responderem a EPO e 14 casos não responderam ao tratamento.

Partindo desses dados, foi realizado o teste de associação de qui-quadrado, no qual observou-se que houve uma associação importante ( $p=0.023$ ) entre a expressão de *AURKB* e a resposta à EPO, demonstrando que pacientes que apresentaram um aumento de expressão de *AURKB* estão associados a um aumento de chance significativo de responder à EPO ( $p=0.027$ ; OR= 6,5; IC= 1,232- 34,282) (**Tabela 10**).

**Tabela 5: Identificação da razão de chances da associação entre o perfil de expressão do gene *AURKB* e a resposta ao tratamento com EPO no paciente com SMD, de acordo com o *cutoff point***

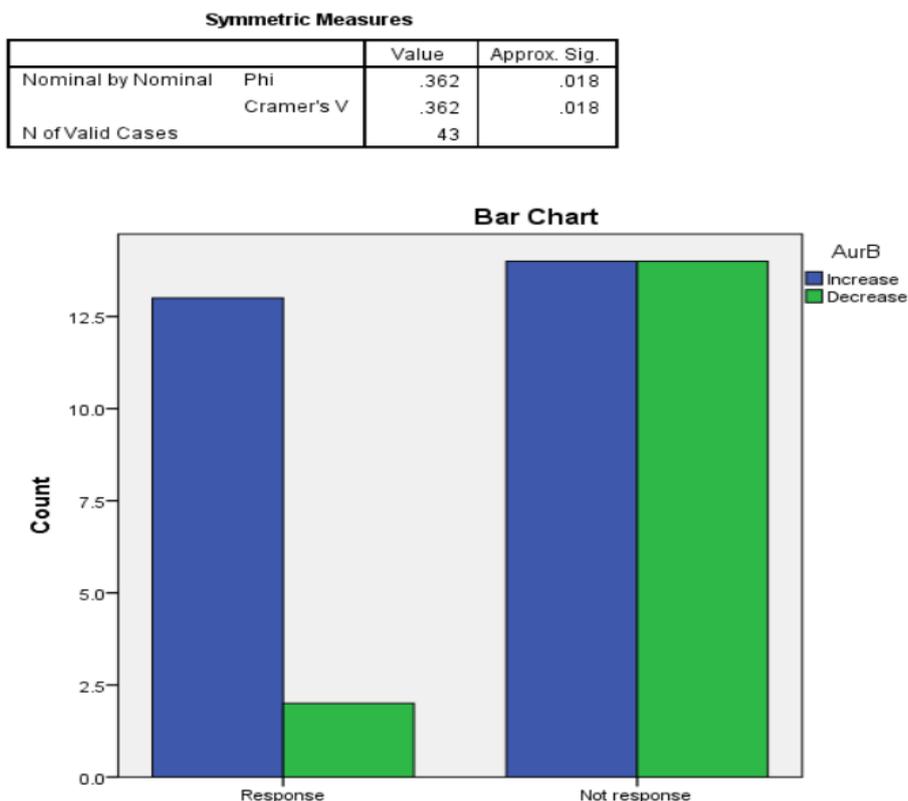
Tratamento com EPO	Tipo de resposta	Expressão de <i>AURKB</i>		$\chi^2$	Regressão Logística Multinomial				
		Aumento (N=27)	Diminuição (N=16)		p-value	Wald	OR	IC 95%	
								Mínimo	Máximo
	Com resposta	13(30,2)	2(4,7)	<b>0,023</b>	<b>0,027</b>	4,868	6,5	1,232	34,282
	Sem resposta	14(32,6)	14(32,6)		<b>0,027</b>	4,868	0,154	0,029	0,811

Valor estatisticamente significativo para  $p \leq 0,05$ .

Por fim, ainda a partir da estratificação realizada, foi obtida associação importante entre o perfil de expressão do gene *AURKB* e a variável clínico laboratorial referente á resposta à Eritropoetina (EPO) do paciente com SMD. Foi identificado que o aumento de expressão de *AURKB* está associado a um aumento de chance do paciente com SMD responder ao tratamento ( $p=0,027$ ; OR= 6,5; IC= 1,232 – 34,282) (Tabela 11).

Ao analisarmos as variáveis foi observado uma associação estatisticamente significativa entre os pacientes que responderam a EPO e apresentaram aumento de expressão de *AURK B* ( $p = 0,018$ ), mostrando uma forte associação entre estas variáveis pelo método de Phi e Cramer's V (0,362) (Figura 15)

**Figura 15 : Resposta a EPO em pacientes com SMD em relação a *AURK B***



Teste de associação Phi e Cramer's V.

Por fim, ainda a partir da estratificação realizada, foi obtida associação importante entre o perfil de expressão do gene *AURK B* e a variável clínico laboratorial referente á resposta à Eritropoetina (EPO) do paciente com SMD. Foi identificado que o aumento de expressão de *AURKB* está associado a um aumento de chance do paciente com SMD responder ao tratamento ( $p=0,027$ ; OR= 6,5; IC= 1,232 – 34,282) (**Tabela 5**).

**Tabela 6: Associação entre a expressão do gene *AURKB*, estratificado de acordo com o cutoff point, e as variáveis clínico-laboratoriais dos pacientes com SMD.**

Variável	Sub-grupo	Expressão Casos (n/%)		Regressão Logística Multinomial** IC 95%				
		Aumento (27)	Diminuição (16)	P- value	Wald	OR	Mínimo	Máximo
<b>VARIÁVEIS SOCIO DEMOGRÁFICAS</b>								
<b>Gênero</b>	Masculino	12(44,4)	9(56,2)	-	-	-	-	-
	Feminino	15(55,6)	7(43,8)	-	-	-	-	-
<b>Idade</b>	<60a	5(18,5)	5(31,2)	-	-	-	-	-
	>60a	22(81,5)	11(68,8)	-	-	-	-	-
<b>Idade categorizada</b>	<= 60a	5(18,6)	5(31,3)	-	-	-	-	-
	>60-70a	7(25,9)	4(25,0)	-	-	-	-	-
	>70-80a	8(29,6)	3(18,7)	-	-	-	-	-
	>80a	7(25,9)	4(25,0)	-	-	-	-	-
<b>Origem</b>	Urbano	14(53,8)	11(78,6)	-	-	-	-	-
	Rural	12(46,2)	3(21,4)	-	-	-	-	-
<b>ACHADOS DA MEDULA ÓSSEA</b>								
<b>Celularidade da medula óssea</b>	Hipo	1(4,1)	2(15,3)	-	-	-	-	-
	Normo	4(16,7)	5(38,5)	-	-	-	-	-
	Hiper	19(79,2)	6(46,2)	-	-	-	-	-
<b>Fibrose de medula óssea</b>	Presente	6(25,0)	3(23,1)	-	-	-	-	-
	Ausente	18(75,0)	10(76,9)	-	-	-	-	-
<b>Displasias da medula óssea</b>	1	11(42,3)	4(28,6)	-	-	-	-	-
	2	9(34,6)	7(50,0)	-	-	-	-	-
	3	6(23,1)	3(21,4)	-	-	-	-	-
<b>Diseritropoiese</b>	Sim	26(100)	13(92,9)	-	-	-	-	-
	Não	0(0,0)	1(7,1)	-	-	-	-	-
<b>Disgranulopoiese</b>	Sim	12(46,15)	7(50,0)	-	-	-	-	-
	Não	14(53,85)	7(50,0)	-	-	-	-	-
<b>Dismegacariopoiese</b>	Sim	9(34,6)	7(50,0)	-	-	-	-	-
	Não	17(65,4)	7(50,0)	-	-	-	-	-
	0%	18(69,23)	11(73,3)	-	-	-	-	-
<b>Sideroblastos em anel</b>	1-14%	1(3,85)	0 (0,0)	-	-	-	-	-
	>15%	7(26,92)	4(26,7)	-	-	-	-	-
	<10%	24(92,3)	14(87,5)	-	-	-	-	-
<b>% Blasto mo</b>	>10%	2(7,7)	2(12,5)	-	-	-	-	-
<b>ACHADOS DO SANGUE PERIFÉRICO</b>								
<b>Hemoglobina IPSS-R</b>	>= 10	9(33,3)	3(18,7)	-	-	-	-	-
	8-10	6(22,2)	5(31,3)	-	-	-	-	-
	<8	12(44,5)	8(50,0)	-	-	-	-	-
<b>ANC IPSS-R</b>	<0,8	6(22,2)	7(43,8)	-	-	-	-	-
	>=0,8	21(77,8)	9(56,2)	-	-	-	-	-
	>=100	15(55,6)	10(62,5)	-	-	-	-	-
<b>Plaqueta IPSS-R</b>	50-<100	5(18,5)	2(12,5)	-	-	-	-	-
	<50	7(25,9)	4(25,0)	-	-	-	-	-
<b>Citopenias no sangue periférico</b>	0/1	21(77,7)	10(62,5)	-	-	-	-	-
	2/3	6(22,3)	6(37,5)	-	-	-	-	-
<b>CARACTERIZAÇÃO CITOGENÉTICA E PROGNÓSTICA</b>								
<b>Cariótipo</b>	Normal	15(71,43)	9(81,8)	-	-	-	-	-
	Alterado	6(28,57)	2(18,2)	-	-	-	-	-
<b>Cariótipo (aneuploidia)</b>	Normal	15(71,5)	9(81,8)	-	-	-	-	-
	Com aneuplo	4(19,0)	0(0,0)	-	-	-	-	-
	Sem aneuplo	2(9,5)	2(18,2)	-	-	-	-	-
<b>Cariótipo (alteração 5q)</b>	Normal	15(71,5)	9(81,8)	-	-	-	-	-
	Com alt.5q	2(9,5)	2(18,2)	-	-	-	-	-
	Sem alt.5q	4(19,0)	0(0,0)	-	-	-	-	-
<b>Cariótipo (alteração 7q)</b>	Normal	15(71,5)	9(81,8)	-	-	-	-	-
	Alt. Sem 7q	6(28,5)	2(18,2)	-	-	-	-	-
	Normal	15(71,5)	9(81,8)	-	-	-	-	-

