



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

GEANE FELIX DE SOUZA

**RELAÇÃO DO DANO OXIDATIVO, DA MUTAÇÃO DO GENE HFE E DO FATOR  
DE NECROSE TUMORAL (TNF- $\alpha$ ) COM A SOBRECARGA DE FERRO  
TRANSFUSIONAL EM PORTADORES DE SÍNDROMES MIELODISPLÁSTICAS**

FORTALEZA

2013

GEANE FELIX DE SOUZA

**RELAÇÃO DO DANO OXIDATIVO, DA MUTAÇÃO DO GENE HFE E DO FATOR  
DE NECROSE TUMORAL (TNF $\alpha$ ) COM A SOBRECARGA DE FERRO  
TRANSFUSIONAL EM PORTADORES DE SÍNDROMES MIELODISPLÁSTICAS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas, para obtenção do título de Doutor em Ciências Médicas. Área de concentração: Clínica Médica

Orientadora: Profa. Dra. Sílvia Maria Meira Magalhães

FORTALEZA

2013

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação  
Universidade Federal do Ceará  
Biblioteca de Ciências da Saúde

---

S715r Souza, Geane Felix de

Relação do dano oxidativo, da mutação do gene HFE e do Fator de Necrose Tumoral (TNF $\alpha$ ) com a sobrecarga de ferro transfusional em portadores de síndromes mielodisplásicas./Geane Felix de Souza.- 2013.  
157f. : il. color

Tese (Doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas, Fortaleza, 2013.

Área de concentração: Clínica Médica

Orientação: Prof<sup>a</sup>. Dra. Sílvia Maria Meira Magalhães

1. Síndromes Mielodisplásicas. 2. Sobrecarga de Ferro. 3. Estresse Oxidativo. 4. Hemocromatose. 5. Fator de Necrose Tumoral Alfa. I. Título

CDD: 616.99419

---

GEANE FELIX DE SOUZA

**RELAÇÃO DO DANO OXIDATIVO, DA MUTAÇÃO DO GENE HFE E DO FATOR  
DE NECROSE TUMORAL (TNF $\alpha$ ) COM A SOBRECARGA DE FERRO  
TRANSFUSIONAL EM PORTADORES DE SÍNDROMES MIELODISPLÁSTICAS.**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas, para obtenção do título de Doutor em Ciências Médicas. Área de concentração: Clínica Médica

Aprovada em: 12/12/2013

BANCA EXAMINADORA

---

Profa. Dra. Silvia Maria Meira Magalhães (Orientadora)  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

---

Profa. Dra. Romélia Pinheiro Gonçalves  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

---

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

---

Profa. Dra. Arlândia  
Universidade de Fortaleza (UNIFOR)

---

Prof. Dr. Rivelilson Mendes de Freitas  
Universidade Federal do Piauí (UFPI)

A Deus, que fortalece a minha alma, me proporciona saúde e forças para vencer as adversidades encontradas no caminho e prosseguir adiante, iluminando meu caminho, minha vida. O respeito ao **SENHOR** é o princípio da sabedoria (prov.9).

Aos meus pais, **Antonio Felix de Souza e Joseny Felix de Souza**, pessoas singelas e cheias de dignidade, pelo exemplo de vida, determinação e perseverança. Eles me ensinaram e incentivaram a seguir o caminho do amor e do bem e me deram o exemplo de honradez, bondade, trabalho, dedicação e humildade, que sempre norteiam minha vida.

Ao meu bem querer e amor de toda vida, **Cristovão Messias**, por estar sempre ao meu lado, torcendo pelo meu sucesso. Com carinho e imensurável amor, soube ser paciente e compreensivo. Obrigada por você existir e fazer a diferença, por formarmos uma família cheia de vida.

Aos meus filhos, minha maior conquista, **Pedro Felipe Felix e Gabriella Felix**, que são a razão e força para eu continuar subindo alguns degraus na caminhada e proporcionar-lhes o que julgo importante para sua educação: o estudo e o exemplo. Com o coração transbordando de amor e carinho meu eterno agradecimento pelo apoio incondicional. Amo vocês!!!

“É no coração que a gente guarda tudo que é para sempre, tudo que o amor transformou em eterno...”

## AGRADECIMENTO ESPECIAL

À minha orientadora amiga, **Profa. Dra. Sílvia Maria Meira Magalhães**, “chefe”, pelo exemplo de compromisso e de responsabilidade. Por ter me dedicado horas preciosas e proporcionado ferramentas para o meu crescimento científico e pessoal. Por ter transformado meus momentos de angústia em alegres e confiantes e, sobretudo, pelo acolhimento e cuidados revelados em atitudes singelas. Sou muito grata por sua serenidade, contribuição, oportunidade, confiança e por me aceitar como sua doutoranda.

## **AGRADECIMENTOS**

Ao finalizar mais uma etapa de minha vida profissional, quero agradecer com carinho às pessoas que contribuíram, apoiaram e vivenciaram a realização deste trabalho:

Aos meus irmãos, Beatriz Felix, Germando Felix, Geruzia Felix e Genecilda Felix, cunhados e sobrinhos, todos incentivadores da minha profissão, pelo apoio em todos os momentos.

Ao Dr. Ronald Feitosa e à Dra. Romélia Pinheiro, por terem acreditado e apostado em mim e nessa idéia. Pela paciência, disponibilidade e ajuda durante os experimentos da pesquisa em seus laboratórios.

Aos meus companheiros de muitas horas e da pós-graduação: Bruna, Carlivânia, Darcielle, Liliane, Paulo, Tiago, Jânio, Isabel, Maritza, Talyta, Thaina, Luana, Alano, Juliana, Fabíola, Isabelle, Júlia, Rafael, Marília, Roberta, Allan, Howard e Luiz Ivando. Obrigada pelos conselhos, pela imprescindível ajuda nos experimentos e por tornarem o meu dia a dia mais divertido.

Aos funcionários da Universidade Federal do Ceará e do Centro de Hematologia e Hemoterapia do Ceará que trabalham nos ambulatórios de SMD e no Laboratório de Hematologia: Dra. Clara, Dra. Jaqueline, Dr. Marcos Antonio, Dr. Gentil Galiza, Lucimar, Sônia, Regina, Fernanda, Kátia, José Neto, Marcília, Ronaldo e Fátima pela presteza e contribuição nas coletas dos dados epidemiológicos e das amostras biológicas do estudo.

Aos colegas do laboratório de Toxicologia, Farmacotécnica e Farmacognosia, em especial, profa. Tereza, prof. Hemerson Lury, prof. Said, prof. Daniel e Lury pela ajuda nas análises laboratoriais.