<b>Cariótipo complexo</b>	c/ 1 alter	2(9,5)	2(18,2)	-	-	-	-	-
	c/2 alter	2(9,5)	0(0,0)	-	-	-	-	-
	Compl./3 alter	2(9,5)	0(0,0)	-	-	-	-	-
<b>Prognóstico IPSS-R</b>	Favorável	15(75,0)	10(100,0)	-	-	-	-	-
	Intermediário	4(20,0)	0(0,0)	-	-	-	-	-
	Muito desfav	1(5,0)	0(0,0)	-	-	-	-	-
	Muito baixo	4(13,3)	1(3,3)	-	-	-	-	-
<b>Grupo de risco IPSS-R</b>	Baixo	10(33,3)	5(16,7)	-	-	-	-	-
	Intermediário	4(13,3)	3(10,0)	-	-	-	-	-
	Alto	1(3,3)	1(3,3)	-	-	-	-	-
	Muito alto	1(3,3)	0(0,0)	-	-	-	-	-
<b>CLASSIFICAÇÃO OMS 2008</b>								
<b>WHO 2008</b>	CRDU	4 (14,81)	1(6,25)	-	-	-	-	-
	ARSA	6 (22,22)	2 (12,5)	-	-	-	-	-
	CRDM	13(48,14)	8(50,0)	-	-	-	-	-
	AREB I	1(3,7)	2(12,5)	-	-	-	-	-
	AREB II	2 (7,43)	1(6,25)	-	-	-	-	-
	Síndrome 5q	0 (0,0)	1(6,25)	-	-	-	-	-
	SMD	0 (0,0)	1(6,25)	-	-	-	-	-
<b>Formas de SMD</b>	relacionada a terapia							
	LMMC	1(3,7)	0	-	-	-	-	-
	iniciais	23(88,46)	12(80,0)	-	-	-	-	-
<b>Dependência transfusional</b>	avanzadas	3(11,54)	3(20,0)	-	-	-	-	-
	Sim	12(27,9)	9(20,9)	-	-	-	-	-
<b>Tratamento com EPO</b>	Não	15(34,9)	7(16,3)	-	-	-	-	-
	Com resposta	13(30,2)	2(4,7)	<b>0,027</b>	4,868	6,5	1,232	34,282
<b>Óbito</b>	Sem resposta	14(32,6)	14(32,6)	<b>0,027</b>	4,868	0,154	0,029	0,811
	Sim	5(14,3)	7(20,0)	-	-	-	-	-
<b>Evolução para LMA</b>	Não	17(48,6)	6(17,1)	-	-	-	-	-
	Sim	2(4,8)	3(7,1)	-	-	-	-	-
	Não	24(57,1)	13(31,0)	-	-	-	-	-

Valor estatisticamente significativo para  $p \leq 0,05$ . Teste Qui-quadrado e Regressão logística multinomial.

4.2.3 Análises dos níveis de expressões dos genes de controle de fuso mitótico (*AURKA, AURKB, TPX2*), dos genes relacionados ao ponto de checagem mitótico (*CDC20 e MAD2*) e reguladores do ciclo celular (*CDKN1A*).

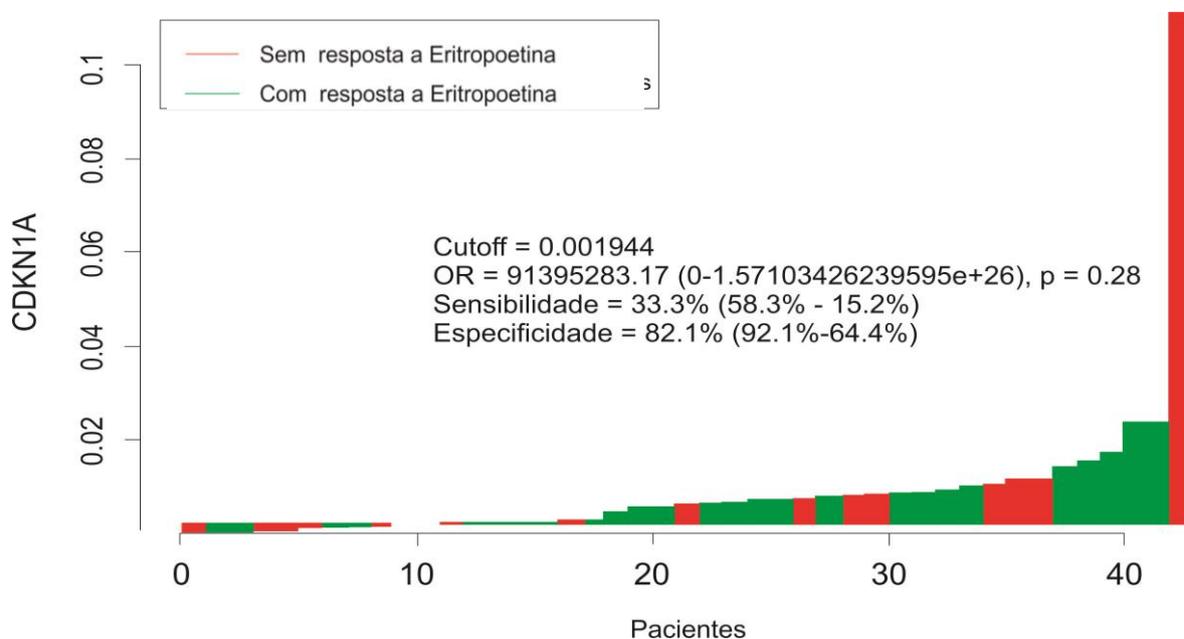
Para os genes *CDKN1A*, *TPX2*, *MAD2* e *CDC20*, não foram identificadas associações significantes entre as médias de expressão destes genes entre os pacientes que responderam ou não tratamento com EPO ( $p > 0,05$ ) (**Tabela 7**).

Por fim, não foram identificadas associações significantes entre o perfil de expressão desses genes frente a resposta ou não ao tratamento com EPO, de acordo com o perfil de expressão estabelecido pelo *Cutoff Finder* (Figura 14,15,16,17). Baseando-se nestes resultados, não foram identificadas associações entre as expressões destes genes e as variáveis clínico-laboratoriais dos pacientes com SMD.