Aos colegas do laboratório LACT que gentilmente cederam alguns equipamentos para as análises laboratoriais.



Aos amigos e funcionários do Hospital Distrital Gonzaga Mota Messejana por toda dedicação.

Aos funcionários do laboratório LAMAB e sócios, Fatima Gomes, Levi Gomes, Pedro Alberto e Aparecida Gomes pelo apoio.

Ao Amigo Rivelilson Freitas pelo incentivo, apoio e orientação e pela forma generosa que compartilha seu conhecimento.

Aos professores Wellington Lima e Manoel Ricardo pela colaboração valiosa na análise estatística desse trabalho.

Aos funcionários da Pós-Graduação, pelo apoio que recebi durante o período do curso.

Aos meus professores, pelos ensinamentos que ajudaram a me transformar na profissional que sou hoje.

Aos professores, colegas e amigos do departamento de Enfermagem por terem me recebido com alegria para compartilhar conhecimentos, em especial, profa. Thelma, profa. Elisângela, Renata, Flávia, Juliana, Glêdes, Rita, Sacha.

Aos meus queridos familiares, sempre compreensivos e carinhosos nos reencontros.

Aos integrantes do Laboratório de Hemoglobinopatias e Genética das Doenças Hematológicas/UFC; do Laboratório de Citogenômica do Câncer/UFC e do Laboratório do Hospital Walter Cantídio/UFC pela colaboração em todas as análises laboratoriais.

À Norma Linhares pela colaboração e revisão bibliográfica dessa tese.

Aos meus amigos de todas as horas, em especial, Léa Dias, Régio Vasconcelos, Fatima Gomes, Acácio Silveira, Cláudia Costa, Avilez Batista, Ana Claudia Sobreira, Ivoney Rodrigues.

Aos familiares, pacientes e idosos voluntários pela sabedoria e luta pela vida. Meu sincero respeito e gratidão.

Aos amigos que acreditaram em mim e que permanecem guardados no meu coração. MUITÍSSIMO OBRIGADA!

Este trabalho foi realizado com o apoio financeiro do CNPq e FUNCAP.

**Ainda que eu falasse a língua dos homens e dos anjos, e não tivesse amor, seria como o metal que soa ou como o sino que tine.**

**E ainda que tivesse o dom de profecia e conhecesse todos os mistérios e toda ciência e ainda que tivesse toda fé, de maneira tal que transportasse os montes, e não tivesse amor, nada seria. 1º Corintios 13:1-2.**

## RESUMO

**Introdução:** As síndromes mielodisplásticas (SMD) são caracterizadas por hematopoese ineficaz e displasia em uma ou mais linhagens celulares, citopenias periféricas e um risco variável de progressão para leucemia aguda. A anemia está presente em 80% dos pacientes. Muitos desenvolvem dependência transfusional e sobrecarga de ferro (SF), o que leva à geração de espécies reativas derivadas do oxigênio (EROs) e estresse oxidativo que, juntamente com o fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) vêm sendo implicados na patogênese e evolução da SMD.

**Objetivo:** Avaliar a relação do *status* do ferro com o dano oxidativo, a mutação do gene HFE e os níveis de TNF $\alpha$  em portadores de SMD, acompanhados no Serviço de Hematologia da Universidade Federal do Ceará. **Casuística e métodos:** Foram analisados 101 portadores de SMD, 24 com e 77 sem SF transfusional, no período de maio de 2010 a setembro 2011. Compuseram o grupo controle 87 idosos saudáveis. O perfil do ferro foi avaliado por técnicas clássicas, o dano oxidativo por métodos espectrofotométricos e o estudo genético por PCR-RFLP. **Resultados:** Aumento significativo do malonaldeído (MDA) e nitrito foi observado nos pacientes com SF quando comparados aos demais grupos ( $p < 0.0001$ ). O MDA e nitrito foram correlacionados diretamente com a ferritina sérica (FRT) ( $r = 0.3328$ ,  $p = 0.0033$ ;  $r = 0.4255$ ,  $p < 0.0001$ , respectivamente). Houve correlação positiva entre FRT e as enzimas antioxidantes, superóxido dismutase (SOD) ( $r = 0.5957$ ,  $p < 0.0001$ ), catalase (CAT) ( $r = 0.4064$ ,  $p = 0.0003$ ) e glutathiona peroxidase (GPx) ( $r = 0.7313$ ,  $p < 0.0001$ ). Nos pacientes com SF foi observado aumento significativo do TNF- $\alpha$ , que foi correlacionado diretamente com a FRT ( $r = 0.4165$ ,  $p = 0.0002$ ). Foi identificada pelo menos uma mutação do gene HFE em 30,8% dos portadores de SMD e em 5,75% dos idosos saudáveis, a maioria em heterozigose para H63D. Todos os indivíduos com a mutação no gene HFE apresentaram nível de ferritina significativamente superior àqueles sem a mutação, em todos os grupos. Todos os marcadores de estresse oxidativo foram superiores nos pacientes com SF, independente da mutação do gene HFE. **Conclusões:** A doença apresentou-se mais tardiamente no sexo masculino e com mais critérios de gravidade e de pior evolução na população estudada. O estresse oxidativo observado se relacionou com a sobrecarga de ferro, não constituindo a mutação do gene HFE um fator adicional. Esses dados trazem

novas informações sobre a patogênese dessa doença tão heterogênea e podem constituir base para novas intervenções terapêuticas

**Palavras-chave:** Síndromes Mielodisplásicas; Sobrecarga de Ferro; Estresse Oxidativo; Hemocromatose; Fator de Necrose Tumoral Alfa.

## ABSTRACT

**Introduction:** Myelodysplastic syndromes (MDS) are characterized by ineffective hematopoiesis and dysplasia in one or more cell lines, peripheral cytopenias and a variable risk of progression to acute leukemia. Anemia is present in 80 % of patients. Many develop transfusion dependence and iron overload (IOL), which leads to generation of reactive oxygen species (ROS). Oxidative stress, together with tumor necrosis factor alpha (TNF- $\alpha$ ) have been implicated in the pathogenesis and evolution of MDS. **Objective:** To evaluate the relationship of iron status with oxidative damage, mutation of the HFE gene and the levels of TNF- $\alpha$  in patients with MDS, followed at the Hematology Unit of the Federal University of Ceará. **Methods:** 101 patients with MDS, 24 with and 77 without transfusional IOL were analyzed, from May 2010 to September 2011. The control group comprised 87 healthy individuals. The profile of iron was evaluated by classical techniques, oxidative damage by spectrophotometric methods and mutation of the HFE gene study by PCR – RFLP. **Results:** We observed a significant increase in malonaldehyde (MDA) and nitrite in patients with IOL when compared to the other groups ( $p < 0.0001$ ). The MDA and nitrite were directly correlated with serum ferritin (FRT) ( $r = 0.3328$ ,  $p = 0.0033$ ,  $r = 0.4255$ ,  $p < 0.0001$ , respectively). There was a positive correlation between FRT and antioxidant enzymes, superoxide dismutase (SOD) ( $r = 0.5957$ ,  $p < 0.0001$ ), catalase (CAT) ( $r = 0.4064$ ,  $p = 0.0003$ ) and glutathione peroxidase (GPx) ( $r = 0.7313$ ,  $p < 0.0001$ ). In patients with IOL a significant increase of TNF- $\alpha$  was observed, which was directly correlated with FRT ( $r = 0.4165$ ,  $p = 0.0002$ ). At least one mutation in the HFE gene was identified in 30.8 % of patients with MDS and in 5.75% of healthy controls, most heterozygous for H63D. Subjects with mutations in the HFE gene showed ferritin levels significantly higher than those without the mutation in all groups. All markers of oxidative stress were higher in patients with IOL, independent of HFE gene mutations. **Conclusions:** The disease presented later in males and with more severity criteria for worse outcome in the study population. The oxidative stress observed was related to iron overload and the HFE gene mutation did not constitute an additional factor. These data provide new information about the pathogenesis of this heterogeneous disease and may provide the basis for new therapeutic interventions.

**Key words:** Myelodysplastic Syndromes; Iron Overload; Oxidative Stress; Hemochromatosis; Tumor Necrosis Factor-alpha

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Doenças da célula progenitora hematopoética: interface e situações de diagnóstico difícil.....	26
Figura 2 - Patogênese da SMD: múltiplos fatores envolvidos .....	29
Figura 3 - Mecanismos envolvidos na patogênese da SMD .....	31
Figura 4 - Alterações citogenéticas comuns em 2.124 pacientes com SMD ....	32
Figura 5 - Representação de uma cariotipagem por banda G .....	34
Figura 6 - Metabolismo do ferro .....	40
Figura 7 - Sistemas antioxidantes não enzimático e enzimático .....	48
Figura 8 - Mecanismo de produção, transporte e armazenamento do ferro ....	49
Figura 9 - Fluxograma das principais etapas do estudo .....	73
Figura 10- Delineamento da metodologia da pesquisa.....	74
Figura 11- Distribuição dos 101 pacientes portadores de SMD, segundo a classificação.....	76
Figura 12- Distribuição dos pacientes portadores de SMD primária, segundo Sistema Internacional de Escore Prognóstico (IPSS-1997).....	77
Figura 13- Análise citogenética, segundo a classificação do IPSS nos portadores de SMD, sem e com sobrecarga de ferro .....	81
Figura 14- Citogenética clássica (bandamento G). Cariótipo com uma alteração cromossômica: 46, XY,del(5).....	82
Figura 15- Citogenética clássica (bandamento G). Cariótipo com duas alterações cromossômicas 6,XY,del(5)(q15q33)del(11)(q23).....	83
Figura 16- Citogenética clássica (bandamento G). Cariótipo complexo: 48,XY,add(13)(p11),+22,+mar .....	83
Figura 17- Dosagem de hemoglobina nos portadores de SMD sem e com sobrecarga de ferro e indivíduos saudáveis .....	86
Figura 18- Ferritina sérica em portadores de SMD sem e com sobrecarga de ferro e indivíduos saudáveis .....	87
Figura 19- Ferro sérico nos portadores de SMD sem e com sobrecarga de ferro e indivíduos saudáveis .....	87
Figura 20- Índice de saturação da transferrina em portadores de SMD sem e com sobrecarga de ferro e indivíduos saudáveis .....	88



Figura 21-	Nível de ácido úrico em portadores de SMD sem e com sobrecarga de ferro e indivíduos saudáveis .....	89
Figura 22-	Alanina aminotransferase (ALT) em portadores de SMD sem e com sobrecarga de ferro e indivíduos saudáveis .....	89
Figura 23-	Lactato desidrogenase (LDH) em portadores de SMD sem e com sobrecarga de ferro e indivíduos saudáveis .....	90
Figura 24-	Nível de malonaldeído (MDA) em portadores de SMD sem e com sobrecarga de ferro e indivíduos saudáveis .....	91
Figura 25-	Nível de nitrito em portadores de SMD sem e com sobrecarga de ferro e indivíduos saudáveis .....	91
Figura 26-	Atividade da enzima antioxidante glutaciona peroxidase em portadores de SMD sem e com sobrecarga de ferro e indivíduos saudáveis .....	92
Figura 27-	Atividade da superóxido dismutase em portadores de SMD sem e com sobrecarga de ferro e indivíduos saudáveis .....	92
Figura 28-	Atividade da enzima antioxidante catalase em portadores de SMD sem e com sobrecarga de ferro e indivíduos saudáveis .....	93
Figura 29-	Atividade do fator de necrose tumoral $\alpha$ em portadores de SMD sem e com sobrecarga de ferro e indivíduos saudáveis .....	94
Figura 30-	Correlação entre o nível de ferritina e hemoglobina nos pacientes com SMD.....	94
Figura 31-	Correlação entre o nível de ferritina e malonaldeído nos pacientes com SMD.....	95
Figura 32-	Correlação entre o nível de ferritina e nitrito nos pacientes com SMD. ....	96
Figura 33-	Correlação entre o nível de malonaldeído e nitrito nos pacientes com SMD .....	96
Figura 34-	Correlação entre o nível de ferritina e superóxido dismutase nos pacientes com SMD .....	97
Figura 35-	Correlação entre o nível de ferritina e atividade da catalase nos pacientes com SMD .....	97
Figura 36-	Correlação entre o nível de ferritina e glutaciona peroxidase nos pacientes com SMD .....	98
Figura 37-	Correlação entre o fator de necrose tumoral- $\alpha$ e o nível de ferritina	

	nos pacientes com SMD .....	97
Figura 38-	Número de indivíduos com análise do gene HFE (portadores de SMD sem e com sobrecarga de ferro e indivíduos saudáveis)....	102
Figura 39-	Representação da PCR – RFLP após digestão enzimática dos polimorfismos C282Y, H63D e S65C em seis pacientes .....	104