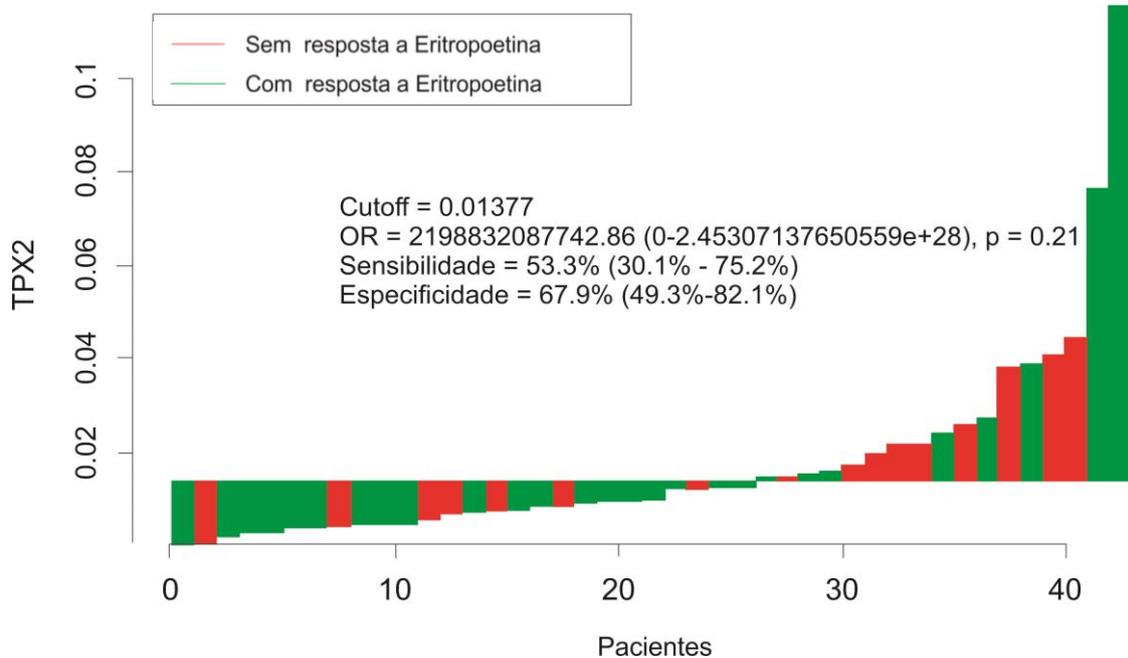
**Tabela 7: Níveis de expressão dos genes *CDKN1A*, *TPX2*, *MAD2* e *CDC20* em pacientes com SMD quanto a resposta ao tratamento com EPO**

		Nível de Expressão <i>CDKN1A</i> ( $\Delta Cq$ )						Teste de Levene	p-valor†
		N	%	Média	Desvio Padrão	Mínimo	Máximo		
Resposta a EPO	Sim	15	34,8	0,012440	0,027590	0,000755	0,111078	0,078	0,346
	Não	28	65,2	0,007270	0,027590	0,000532	0,023806		
		Nível de Expressão <i>TPX2</i> ( $\Delta Cq$ )							
Resposta a EPO	Sim	13	34,2	0,014150	0,010613	0,000906	0,038639	0,141	0,162
	Não	25	65,8	0,010096	0,006850	0,000610	0,026010		
		Nível de Expressão <i>MAD2</i> ( $\Delta Cq$ )							
Resposta a EPO	Sim	14	35	0,014014	0,010246	0,003730	0,035172	0,265	0,439
	Não	26	65	0,011779	0,007627	0,001935	0,034486		
		Nível de Expressão <i>CDC20</i> ( $\Delta Cq$ )							
Resposta a EPO	Sim	15	34,8	0,019519	0,021893	0,000542	0,077830	0,772	0,534
	Não	28	65,2	0,015567	0,018450	0,000486	0,068890		

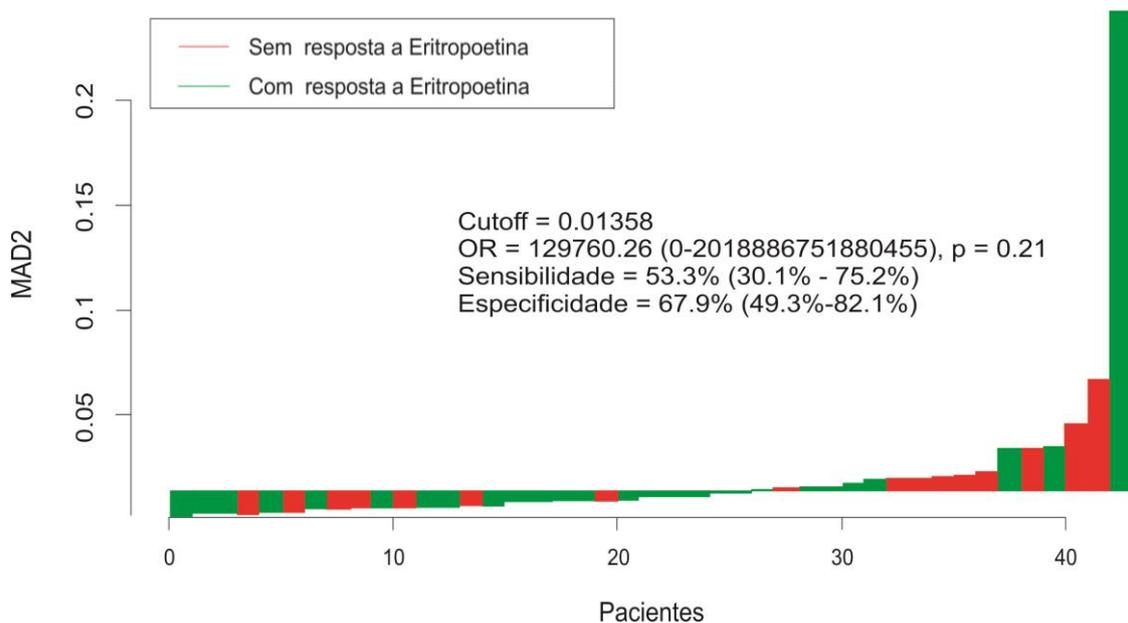
**Figura 16: Análise de associação entre os perfis de expressões do gene *CDKN1A* e a resposta ao tratamento com EPO no paciente com SMD, de acordo com o cutoff point.**



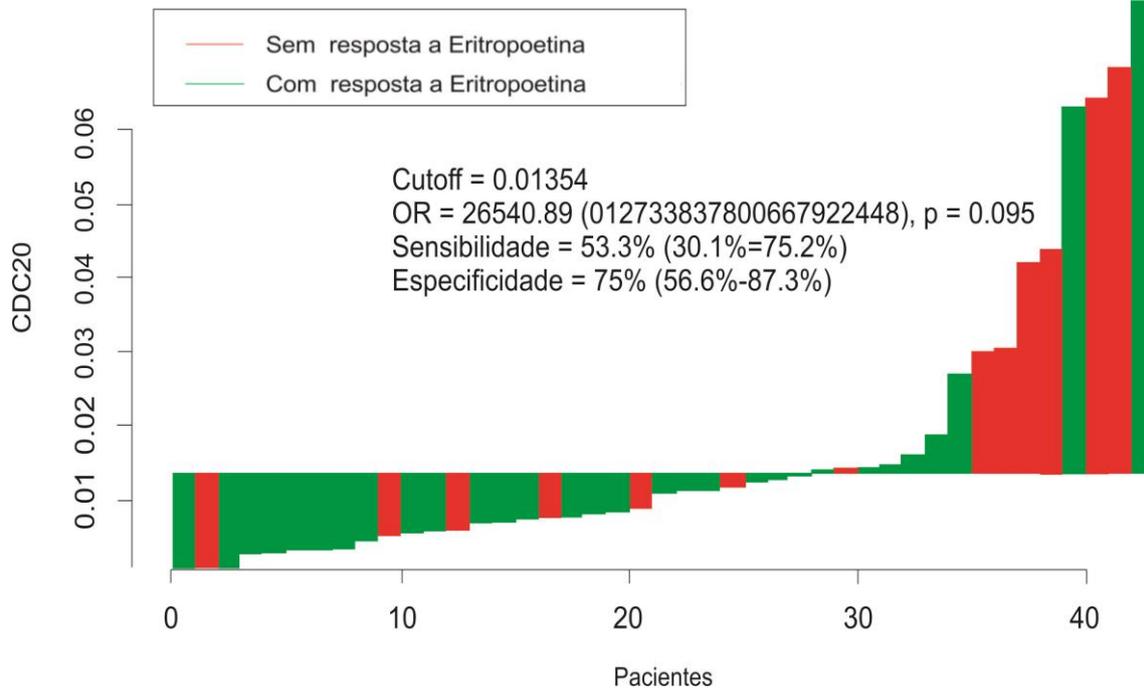
**Figura 17: Análise de associação entre os perfis de expressões do gene *TPX2* e a resposta ao tratamento com EPO no paciente com SMD, de acordo com o cutoff point.**



**Figura 18: Análise de associação entre os perfis de expressões do gene *MAD2* e a resposta ao tratamento com EPO no paciente com SMD, de acordo com o cutoff point.**



**Figura 19: Análise de associação entre os perfis de expressões do gene *CDC20* e a resposta ao tratamento com EPO no paciente com SMD, de acordo com o cutoff point.**



## 5. DISCUSSÃO

O presente estudo buscou avaliar o nível de expressão de 6 genes relacionados ao controle do fuso mitótico (*AURKA, AURKB, TPX2*), ao ponto de checagem mitótico (*MAD2 e CDC20*) e reguladores do ciclo celular (*CDKN1A*) em 43 pacientes com SMD que fizeram uso de Eritropoietina (EPO), correlacionando-os às variáveis clínico-laboratoriais.

Quanto aos achados epidemiológicos, nosso estudo identificou que a média de idade dos pacientes foi de 69,58 anos (mediana = 71 anos, mínimo de 33 e máximo de 89 anos) corroborando com o levantamento proposto por Magalhães et al. (2010) e com o estudo de Belli et al. (2015). Quanto à proporção de pacientes do sexo masculino e feminino, este estudo apresentou uma relação de 1,1:1. Estes dados podem ser confirmados por serem equivalentes aos achados observados nos registros epidemiológicos internacionais sobre SMD que apresentam uma razão masculino/feminino entre 1,1 e 2 (HAASE et al., 2007; BELLI et al., 2015) e ainda com o de Magalhães et al. (2010) que mostrou discreta prevalência do sexo feminino.

Em relação aos achados clínico laboratoriais, os pacientes foram estratificados quanto ao diagnóstico, conforme a classificação OMS 2008, e observou-se um predomínio de casos de CRDM (51,2%), seguido por casos de ARSA (19,5%), CRDU (12,2%), AREB I e II (7,3%), e SMD relacionada à terapia (2,4%). Esses achados corroboram com outros estudos (FERREIRA JÚNIOR, et al., 2013). Entretanto, dados da literatura em relação a essa característica são variáveis, além de muitos deles mostrarem resultados de acordo com a classificação OMS de 2001 (GERMING et al., 2012; HAASE et al., 2007; MALCOVATI et al., 2011). Os pacientes que responderam e não responderam a EPO foram predominantemente categorizados no grupo de CRDM, com 38% (8/14) e 62% (13/26) respectivamente. Esta distribuição por subtipos permite uma previsão relativamente aos grupos de prognóstico, ou seja, o predomínio de doentes com SMD em estádios iniciais corresponde a doentes com índices de prognóstico baixo e intermediário (CORTESÃO et al., 2015).

Em se tratando da classificação prognóstica pelo IPSS-R, a maioria dos pacientes do estudo foram classificados como baixo risco (50%), seguidos de risco intermediário (23,3%), também em concordância com registros nacionais e internacionais (HAASE et al., 2007; MAGALHÃES et al., 2010; MALCOVATI et al., 2011). Tanto os pacientes que

responderam ao tratamento com EPO como os que não mostraram resposta, estavam inclusos no grupo de baixo risco, de acordo com o IPSS-R, com os percentuais de 46,6% (7/11) e 53,4% (8/19) respectivamente.

Quanto à celularidade a maioria dos pacientes portadores de SMD do nosso estudo apresentaram medula hiper celular (67,6 %). A hiper celularidade da medula óssea está relacionada à própria patogênese da doença, na qual a apoptose excessiva, presente nos estágios iniciais da doença é contrabalanceada pelo aumento na proliferação das células progenitoras hematopoéticas. Essas alterações proliferativas podem ser uma característica intrínseca do clone neoplásico ou podem estar relacionadas a interações autócrinas e/ou parácrinas de citocinas. (BERNASCONI, 2008; ISHIBASHI et al., 2011). Os achados do estudo mostrando os pacientes que responderam e não responderam ao tratamento com EPO também apresentaram um perfil de hiper celularidade medular com percentuais de 71,4%(10/14) para resposta e 65,2% (15/23) com ausência de resposta respectivamente.

Em relação à presença de displasias medulares dos pacientes com SMD, observa-se que é um padrão característico da patologia, cujo perfil compreende um fator importante para classificar a doença de maneira mais precisa. Conforme o número de displasias presentes seja na série eritrocítica, granulocítica ou megacariocítica e o grau dessas displasias, considera-se a SMD com um perfil mais agressivo e de pior prognóstico. (BRUNNING et al., 2008; RAUH, 2014). Nossos achados identificaram a presença de diseritropoese em 97,5% dos pacientes (39/40), disgranulopoeise em 47,5% (19/40) seguidos de 40% (16/40) de dismegacariopoeise. A classificação da OMS (BRUNNING et al, 2008) propõe que  $\geq 10\%$  das células mielóides de pacientes com SMD apresentam disgranulopoeise. Entretanto, essa citopenia não foi prevalente nos pacientes do estudo. Segundo PINHEIRO et al., 2006, a presença de disgranulopoeise é comumente associada à presença de deleções no cromossomo 17 (17p-, i17q) em pacientes com SMD. Entretanto, esses achados não foram coincidentes com os do nosso estudo.

Quanto às citopenias, estas foram de menor gravidade. Dos 43 pacientes, 46,5% tinham anemia (valores de Hb menores que 8g/dL). Entretanto, apenas, 13,3% (2/15) responderam ao tratamento com EPO. Em relação às outras citopenias, 69,7% (30/43) não tinham neutropenia (contagem superior a 800 por  $\text{mm}^3$ ), e destes, 86,7% (13/15) responderam ao tratamento. Houve predomínio de pacientes sem plaquetopenia (contagem superior a 100.000/ $\text{mm}^3$ ) em 58,13% (25/43) dos casos.

Em relação á neutropenia e plaquetopenia identificamos que os pacientes que responderam a EPO, correspondiam aos percentuais de 86,6% e 60% para neutrófilos e plaquetas respectivamente. Sabe-se que a SMD é caracterizada por um quadro de anemia grave podendo ser associada com o perfil clínico de neutropenia e/ou plaquetopenia (TEFFERI et al., 2009b; CERRANO et al., 2016). Caso este paciente apresente um quadro de anemia sem associação com outras citopenias (ex. neutropenia e plaquetopenia), a doença será considerada menos agressiva, conforme apresentado nos resultados do estudo (BRUNNING et al., 2008), corroborando com nossos achados.

Em nosso estudo não foi evidenciada a dependência transfusional. Este percentual de não dependência transfusional foi caracterizado, em 51,2% (22/43) dos pacientes. A dependência transfusional foi considerada quando Hb < 9,0 g/dL em homens e < 8,0 g/dL em mulheres (MALCOVATI et al., 2011). Em nossa pesquisa, o critério utilizado para avaliação de dependência transfusional foi a dosagem de hemoglobina. Encontramos que 46,5% dos pacientes apresentavam valor de Hb menores que 8mg/dL, seguidos de 53,5% de valores superiores a 8mg/dL. Dos pacientes que responderam a EPO, apenas 4,6% possuíam valores de Hb inferiores a 8mg/dL se contrapondo a 41,8% dos que não demonstraram resposta ao tratamento.

Observamos também que 100% (15/15) dos pacientes não dependentes, responderam a EPO.

Dos 43 pacientes com resultados de citogenética, 25,5% (11/43) não apresentaram metáfase. Os principais achados quanto à análise citogenética mostraram um predomínio de cariótipos normais em 75% (24/32) dos pacientes contra 25% (8/32) de cariótipos que com alterações. Obtivemos também que esses dados se mostram superiores aos estudos internacionais, como o de Greenberg e colaboradores (1997) em que 60% dos pacientes com avaliação do IPSS apresentavam cariótipo normal e com os estudos de Ades e colaboradores (2014), Bacher e colaboradores (2015) que descrevem que a presença de alterações cromossômicas na SMD é de 40-60%. Nossos dados também foram superiores aos estudos nacionais publicados por PINHEIRO e CHAUFFAILLE (2009), no qual foi observada uma frequência de 35,2% (12/34) e 20,5% (9/44) de alterações citogenéticas, respectivamente. A alta frequência de cariótipos normais no presente estudo (75%), pode estar relacionada que ao fato de que os pacientes desse estudo estão inseridos na classificação de prognóstico favorável, respectivamente, para os índices estabelecidos IPSS-R (GREENBERG et al. 2012), estando de acordo com o estudo de Magalhães et al. (2010).

Em se tratando do perfil citogenético em comparação com a resposta a EPO, 84,6% dos pacientes tinham cariótipo normal. Nas SMD, a presença de cariótipo normal fala a favor de um melhor prognóstico em relação à presença de quaisquer alterações estruturais ou numéricas. Entretanto, a falta dessas alterações citogenéticas no cariótipo nem sempre significa que estas estão ausentes. Assim, é importante definir indicadores biológicos que permitam uma melhor caracterização dos pacientes com cariótipo normal e que possibilitem a identificação dos pacientes com SMD com cariótipo normal em risco de progressão para LMA. Além disso, o cariótipo tem um papel importante no estabelecimento do diagnóstico de SMD, pois durante o curso da doença, a citogenética é utilizada para avaliar a resposta à terapia ou pode identificar a evolução clonal como um sinal de progressão da doença (BACHER et.al., 2015).