## LISTA DE TABELAS E QUADROS

Tabela 1 -	Nova proposta de estratificação citogenética .....	33
Tabela 2 -	Índice de comorbidades .....	38
Tabela 3 -	Características clínicas e epidemiológicas dos portadores de SMD sem e com sobrecarga de ferro .....	78
Tabela 4 -	Dados citogenéticos dos pacientes com SMD sem e com sobrecarga de ferro .....	80
Tabela 5 -	Características laboratoriais dos indivíduos saudáveis e portadores sem e com sobrecarga de ferro .....	84
Tabela 6 -	Características clínicas e laboratoriais dos portadores de SMD sem e com sobrecarga de ferro e voluntários saudáveis com análise do gene HFE .....	99
Tabela 7 -	Distribuição da frequência genotípica para o gene HFE em relação ao sexo em voluntários saudáveis e portadores de SMD .....	101
Tabela 8 -	Frequência alélica para a mutação do gene HFE (C282Y e H63D) em voluntários saudáveis, portadores de SMD sem e com sobrecarga de ferro .....	103
Tabela 9 -	Análises dos parâmetros laboratoriais entre os indivíduos saudáveis e portadores de SMD sem e com sobrecarga de ferro ....	106
Tabela 10 -	Avaliação laboratorial nos pacientes portadores de SMD, mutantes e não mutantes para o gene HFE .....	107
Quadro 1 –	Protocolo de exclusão de causas não clonais de citopenias e/ou dispoeses .....	60
Quadro 2 –	Polimorfismo do gene HFE: localização, substituição, sequência, enzima de restrição e tamanho do fragmento.....	71
Quadro 3 –	Fragmentos obtidos após digestão do produto de PCR e seu significado .....	72

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

μL	Microlitro
ALIP	<i>Anormal localization of imature precursors.</i>
AR	Anemia refratária
AREB	Anemia refratária com excesso de blastos
AREB-t	AREB em transformação
ARSA	Anemia refratária com sideroblastos em anel
ARSA-T	ARSA com trombocitose
AST/TGO	Aspartato aminotransferase
ALT/TGP	Alanina aminotransferase
β <sub>2</sub> M	β2-microglobulina
CAT	Catalase
CTLF	Capacidade total de ligação do ferro
CRDM	Citopenia refratária com displasia multilinhagem
CRDM-AS	CRDM com sideroblastos em anel
CRDU	Citopenia refratária com displasia unilinhagem
CTH	Células-tronco hematopoéticas
Del	Deleção
DNA	Ácido desoxirribonucléico
EROs	Espécies reativas derivadas do oxigênio
FAB	Franco-americano-britânico
GPx	Glutathiona peroxidase
Hb	Hemoglobina
HT	Hemossiderose transfusional
HLA	Antígeno leucocitário humano
HPN	Hemoglobinúria paroxística noturna
HH	Hemocromatose hereditária
IFN-γ	Interferon gama
IL	Interleucina
IPI	Índice prognóstico internacional
IPSS	<i>International Prognostic Score System</i>
LMA	Leucemia mielóide aguda

LMMC	Leucemia mielomonocítica crônica
LMMJ	Leucemia mielomonocítica juvenil
MDA	Malonaldeído
MgCl <sub>2</sub>	Cloreto de magnésio
mL	Mililitros
mM	MiliMolar
NADP	<i>Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate</i>
NF-κB	<i>Nuclear factor kappa-B</i>
ng	Nanograma
nM	NanoMolar
NR	Neutropenia refratária
°C	Graus Celsius
OMS	Organização Mundial da Saúde
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i>
RNA	Ácido ribonucleico
IST	Índice de Saturação da transferrina
SEER	<i>Surveillance, Epidemiology, and End Results</i>
SF	Sobrecarga de ferro
SIDA	Síndrome da imunodeficiência adquirida
SMD	Síndrome mielodisplástica
SMD/NMP	SMD/ neoplasias mieloproliferativas
SMD-I	Síndrome mielodisplástica inclassificável.
SOD	Superóxido dismutase
TA	Temperatura ambiente
TNF-α	Fator de necrose tumoral - α
TR	Trombocitopenia refratária
WHO	<i>World Health Organization</i>
WPSS	<i>WHO Classification-based Prognostic Scoring System.</i>

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b>	<b>24</b>
<b>1.1</b>	<b>Síndrome mielodisplástica</b>	<b>24</b>
<b>1.1.1</b>	<b><i>Aspectos gerais</i></b>	<b>24</b>
<b>1.1.2</b>	<b><i>Aspectos epidemiológicos</i></b>	<b>26</b>
<b>1.1.3</b>	<b><i>Etiologia</i></b>	<b>27</b>
<b>1.1.4</b>	<b><i>Patogênese</i></b>	<b>28</b>
<b>1.1.5</b>	<b><i>Diagnóstico</i></b>	<b>31</b>
<b>1.1.6</b>	<b><i>Classificação</i></b>	<b>34</b>
<b>1.1.7</b>	<b><i>Prognóstico – estratificação de risco</i></b>	<b>36</b>
<b>1.1.8</b>	<b><i>Tratamento</i></b>	<b>38</b>
<b>1.1.9</b>	<b>Metabolismo do ferro e estresse oxidativo</b>	<b>39</b>
<b>1.1.10</b>	<b><i>Geração e tipos de radicais livres</i></b>	<b>42</b>
<b>1.1.11</b>	<b><i>O ferro na geração de radicais livres e estresse oxidativo</i></b>	<b>42</b>
<b>1.1.12</b>	<b><i>Estresse oxidativo e sua relação com as doenças</i></b>	<b>44</b>
<b>1.1.13</b>	<b><i>Sobrecarga de ferro</i></b>	<b>49</b>
<b>1.1.14</b>	<b><i>Sobrecarga de ferro e estresse oxidativo em SMD</i></b>	<b>51</b>
<b>1.1.15</b>	<b><i>Hemocromatose hereditária/gene HFE</i></b>	<b>52</b>
<b>1.1.16</b>	<b><i>Fator de necrose tumoral <math>\alpha</math> e estresse oxidativo</i></b>	<b>55</b>
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS</b>	<b>58</b>
<b>2.1</b>	<b>Objetivo geral</b>	<b>58</b>
<b>2.2</b>	<b>Objetivos específicos</b>	<b>58</b>
<b>3</b>	<b>CASUÍSTICA E MÉTODOS</b>	<b>60</b>
<b>3.1</b>	<b>Casuística e aspectos éticos</b>	<b>60</b>
<b>3.1.1</b>	<b><i>Desenho do estudo</i></b>	<b>60</b>
<b>3.1.2</b>	<b><i>Critérios de inclusão dos casos</i></b>	<b>60</b>
<b>3.1.3</b>	<b><i>Critérios de exclusão e descontinuidade para os casos</i></b>	<b>61</b>
<b>3.1.4</b>	<b><i>Critérios de inclusão e exclusão para os controles</i></b>	<b>61</b>
<b>3.1.5</b>	<b><i>Aspectos éticos e legais</i></b>	<b>62</b>
<b>3.2</b>	<b>Dados clínicos e coleta de amostras biológicas</b>	<b>62</b>
<b>3.3</b>	<b>Preparação de amostras e testes realizados</b>	<b>63</b>
<b>3.3.1</b>	<b><i>Determinação do perfil hematológico</i></b>	<b>63</b>
<b>3.3.2</b>	<b><i>Determinação da sobrecarga do ferro, avaliação bioquímica e do</i></b>	

	<i>fator de necrose tumoral <math>\alpha</math> (TNF-<math>\alpha</math>)</i> .....	64
3.3.3	<i>Determinação das espécies reativas</i> .....	64
3.3.4	<i>Análise da citogenética clássica</i> .....	68
3.3.5	<i>Análise molecular</i> .....	69
3.4	<i>Análises estatísticas</i> .....	72
4	<b>RESULTADOS</b> .....	76
4.1	<b>Características clínicas e epidemiológicas</b> .....	76
4.2	<b>Características citogenéticas</b> .....	79
4.2.1	<i>Citogenética clássica (banda G)</i> .....	79
4.3	<b>Características laboratoriais</b> .....	84
4.3.1	<i>Avaliação do estresse oxidativo</i> .....	90
4.3.2	<i>Avaliação do fator de necrose tumoral <math>\alpha</math></i> .....	93
4.3.3	<i>Correlação entre nível de hemoglobina, sobrecarga de ferro, dano oxidativo, enzimas antioxidantes e fator de necrose tumoral <math>\alpha</math> nos portadores de SMDM.</i> .....	94
4.3.4	<i>Caracterização do gene HFE</i> .....	99
4.3.5	<i>Características laboratoriais dos pacientes sem e com a mutação do gene HFE</i> .....	106
5	<b>DISCUSSÃO</b> .....	110
6	<b>CONCLUSÕES</b> .....	124
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	126
	<b>APÊNDICE A - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE ESCLARECIDO PARA PARTICIPAÇÃO EM PESQUISA</b> .....	148
	<b>APÊNDICE B - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO - PARTICIPAÇÃO EM PESQUISA COMO GRUPO CONTROLE</b> .....	149
	<b>APÊNDICE C - PROTOCOLO DE ACOMPANHAMENTO – QUESTIONÁRIO</b> .....	150
	<b>ANEXO A - CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS E DEMOGRÁFICAS DE 124 PORTADORES DE SMD ATENDIDOS DE MAIO DE 2010 A SETEMBRO DE 2011, NO SERVIÇO DE HEMATOLOGIA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ</b> .....	151
	<b>ANEXO B – PROTOCOLOS</b> .....	153
	<b>ANEXO C - ARTIGOS PUBLICADOS</b> .....	157

# INTRODUÇÃO



## 1 INTRODUÇÃO

### 1.1 Síndromes mielodisplásticas

#### 1.1.1 Aspectos gerais

As síndromes mielodisplásticas (SMDs) constituem um grupo heterogêneo de doenças hematopoéticas de origem clonal, caracterizadas por displasia (alterações de maturação) em uma ou mais linhagens celulares, citopenias periféricas isoladas ou combinadas e risco aumentado de progressão para leucemia aguda (SWERDLOW *et al.*, 2008).

As SMDs acometem indivíduos de todas as idades e estão entre as doenças onco-hematológicas mais comuns na população com idade superior a 60 anos (GERMING *et al.*, 2008; BARZI; SEKERES, 2010). A incidência aumenta com a idade e em pacientes acima de 70 anos está estimada em mais de 25 novos casos por 100.000 habitantes/ano.

É classificada como primária (*de novo*) ou secundária, se relacionada a tratamento quimio ou radioterápico prévio (GREENBERG *et al.*, 1997; KOUIDES; BENNETT, 1997). Portadores de SMD secundária têm pior prognóstico quando comparados aos pacientes com SMD *de novo* (MUTFI, 2004; TEFFERI; VARDIMAN, 2009), uma vez que apresentam citopenias mais severas, displasias medulares mais acentuadas com acometimento das três linhagens hematopoéticas. Esses pacientes apresentam, também, um maior número de alterações citogenéticas complexas (>3 alterações) e uma maior frequência de evolução para LMA.

As principais manifestações clínicas são a anemia, com necessidade transfusional frequente, as manifestações hemorrágicas devidas à plaquetopenia e as infecções recorrentes, consequências de graus variáveis de neutropenia (GREENBERG *et al.*, 1997; CORDOBA *et al.*, 2012, DAYYANI *et al.*, 2012).

O diagnóstico de SMD leva em consideração o hemograma, o mielograma, a biopsia de medula óssea e a citogenética de células de medula óssea por banda-G (GERMING *et al.*, 2008). O critério morfológico mínimo para o diagnóstico de SMD é a presença de displasia em 10% ou mais das células de uma ou mais linhagens hematopoéticas (SWERDLOW *et al.*, 2008; TEFFERI; VARDIMAN, 2009).

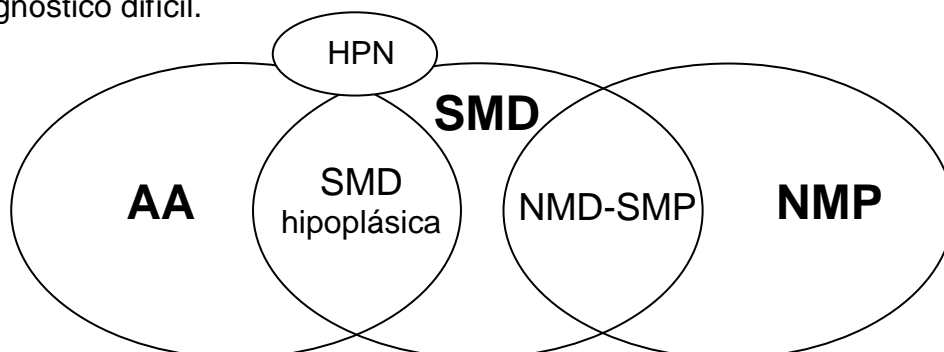
A medula óssea, na maioria dos pacientes, é hipercelular apesar das citopenias apresentadas no sangue periférico. Essa hematopoese ineficaz é atribuída à suscetibilidade anormal à apoptose das células progenitoras e à capacidade de resposta limitada dessas células aos fatores de crescimento. Acredita-se que esses sinais pró-apoptóticos resultam de uma sinalização anormal, causada pelo excesso de citocinas pró-inflamatórias e/ou resposta imune alterada das células T (TEFFERI; VARDIMAN, 2009). A fibrose medular, estratificada em graus 0, 1, 2 ou 3, está presente em aproximadamente 17% dos casos (DELLA PORTA *et al.*, 2009).