Realizamos o primeiro estudo de análise da expressão dos genes de controle de fuso mitótico (*AURKA*, *AURKB* e *TPX2*), de genes relacionados ao ponto de checagem mitótico (*CDC20* e *MAD2*) e reguladores do ciclo celular (*CDKN1A*), avaliando sua associação com as variáveis clínicas dos pacientes com SMD que fizeram uso de Eritropoietina (EPO), dentre elas, a resposta ao tratamento. Os resultados deste estudo serão discutidos de acordo com a categorização dos níveis de expressão dos genes avaliados, correlacionando-os com o agrupamento das associações clínicas significativas apresentadas.

Inicialmente, observamos importantes achados relacionados aos níveis de expressão dos genes *AURKA* e *AURKB* em pacientes com SMD que responderam ou não ao tratamento com EPO. Ao compararmos a média de expressão das auroras, identificamos que o perfil de expressão de *AURKA* ( $p=0,013$ ) e *AURKB* ( $p=0,021$ ) esteve aumentado nos pacientes com SMD que responderam a EPO, quando comparados aos que não responderam. Além disto, foi obtido através do ponto de corte (pelo software *Cutoff Finder*) e da estratificação dos pacientes no grupo com resposta e sem resposta, que o aumento de expressão dos genes *AURKA* ( $p=0,064$ ; OR= 4.000; IC= 0.923 - 17.329) e *AURKB* ( $p=0,027$ ; OR= 6,5; IC= 1,232 – 34,282) está associado a uma maior razão de chance dos pacientes com SMD responderem ao tratamento com Eritropoietina.

Sabe-se que as Auroras Kinases desempenham um papel essencial nos eventos mitóticos, como o monitoramento do *check-point* mitótico, criação do fuso bipolar e o alinhamento dos centrossomos, regulando também a separação deste, a bi-orientação dos cromossomos e a citocinese (MERALDI,2004 ;VEDER,2008), sendo portanto as principais reguladoras do ciclo celular. Qualquer inativação delas pode ocasionar

consequências catastróficas e errôneas nos eventos mitóticos quanto á formação do fuso, alinhamento dos centrossomos e citocinese, resultando em apoptose. Tais alterações podem desencadear, por exemplo, a formação de anormalidades cromossômicas (BORGES et al., 2018).

Estudos recentes do nosso grupo de pesquisa demonstraram associações importantes entre o perfil de expressão gênica das Auroras A e B em pacientes com SMD (HEREDIA et al.,2012; GENGA et al.,2014; BORGES et al., 2016). Contudo, não há relatos de associação desses alvos em pacientes com SMD submetidos á tratamento com EPO.

Compreende-se que os agentes estimuladores da eritropoiese (ESA) são indicados como primeira linha para pacientes com SMD de baixo risco, muito embora vários estudos apontem para que essa terapia não tenha impacto na progressão para LMA, mas seja um fator de prognóstico favorável em relação á sobrevida. Não está esclarecido se a melhora na sobrevida dos pacientes está relacionada ao uso da EPO em si, se há manutenção dos níveis de hemoglobina de 10mg/dL, ou ainda por não haver sobrecarga de ferro (JADERSTEN et al., 2013).

Os agentes estimuladores da eritropoiese atrasam significativamente o início de uma necessidade regular de transfusão em pacientes não transfundidos com síndrome mielodisplásica de baixo risco (GARELIUS et al., 2017). Além disso, esses agentes melhoram a qualidade de vida para pacientes moderadamente anêmicos com níveis de hemoglobina em torno de 7-8 mg / dL (NAKAZAKI et. al,2013). Pacientes sem dependência transfusional são os que melhor respondem ao tratamento com eritropoetina, sendo um fator preditivo de resposta (HELLSTROM-LINDBERG e MALCOVATI, 2008).

Dentre os que responderam ao uso de EPO, observamos que estes apresentavam as seguintes características: possuíam medula hiperclular (61,53%), com uma displasia na medula óssea (41,7%)( predominantemente a diseritropoese (100%)), com ausência de sideroblastos em anel (64%), cariótipo normal (86,4%) e sem evolução para LMA (96%). Clinicamente, tais pacientes eram predominantemente de baixo risco (52,4%) (GREENBERG et al., 2012).

Especulamos que diante do predomínio de pacientes de baixo risco com cariótipo normal, o aumento de expressão das auroras esteja associado a um controle mais efetivo do fuso mitótico no que se refere, principalmente, à ocorrência de alterações citogenéticas

no paciente com SMD, especialmente no que diz respeito ao surgimento das aneuploidias (LIN et. al,2009).

Dado o papel essencial das Auroras na mitose, sua inibição poderia, em princípio, prejudicar a proliferação de qualquer tumor. Isso torna os inibidores da Aurora A potenciais medicamentos universais para o tratamento de neoplasias (MALUMBRES,2014).

Masaki et al.,2014 avaliaram a expressão das quinases que regulam o ciclo celular e identificaram que o aumento de expressão da *AURK B* estava relacionada à resistência a cisplatina e oxaliplatina. Este estudo objetivou elucidar os mecanismos envolvidos na resistência mediada por quinases, sugerindo que os inibidores de *AURK B* superam parcialmente a resistência às platinas. Os resultados indicaram que os inibidores de *AURK B* podem ser novos agentes para o tratamento de células com resistência adquirida aos agentes de platina.

Hetland et.al.,2012 investigaram o perfil de expressão e o papel clínico das auroras em carcinoma ovariano seroso primário e metastático em 178 tumores de 144 pacientes com doença em estágio avançado usando PCR em tempo real e imuno-química. Este estudo avaliou parâmetros clínico patológicos, e resistência à quimioterapia. A expressão de *AURK A* foi maior nos tumores com derrames em comparação com amostras sólidas. Já a expressão de *AURK B* foi maior nos carcinomas primários e metastáticos obtidos na pré-quimioterapia em comparação com pós-quimioterapia. A baixa expressão de *AURK B* foi associada à resistência primária à quimioterapia e à reduzida resposta ao tratamento, sugerindo um papel que alterações em *AURK B* estão associadas à resistência quimioterápica.

O estudo aqui apresentado é o primeiro a avaliar níveis de *AURKA* e *AURKB* como preditores de resposta à EPO. Após dicotomizar o nível de expressão destes genes, encontramos que pacientes com expressão de Aurora A e Aurora B acima do ponto de corte apresentavam maior resposta ao tratamento com EPO. Uma possível explicação para este achado é o efeito promovido pela *AURK B* em aumentar a fosforilação das histonas, fenômeno que pode ser encontrado em estimulação aos receptores da EPO. Schnoder et al.(2015) demonstraram que a maturação eritróide vinculada ao receptor de EPO ocorre através das vias de sinalização STAT5, JACK- 2 e modificação das histonas. Diante da informação que *AURK B* leva ao aumento da fosforilação da histona H3, podemos especular que haja um possível ligação entre a Eritropoetina e as Auroras Quinases.

Não identificamos associações significantes entre a expressão dos genes *MAD2*, *CDC20*, *TPX2* e *CDKN1A* e a resposta ao tratamento com EPO na população do estudo. Quanto à inexistência de associação entre a expressão dos genes citados acima, independentemente da relação a resposta ou não ao tratamento, podemos sugerir que há controvérsias sobre o papel deles na SMD, requerendo mais estudos para essa relação.

Heredia et. al., (2014), não conseguiram demonstrar associação desses genes com variáveis clínicas do paciente com SMD, tais como celularidade da medula óssea, número de citopenias, dependência transfusional, citogenética alterada, cariótipo aneuploide e classificação IPSS. Em estudos posteriores, Genga et al.,(2015) demonstraram que o aumento da expressão de *CDC20* esteve associado com a presença de trombocitopenia, citopenia em três linhagens e presença de cariótipo complexo em pacientes com SMD (GENGA et al, 2015). Já o aumento da expressão de *MAD2* foi associado com plaquetopenia (GENGA et al, 2015). Por fim, Borges et.al.,(2018), demonstraram que houve um aumento de expressão do *CDC20* na presença de dismegacariopoese, trombocitopenia e em pacientes de alto risco.

Uma importante limitação deste estudo está associada à necessidade de validação funcional do perfil e do impacto da expressão dos genes sobre a resposta a tratamento com EPO, além da avaliação de outros parâmetros laboratoriais relacionados á resposta, como por exemplo a dosagem de sEPO, muito embora tal exame não tenha a cobertura do SUS.