A presença de citopenias associadas a alterações displásicas medulares também pode ser devida a condições não clonais, secundárias e reversíveis. O etilismo, doenças inflamatórias crônicas, auto-imunes, doenças tireoidianas, insuficiência hepática ou renal, disfunções hormonais da glândula tireóide e infecções, incluindo a síndrome da imunodeficiência adquirida (SIDA), devem ser excluídos (MAGALHÃES; LORAND-METZE, 2004; TEFFERI; VARDIMAN, 2009). O diagnóstico diferencial com outras causas de anemia como deficiência de vitamina B12 e ácido fólico deve ser realizado.

Exposição recente a metais pesados, terapia citotóxica ou fatores de crescimento devem ser considerados como fatores de exclusão absolutos (MAGALHÃES; LORAND-METZE, 2004).

Algumas doenças da célula-tronco também devem ser consideradas no diagnóstico diferencial. Nos casos de SMD hipocelular, mielofibrose primária, hemoglobinúria paroxística noturna (HPN) e anemia aplástica podem constituir condições de diagnóstico diferencial difícil por apresentarem achados similares ou que se sobrepõem. Em alguns casos, somente o seguimento e a evolução da condição permitem a distinção entre essas doenças (MAGALHÃES; LORAND-METZE, 2004) (**Figura 1**).

**Figura 1** - Doenças da célula progenitora hematopoética: interface e situações de diagnóstico difícil.



Legenda: AA (anemia aplástica); HPN (hemoglobinúria paroxística noturna); NMP (neoplasias mieloproliferativas); NMD-SMP (neoplasias mielodisplásticas - síndromes mieloproliferativas); SMD (síndromes mielodisplásticas);

Fonte: MAGALHÃES; LORAND-METZE (2004).

### **1.1.2 Aspectos epidemiológicos**

Somente em 2001 a SMD passou a ser reportada de forma sistemática nos Estados Unidos, através de um programa de vigilância epidemiológica do Instituto Nacional de Saúde Americano (*Surveillance, Epidemiology, and End Results (SEER) Program – National Institute of Health, 2011*). Essa iniciativa proporcionou a primeira oportunidade de analisar a incidência e sobrevida de pacientes com SMD nesse país, usando um grande banco de dados de base populacional (MA X, 2007; ROLLISON *et al.*, 2008).

De acordo com esses dados, aproximadamente 12.000 pacientes são diagnosticados com SMD por ano nos Estados Unidos. Esses dados indicam que há significativamente mais pacientes com SMD do que com leucemias agudas ou neoplasias mieloproliferativas (GERMING *et al.*, 2008; KOMROKJI; ZHANG; BENNETT, 2010).

Ainda de acordo com esse levantamento, foi relatada uma incidência anual de 5,4 a 36,2/100.000 em pessoas entre 60 e 84 anos, sendo 86,4% dos pacientes diagnosticados com mais de 60 anos e apenas 6% com menos de 50 anos (MA X, 2007). Em geral, 3,4 novos casos por 100.000 habitantes/ano são diagnosticados nos EUA (MA X, 2007), valor aproximado ao que se observa na Alemanha, com taxa de 4,1 por 100.000 habitantes/ano (GERMING *et al.*, 2008).

O aparente aumento da incidência de SMD tem sido atribuído principalmente ao rápido envelhecimento populacional, melhor conhecimento sobre a doença além de melhorias na assistência médica geriátrica e no uso mais generalizado de métodos diagnósticos invasivos nesse grupo de pacientes.

Outro aspecto de interesse é a variação geográfica da doença. Em países asiáticos, a média de idade ao diagnóstico é cerca de 10 a 15 anos inferior à média de idade observada na Alemanha (GERMING *et al.*, 2008). Dados do Zimbábue, Turquia, Índia, Coréia, China, Tailândia e Japão sugerem que nestes países a SMD afeta indivíduos idosos mais jovens. É possível que esta diferença seja devida ao fato da população ser globalmente mais jovem na África e em muitos países asiáticos do que nos países da Europa e América do Norte (SEKERES; COSGROVE; FALCO, 2006). Outra possibilidade é que existam de fato, fatores étnicos e ambientais que justifiquem essas variações geográficas (SEKERES; COSGROVE; FALCO, 2006; MA X, 2007; ROLLISON *et al.*, 2008). A incidência no sexo masculino é maior do que no sexo feminino (4,5 vs. 2,7 por 100 000 habitantes/ano) (MA X, 2007).

No Brasil, existem poucos dados sobre a epidemiologia dos pacientes com SMD. Em 2010, dados preliminares sobre aspectos demográficos, clínico-patológicos e terapêuticos foram apresentados por Magalhães *et al.* (2010). Essas informações foram obtidas em 12 centros de atenção terciária de referência das regiões Nordeste, Sudeste, Sul e Centro-Oeste, a partir de 476 pacientes brasileiros com SMD diagnosticados no período de 2003 a 2007. A média de idade desses pacientes foi de 68,3 anos, menor que a observada nos EUA e Europa e superior ao Japão e à Coréia. Destes, 50,8% eram mulheres (MAGALHÃES *et al.*, 2010).

### **1.1.3 Etiologia**

A SMD primária (*de novo*) ocorre sem um evento prévio identificado e representa 80-90% de todos os casos (MUTFI, 2004; PEDERSEN-BJERGAARD; ANDERSEN; ANDERSEN, 2007). A SMD secundária ou SMD-t (terapia induzida) se desenvolve de quatro a sete anos após a exposição aos agentes utilizados no tratamento de outras malignidades (LI *et al.*, 2009).

A associação com a idade avançada sugere dano genético cumulativo causado por exposição prolongada/continuada a agentes mielotóxicos e/ou

susceptibilidade genética (COREY *et al.*, 2007). Fatores de risco incluem exposição ocupacional ou ambiental ao benzeno e outros solventes, combustível diesel, tabagismo, terapia imunossupressora, agentes químicos (fertilizantes, pesticidas, herbicidas), radiações ionizantes e tintura de cabelo (GERMING *et al.*, 2008; BJORK *et al.*, 2009).

Doenças congênitas como a síndrome de Down, disceratose congênita, anemia de Fanconi, síndrome de Bloom, síndrome de Shwachmann-Diamond e Diamond-Blackfan possuem uma maior predisposição para o desenvolvimento de doenças neoplásicas devido à instabilidade genômica e, de forma peculiar, tendem a progredir para SMD/LMA, porém o mecanismo ainda não é totalmente conhecido (GERMING *et al.*, 2008; SEKERES, 2010).