Outros modelos podem ser utilizados para uma casuística mais ampliada, como por exemplo a utilização de análises de proteína dos genes *AURKA*, *AURKB*, *MAD2*, *CDC20*, *TPX2* e *CDKN1A* em pacientes com SMD. Além disso, por se tratar de um estudo retrospectivo e com dados coletados ao diagnóstico, identificamos a ausência de algumas informações que podem ter influenciado nos resultados, como a ausência de alguns casos de cariótipo sem metáfase.

Em síntese, nosso estudo sugere que os genes *AURKA* e *AURKB*, podem estar relacionados à patogênese da SMD e devem ser avaliados, em uma coorte mais ampla, a fim de validar seu papel como marcadores moleculares nos pacientes com SMD tratados com Eritropoetina.

## CONCLUSÕES

A partir do desenvolvimento deste estudo, podemos concluir que:

- Verificamos que o aumento da expressão dos genes *AURKA* e *AURKB* está associado á uma maior razão de chances do paciente com SMD responder ao tratamento com EPO;

- Propomos que o aumento de expressão dos genes *AURKA* e *AURKB* pode corresponder a possíveis novos marcadores moleculares da patogênese da SMD associada à resposta ao tratamento com Eritropoetina;

## REFERÊNCIAS

ABBAS T, Keaton MA, Dutta A. **Genomic Instability in Cancer**. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*. 2013;5(3):a012914. doi:10.1101/cshperspect.a012914.

ADÈS, L.; ITZYKSON, R.; FENAUX, P. Myelodysplastic syndromes. **The Lancet**, v. 383, n. 9936, p. 2239 - 2252, 2014.

Akiyama, M., Izumi, H., Wang, K., Yamaguchi, T., Kuma, A.C., Kitamura, N., Harada, Y., Oya, R., Yamaguchi, K., Iwai, Y., & Kohno, K. (2014). Hypersensitivity to aurora kinase inhibitors in cells resistant against platinum- containing anticancer agents. **Anti-cancer agents in medicinal chemistry**, 14 7, 1042-50.

ALFIERI C, Chang L, Zhang Z, et al. Molecular basis of APC/C regulation by the spindle assembly checkpoint. **Nature**. 2016;536(7617):431-436. doi:10.1038/nature19083.

ARBER, D.A.; HASSERJIAN, R.P. Reclassifying myelodysplastic syndromes: what's where in the new WHO and why. **Hematology**, p. 294–298, 2015.

ASTERITI EA, et al. The Aurora-A/TPX2 complex: A novel oncogenic holoenzyme? **Biochimica et Biophysica Acta**. 2010; 1806:230–239

BACHER U, Schanz J, Bralke F, Haase D. Rare Cytogenetic Abnormalities in Myelodysplastic Syndromes. **Mediterranean Journal of Hematology and Infectious Diseases**. 2015;7(1):e2015034. doi:10.4084/MJHID.2015.034.

BAI M, Ni J, Shen S, et al. Aurora-A kinase-inactive mutants disrupt the interaction with Ajuba and cause defects in mitotic spindle formation and G2/M phase arrest in HeLa cells. **BMB Reports**. 2014;47(11):631-636. doi:10.5483/BMBRep.2014.47.11.250.

BALLEARI, E.; SALVETTI, C.; DEL CORSO, L.; et al. Age and comorbidities deeply impact on clinical outcome of patients with myelodysplastic syndromes. **Leuk Research.**, v. 39, n. 8, p. 846–52.2015

BAYLISS, Richard et al. Structural Basis of Aurora-A Activation by TPX2 at the Mitotic Spindle. **Molecular Cell**, Volume 12, 2003. Issue 4, 851 – 862

BEJAR R, Papaemmanuil E, Haferlach T, et al. Somatic mutations in MDS patients are associated with clinical features and predict prognosis independent of the IPSS-R: analysis of combined datasets from the International Working Group for Prognosis in MDS–Molecular Committee. **Blood**. 2015;126(23):907.

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

BELLI, C.B.; PINHEIRO, R.F.; BESTACH, Y.; LARRIPA, I.B.; DA SILVA, TANIZAWA, R.S.; ALFONSO, G.; et al. Myelodysplastic syndromes in South America: a multinational study of 1080 patients. **Am J Hematol.**, v. 90, n. 10, p. 851-8, 2015.

BENNETT, J. M. Proposals for the classification of the myelodysplastic syndrome. **Br. J. Hematol.**, v.51, p.189-199, 1982.

BENTO, R.M.A. et al. Eritropoetina humana recombinante no esporte: uma revisão. **Rev Bras Med Esporte.** 2003; 9:3(6).

BOWEN, DT. Occupational and environmental etiology of SMD. **Best Pract Res Clin Haematol.**, v. 26, n. 4, p 319-26, 2013.

BRAUNSTEIN I, et al. Inhibitory factors associated with anaphase-promoting complex/cylosome in mitotic checkpoint. **Proc Natl Acad Sci USA.** 2007; 104(12): 4870-4875.

BUDCZIES J, Klauschen F, Sinn BV, Gyo" rffy B, Schmitt WD, et al. (2012) Cutoff Finder: A Comprehensive and Straightforward Web Application Enabling Rapid Biomarker Cutoff Optimization. **PLoS ONE** 7(12): e51862. doi:10.1371/journal.pone.0051862

BUDCZIES, J.; KLAUSCHEN, F.; SINN, B.V.; GYÓRFFY, B.; SCHMITT, W.D.; DARB-ESFAHANI, S.; DENKERT, C. *Cutoff Finder: a comprehensive and straightforward Web application enabling rapid biomarker cutoff optimization.* **PLoS One**, v. 7, n. 12, p. e51862, 2012.

CAZZALINI A, et al. Multiple roles of the cell cycle inhibitor p21 $CDKN1A$  in the DNA damage response. **Mutation Research.** 2010; 704:12-20

CAZZOLA, M.; INVERNIZZI, R. Ring sideroblasts and sideroblastic anemias. **Haematologica**, v. 96, v. 6, p. 789-792, 2011.

CHAMSEDDINE AN, et al. Unraveling Myelodysplastic Syndromes: Current Knowledge and Future Directions. **Curr Oncol Rep.** 2016; 18(4): 1-11.

Checkpoint Signaling. **Frontiers in Oncology.** 2015;5:225. doi:10.3389/fonc.2015.00225.

CHESON, B. D., GREENBERG, P. L., BENNETT, J. et al. Clinical application and proposal for modification of the International Working Group (IWG) response criteria in myelodysplasia. **Blood** 2006; 108(2): 419-25.

CORTESÃO E, Tenreiro R, Ramos S, Pereira M, César P, Carda JP, et al. Serum erythropoietin as prognostic marker in myelodysplastic syndromes. **Acta Med Port** 2015; 28 (6): 720–725. Epub 2015 Dec 31.

DE LUCA, K.F., S.M. Lens, and J.G. DeLuca. 2011. Temporal changes in Hec1 phosphorylation control kinetochore-microtubule attachment stability during mitosis. *Journal of cell science*. 124:622-634. **Expert Rev Hematol**. 2015 Apr;8(2):139-46. doi: 10.1586/17474086.2015.1000854. Epub 2015 Jan 12. Review

GANGAT, Naseema Patnaik, Mrinal M., Tefferi, Ayalew. Myelodysplastic syndromes: Contemporary review and how we treat. *American Journal of Hematology*. **Am. J. Hematol**. <http://dx.doi.org/10.1002/ajh.24253> 2016

GARCIA-MANERO, Guillermo. Myelodysplastic syndromes: 2015 Update on diagnosis, risk-stratification and management. **American Journal of Hematology**, 2015. Doi:10.1002/ajh.24102

GARELIUS, H. K. G., Johnston, W. T., Smith, A. G., Park, S., de Swart, L., Fenaux, P., Hellström-Lindberg, E. (2017). Erythropoiesis-stimulating agents significantly delay the onset of a regular transfusion need in nontransfused patients with lower-risk myelodysplastic syndrome. **Journal of Internal Medicine**, 281(3), 284–299. <http://doi.org/10.1111/joim.12579>

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

GERMING U, Kobbe G, Haas R, Gattermann N. Myelodysplastic Syndromes: Diagnosis, Prognosis, and Treatment. **Deutsches Ärzteblatt International**. 2013;110(46):783-790. doi:10.3238/arztebl.2013.0783.

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

GREENBERG P, COX C, LEBEAU MM, FENAUX P, MOREL P, SANZ G, SANZ M, VALLESPI T, HAMBLIN T, OSCIER D, OHYASHIKI K, TOYAMA K, AUL C, MUFTI G, BENNETT J. International scoring system for evaluating prognosis in myelodysplastic syndromes. **Blood**, v. 89, n. 6, p. 2079-88, 1997.

GREENBERG PL, Stone R, Bejar R *et al* Myelodysplastic Syndromes, Version 2. 2015. **J Natl Compr Canc Netw** 2015; 13: 261–72.

GREENBERG, P. L.; TUECHLER, H.; SCHANZ, J.; SANZ, G.; GARCIA-MANERO, G.; SOLÉ, F.; BENNETT, J. M.; BOWEN, D.; FENAUX, P.; DREYFUS, F.; KANTARJIAN, H.; KUENDGEN, A.; LEVIS, A.; MALCOVATI, L.; CAZZOLA, M.; CERMAK, J.; FONATSCH, C.; LE BEAU, M. M.; SLOVAK, M.L.; KRIEGER, O.; LUEBBERT, M.; MACIEJEWSKI, J.; MAGALHAES, S. M.; MIYAZAKI, Y.; PFEILSTÖCKER, M.; SEKERES, M.; SPERR, W. R.; STAUDER, R.; TAURO, S.; VALENT, P.; VALLESPI, T.; VAN DE LOOSDRECHT, A. A.; GERMING, U.;

HAASE, D. Revised international prognostic scoring system for myelodysplastic syndromes. **Blood**, v. 120, n. 12, p. 2454-2465, 2012.

GREENBERG, P.L.; ATTAR, E.; BENNETT, J.M.; BLOOMFIELD, C.D.; BORATE, U.; DE CASTRO, C.M., *et al.* NCCN Practice Guidelines for myelodysplastic syndromes, Version 1. 2014. **J Natl Compr Canc Netw**, v. 480, n. 11, p. 838-874, 2013.

HAASE, D. Cytogenetics features in myelodysplastic syndromes. **Ann. Hematol.**, v. 87, p.515-526, 2008.

HASLE, H. A pediatric approach to the WHO classification of myelodysplastic and myeloproliferative diseases. **Leukemia**, v.17, n.2, p.277-282, 2003.

HEINRICH S, *et al.* Determinants of robustness in spindle assembly checkpoint signaling. **Nature Cell Biology**. 2013; 15(11): 1328-1339.

HELLSTROM-LINDBERG E, Ahlgren T, Beguin Y, *et al.* Treatment of anemia in myelodysplastic syndromes with granulocyte colony-stimulating factor plus erythropoietin: results from a randomized phase II study and long-term follow-up of 71 patients. **Blood**. 1998;92(1):68-75.

HELLSTROM-LINDBERG, E., LOOSDRECHT, A., Erythropoiesis stimulating agents and other growth factors in low-risk SMD. **Research Clinical Haematology** p. 401-410, 2013.

HELLSTRÖM-LINDBERG, E.; MALCOVATI, L. Supportive care, growth factors and new therapies in myelodysplastic syndromes. **Blood Rev.**, v.22, p. 75-91, 2008.

HENZEL R, Dittrich P, Ibrahim B. A Dynamical Model for Activating and Silencing the Mitotic Checkpoint. **Scientific Reports**. 2017;7:3865. doi:10.1038/s41598-017-04218-2.

HEREDIA FF, *et al.* Aurora-B expression may not contribute to disease progression: a reflection of the heterogeneous pathogenesis? **Haematologica**. 2012; 97:e37-e39.

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

HEREDIA, F. F.; DE SOUSA, J.C.; RIBEIRO JUNIOR, H.L.; CARVALHO A.F.; MAGALHÃES, S.M.; PINHEIRO, R.F. Proteins related to the spindle and checkpoint mitotic emphasize the different pathogenesis of hypoplastic SMD. **Leuk Research.**, v. 38, n. 2, p. 218-24, 2014.

HETLAND TE, Nymoén DA, Holth A, Brusegard K, Flørenes VA, Kærn J, Tropé CG, Davidson B. Aurora B expression in metastatic effusions from advanced-stage ovarian serous carcinoma is predictive of intrinsic chemotherapy resistance. **Hum Pathol**. 2013;44:777–85.

HOLLAND, Andrew & Cleveland, Don. (2012). Losing balance: The origin and impact of aneuploidy in cancer. **EMBO reports**. 13.

JADERSTEN M, Malcovati L, Dybedal I, Della Porta MG, Invernizzi R, Montgomery SM, et al. Erythropoietin and granulocyte colony stimulating factor treatment associated with improved survival in myelodysplastic syndrome. **J Clin Oncol**. 2008;26 (21):3607-13

JÄDERSTEN, M.; HELLSTRÖM-LINDBERG, E. Myelodysplastic syndromes: biology and treatment. **J. Int. Med.**, v. 265, p. 307-328, 2008.

JÄDERSTEN, M.; HELLSTRÖM-LINDBERG, E. Myelodysplastic syndromes: biology and treatment. **J. Int. Med.**, v. 265, p. 307-328, 2008.

JAFFE, E. S., SWERDLOW, S. H., CAMPO, E., HARRIS, N. L., PILERI, S. A., STEIN, H., THIELE, J., VARDIMAN, J. W. **WHO classification of tumours: tumours of haematopoietic and lymphoid tissues**. Lyon, France, 2001.

KANBAY, M.; AKCAY, A.; DELIBASI, T.; et al. Comparison of effects of darbepoetin alfa and epoetin alfa on serum endothelin level and blood pressure. **Adv Ther**. 2007; 24: p. 346–52.

KARIMIAN A, Ahmadi Y, Yousefi B. Multiple functions of p21 in cell cycle, apoptosis and transcriptional regulation after DNA damage. **DNA Repair**. 2016; 42:63-7

KELAIDI C, Park S, Brechignac S, et al; Groupe Francophone des Myelodysplasies (GFM). Treatment of myelodysplastic syndromes with 5q deletion before the lenalidomide era; the GFM experience with EPO and thalidomide. **Leuk Res**. 2008;32(7):1049-1053.

KITZEN JJEM, Jonge MJA, Verweij J. Aurora Kinase inhibitors. **Critical Reviews in Oncology/Hematology**. 2010; 73: 99-110.

KOSMIDER O, Passet M, Santini V, et al. Are somatic mutations predictive of response to erythropoiesis stimulating agents in lower risk myelodysplastic syndromes? **Haematologica**. 2016;101(7):e280-e283.

KRENN, V., & Musacchio, A. (2015). The Aurora B Kinase in Chromosome Bi-Orientation and Spindle Checkpoint Signaling. **Frontiers in Oncology**, 5, 225. <http://doi.org/10.3389/fonc.2015.00225>

LATAGLIATA R, Oliva EN, Volpicelli P, et al. Twice-weekly high-dose rHuEpo for the treatment of anemia in patients with low-risk myelodysplastic syndromes. **Acta Haematol**. 2008;120(2):104-107.

LAWRENCE KS, Chau T, Engebrecht J. DNA Damage Response and Spindle Assembly Checkpoint Function throughout the Cell Cycle to Ensure Genomic Integrity. Martinez-Perez E, ed. **PLoS Genetics**. 2015;11(4):e1005150. doi:10.1371/journal.pgen.1005150.

LETAMENDI F N, et al. Agentes estimuladores de la eritropoyetina: revisión bibliográfica de los usos e indicaciones en enfermedad avanzada oncológica y no oncológica en el anciano. **Rev Esp Geriatr Gerontol**. 2017. <http://dx.doi.org/10.1016/j.regg.2017.06.009>

LONDON N, Biggins S. Signaling dynamics in the spindle checkpoint response. **Nature reviews Molecular cell biology**. 2014;15(11):736-747. doi:10.1038/nrm3888.

LUO, X. et al. Structure of the *MAD2* spindle assembly checkpoint protein and its interaction with *CDC20*. **Nature Struct. Biol.** 7, 224–229 (2000).

MACDOUGALL IC, Cooper AC. Erythropoietin resistance: the role of inflammation and pro-inflammatory cytokines. **Nephrol Dial Transplant** 2002;17:39-43. DOI: [http://dx.doi.org/10.1093/ndt/17.suppl\\_11.39](http://dx.doi.org/10.1093/ndt/17.suppl_11.39)

MAGALHÃES, S. M. M.; MADEIRA, T. S.; BITTENCOURT, R.; VELLOSO, E.; CHAUFFAILLE, M. L.; AZEVEDO, A. A.; FAGUNDES, E. M.; ZANICHELLI, M. A.; BONFIM, G.; MELO, L. G.; TAVARES, R. S.; BORTOLHEIRO, T. C. Epidemiological and Clinicopathological Data From the Brazilian Registry of Patients with Myelodysplastic Syndromes and Comparative Analysis between different geographic areas. **Blood**, v. 116, abstract 1884, 2010.