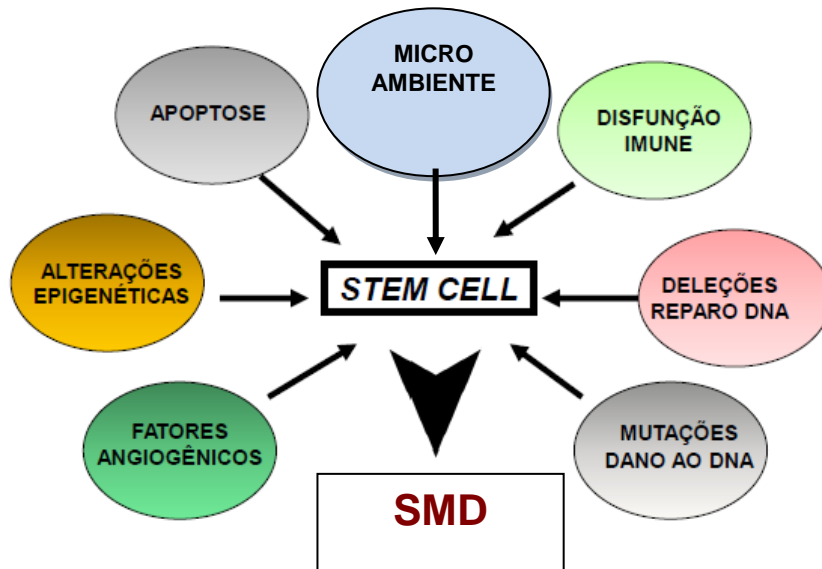
#### **1.1.4 Patogênese**

A SMD tem patogênese complexa e envolve anormalidades na regulação da proliferação, diferenciação e morte celulares incluindo mecanismos genéticos, epigenéticos e imunomediados (JANSSEN *et al.*, 1989; STEENSMA, 2007; JÄDERSTEN; HELLSTRÖM-LINDBERG, 2009; BEJAR; LEVINE; EBERT, 2011).

Seu desenvolvimento é um processo que envolve provavelmente múltiplas etapas: um evento genético inicial leva ao aparecimento de um clone anormal precursor de células hematopoéticas disfuncionais e morfologicamente displásicas (NAEIM; RAO; GRODY, 2008). Sucessivas alterações genéticas levam à proliferação e expansão clonal, sinalizações aberrantes, bloqueio da diferenciação, instabilidade genômica e evolução para LMA (LOOK, 2005).

Diversos genes apresentam-se alterados na SMD, incluindo genes reguladores do ciclo celular, fatores de crescimento, genes imunorreguladores das citocinas e genes reguladores da metilação (**Figura 2**).

**Figura 2-** Patogênese da SMD: múltiplos fatores envolvidos



Recentemente mutações recorrentes com impacto prognóstico independente foram identificadas, o que potencialmente constitui novas estratégias de diagnóstico e possíveis alvos terapêuticos, além da identificação de biomarcadores preditivos de resposta a diferentes drogas (BEJAR; LEVINE; EBERT, 2011).

Mecanismos epigenéticos são capazes de alterar a expressão gênica sem induzir mudanças estruturais na sequência do DNA. A hipermetilação pode induzir, de forma reversível, o silenciamento de genes importantes envolvidos no controle do ciclo celular, como os genes supressores de tumor. Diferentemente das mutações, as alterações epigenéticas são reversíveis, o que abre perspectivas para o tratamento isolado ou combinado com outras drogas (BEJAR; LEVINE; EBERT, 2011).

Alterações nos mecanismos imunológicos, com consequente distúrbios no perfil de citocinas secretadas são observadas o que leva a um importante aumento na produção dessas citocinas, como: TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-2, IL-6, IL-12 e INF- $\gamma$ , por parte dos fibroblastos e macrófagos. Elas promovem a expansão clonal das células T, elevando ainda mais o índice de apoptose, com proliferação e aumento da citotoxicidade dos TCD8<sup>+</sup> (ROSENFELD; LIST, 2000; MUTFI, 2004; BERNASCONI, 2008).

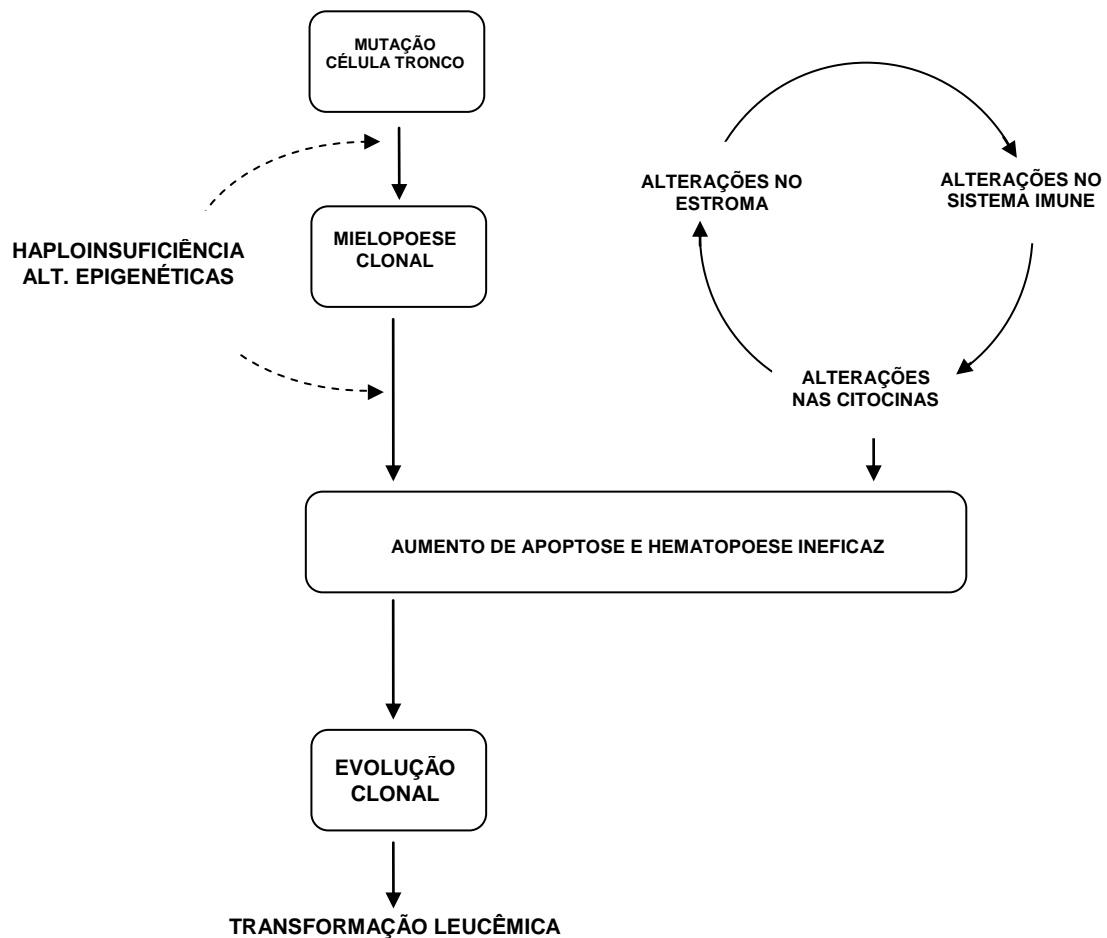
O TNF- $\alpha$  desempenha papel importante nas doenças inflamatórias crônicas e demonstra efeitos pró-oncológicos. Quando produzido pelas células tumorais e células inflamatórias no microambiente do tumor pode promover a sobrevivência dessas células através da indução de genes que codificam as moléculas anti-apoptóticas NF- $\kappa$ B-dependente (LUO *et al.*, 2004).