MAIESE, K; Li F; CHONG, Z. Erythropoietin and cancer. **JAMA**. 2005; 293: p. 18589.

MERALDI, P.; HONDA, R.; NIGG, E.A. Aurora kinases link chromosome segregation and cell division to cancer susceptibility. **Cur Opin in Genet. & Develop**. 2004; 14:29-36.

MOYO V, Lefebvre P, Duh MS, Yektashenas B, Mundle S. Erythropoiesis-stimulating agents in the treatment of anemia in myelodysplastic syndromes: a meta-analysis. **Ann Hematol**. 2008; 87(7):527-536

NAKAZAKI K, Nannya Y, Kurokawa M. Distribution of serum erythropoietin levels in lower risk myelodysplastic syndrome cases with anemia. **Int J Hematol**. 2014;99:53-6.

NIEMEYER, C. M.; BAUMANN, I. Myelodysplastic syndrome in children and adolescents. *Semin Hematol.*, v. 45, n. 1, p. 60-70, 2008.

OLIVA EN, Nobile F, Alimena G, et al. Darbepoetin alfa for the treatment of anemia associated with myelodysplastic syndromes: efficacy and quality of life. **Leuk Lymphoma**. 2010;51(6):1007-1014.

ORAZI A, Czader MB. Myelodysplastic Syndromes. **Am J Clin Pathol.** 2009; 132: 290-305.

PALIEGE, A., ROSENBERGER, C., BONDKE, A., SCIESIELSKI, L., SHINA, A., HEYMAN, S., et al. Hypoxia-inducible factor-2 $\alpha$ -expressing interstitial fibroblasts are the only renal cells that express erythropoietin under hypoxia-inducible factor stabilization. **Kidney Int.** 2010; 77: p. 312–8.

PARK S, Kelaidi C, Sapena R, et al. Early introduction of ESA in low risk MDS patients may delay the need for RBC transfusion: a retrospective analysis on 112 patients. **Leuk Res.** 2010;34(11):1430-1436

PINHEIRO, R. F.; CHAUFFAILLE, M. L. Comparison of I-FISH and G-banding for the detection of chromosomal abnormalities during the evolution of myelodysplastic syndrome. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 42, n. 11, p. 1110-1112, 2009.

RUCHAUD, S., M. Carmena, and W.C. Earnshaw. 2007. The chromosomal passenger complex: one for all and all for one. **Cell.** 131:230-231.

SANTINI V, Schemenau J, Levis A, et al. Can the revised IPSS predict response to erythropoietic-stimulating agents in patients with classical IPSS low or intermediate-1 MDS? **Blood.** 2013;122(13):2286-2288.

SANTINI V. Anemia as the main manifestation of myelodysplastic syndromes. **Semin Hematol.** 2015;52(4):348-356.

SANTINI V. Clinical use of erythropoietic stimulating agents in myelodysplastic syndromes. **Oncologist** 2011;16:35–42.

SCHNÖDER, T. M., Arreba-Tutusaus, P., Griehl, I., Bullinger, L., Buschbeck, M., Lane, S. W., ... Fischer, T. (2015). Epo-induced erythroid maturation is dependent on *Plc $\gamma$ 1* signaling. **Cell Death and Differentiation**, 22(6), 974–985.  
<http://doi.org/10.1038/cdd.2014.186>

SCHUYLER SC, Wu Yueh-Fu, Kuan V Jen-Wei. The *Mad1–MAD2* balancing act – a damaged spindle checkpoint in chromosome instability and cancer. **Journal of Cell Science.** 2012; 125: 4197-4206.

SEASTONE DJ, GERDS AT. Darbepoetin alfa for anemia with myelodysplastic syndrome. **Expert Review of Hematology** [12 Jan 2015, 8(2):139-146]  
**DOI:** 10.1586/17474086.2015.1000854

SEKERES, M. A. The epidemiology of myelodysplastic syndromes. **Hematol Oncol Clin North Am**, v. 24, n. 2, p. 287-94, Apr 2010.

SENENT L, et al. Reproducibility of the World Health Organization 2008 criteria for myelodysplastic syndromes. **Haematologica**. 2013;98(4):568-75.

SILVA, P., J. Barbosa, A.V. Nascimento, J. Faria, R. Reis, and H. Bousbaa. 2011. Monitoring the fidelity of mitotic chromosome segregation by the spindle assembly checkpoint. **Cell proliferation**. 44:391-400.

SOLÉ, F.; LUÑO, E.; SANZO, C.; ESPINET, B.; SANZ, G. F.; CERVERA, J.; CALASANZ, M. J.; CIGUDOSA, J. C.; MILLÀ, F.; RIBERA, J. M.; BUREO, E.; MARQUEZ, M. L.; ARRANZ, E.; FLORENSA, L. Identification of novel cytogenetic markers with prognostic significance in a series of 928 patients with primary myelodysplastic syndromes. **Haematologica**, v. 90, p.1168-1178, 2005.

SOTILLO R, Hernando E, Díaz-Rodríguez E, et al. *MAD2* overexpression promotes aneuploidy and tumorigenesis in mice. **Cancer Cell**. 2007; 11(1): 9-23.

STEENSMA DP. Good riddance to the term “refractory anemia” in myelodysplastic syndromes. **Leukemia Research**. 2016; 51:22-26.

STROM, S. S.; VELEZ-BRAVO, V.; ESTEY, E. H. Epidemiology of myelodysplastic syndromes. **Semin. Hematol.**, v.45, n.1, p.8-13, 2008.

SWERDLOW SH, et al. World Health Organization Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. **IARC Press**: Lyon, 2008

TEFFERI A.; VARDIMAN J. Myelodysplastic Syndromes. **N Engl J Med.**, v. 361, p. 1872-85, 2009b.

TRAKALA M, et al. Aurora B prevents delayed DNA replication and premature mitotic exit by repressing p21Cip1 . **Cell Cycle**. 2013; 12(7):1030-41.

VADER G, Lens SM. The Aurora kinase family in cell division and cancer. **Biochim Biophys Acta**. 2008; 1786:60–72. [PubMed: 18662747]

VARDIMAN, JW, et al. The 2008 revision of the World Health Organization (WHO) classification of myeloid neoplasms and acute leukemia: rationale and important changes. **Blood**. 2009; 114(5): 937-951.

VASSALLO J, Magalhães SMM. Síndromes mielodisplásicas e mielodisplásicas/mieloproliferativas. **Rev Bras Hematol Hemoterapia**, 2009; 31:267-72.

WANG XX, Liu R, Jin SQ, Fan FY, Zhan QM. Overexpression of Aurora-A kinase promotes tumor cell proliferation and inhibits apoptosis in esophageal squamous cell carcinoma cell line. **Cell Res**. 2006; 16(4):356-366

WANG, Yan et al. “The Negative Interplay between Aurora A/B and BRCA1/2 Controls Cancer Cell Growth and Tumorigenesis via Distinct Regulation of Cell Cycle Progression, Cytokinesis, and Tetraploidy.” **Molecular Cancer** 13 (2014): 94. *PMC*. Web. 2 Nov. 2017.

WYSONG DR, Chakravarty A, Hoar K, Ecsedy JA. The inhibition of Aurora A abrogates the mitotic delay induced by microtubule perturbing agents. **Cell Cycle**. 2009; 8:876–888. [PubMed: 19221504]

YE D, Garcia-Manero G, Kantarjian HM, Xiao L, Vadhan-Raj S, Fernandez MH, et al. Analysis of Aurora kinase A expression in CD34(+) blast cells isolated from patients with myelodysplastic syndromes and acute myeloid leukemia. **J Hematop** 2009;2:2–8.

YIN CC, Medeiros LJ, Bueso-Ramos CE. Recent advances in the diagnosis and classification of myeloid neoplasms – comments on the 2008 WHO classification. **Int Jnl Lab Hem**. 2010; 32:461-476

YOSHIDA, Y. A new look at apoptosis in SMD; an uneasy neighbor. **Leuk. Res.**, v.31, n.12, p.1617-1619, 2007.

YU F, Jiang Y, Lu L, et al. Aurora-A promotes the establishment of spindle assembly checkpoint by priming the Haspin-Aurora-B feedback loop in late G2 phase. **Cell Discovery**. 2017;3:16049-. doi:10.1038/celldisc.2016.49.

ZAHR AA, et al. Therapy-related myelodysplastic syndromes, or are they? **Blood Rev**. 2016: 1- 10.

ZHOU T, et al. Potential Relationship between Inadequate Response to DNA Damage and Development of Myelodysplastic Syndrome. **Int J Mol Sci**. 2015; 16:966-989.