Dentro da região promotora de TNF- $\alpha$ , podem ocorrer polimorfismos genéticos levando à produção aumentada de TNF- $\alpha$ , o que está associado ao aumento de câncer de bexiga, câncer de mama, carcinoma hepatocelular, bem como cânceres hematológicos (YANG, 2006).

Alterações no microambiente foram demonstradas como capazes de induzir SMD, contrariando o conhecimento prévio de que a doença se iniciaria exclusivamente a partir de múltiplas lesões na célula tronco hematopoética. A interação da célula com seu nicho é cada vez mais estudada e reconhecida como um sistema dinâmico necessário para a homeostase e que pode, eventualmente, ser alvo de novas modalidades terapêuticas (BEJAR; LEVINE; EBERT, 2011).

A expansão clonal pode ocorrer através do aumento na proliferação ou por resistência a apoptose e o microambiente medular pode favorecer o desenvolvimento do clone neoplásico (BEJAR; LEVINE; EBERT, 2011) **(Figura 3)**.

**Figura 3** - Mecanismos envolvidos na patogênese da SMD.



Fonte: Adaptado de: TEFFERI; VARDIMAN (2009).

### 1.1.5 Diagnóstico

Requisitos mínimos para diagnóstico de pacientes com suspeita de SMD incluem: história clínica e exame físico detalhados, hemograma, contagem de reticulócitos, mielograma com coloração para ferro, biópsia óssea com avaliação da reticulina e citogenética (banda G) (GREENBERG, 2005).

A apresentação clínica típica inclui sinais e sintomas decorrentes da anemia, da neutropenia e/ou da trombocitopenia (NIMER, 2008).

O hemograma mostra anemia em aproximadamente 80% dos pacientes. Neutropenia e plaquetopenia podem ser isoladas ou associadas à anemia e são observadas em cerca de 40% dos pacientes ao diagnóstico (STEENSMA; BENNET, 2006; STEENSMA, 2009).

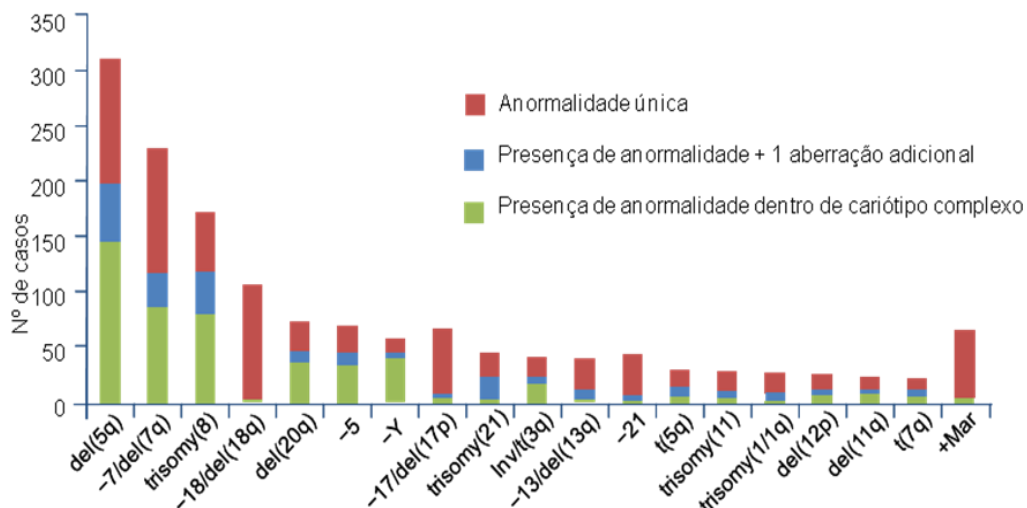


A análise do aspirado medular mostra alterações morfológicas displásticas em uma ou mais linhagens celulares (>10%) e é, até os dias atuais, a base para o diagnóstico (BENNETT, 2013).

A biopsia óssea é necessária para o diagnóstico oferecendo informações adicionais quanto à celularidade, displasia, particularmente megacariocítica, grau de fibrose, desarranjo arquitetural e localização anormal de precursores imaturos (ALIP). Permite ainda o diagnóstico diferencial com outras doenças como anemia aplástica, tricoleucemia, linfoma ou metástases (ORIANI *et al.*, 1996).

Cerca de 30-50% dos casos de SMD *de novo* e 95% dos pacientes com SMD secundária apresentam alterações cromossômicas. A análise citogenética da medula óssea está indicada não apenas para detectar anormalidades cromossômicas recorrentes como também, de forma sequencial, para avaliar a evolução clonal contribuindo assim para o diagnóstico e seguimento dos pacientes. Tem, portanto, importante função na estratificação de risco e decisão terapêutica (HIRAI, 2003; MUTFI, 2004; LOOK, 2005; HAASE, 2008; NAEIM; RAO; GRODY, 2008) (**Figura 4**).

**Figura 4** – Alterações citogenéticas comuns em 2.124 pacientes com SMD



Fonte: Haase *et al.*, 2007.

As deleções são as alterações mais comuns, embora translocações e perda ou ganho de cromossomos inteiros possam ocorrer (FENAUX, 2001). As alterações estruturais e numéricas encontradas em SMD podem ser distribuídas em 3 tipos: **1)** alterações não balanceadas, com perda ou ganho de material

cromossômico; **2)** alterações balanceadas, com rearranjos cromossômicos sem nenhuma perda ou ganho visível de material; **3)** cariótipo normal (PEDERSEN-BJERGAARD; ANDERSEN; ANDERSEN, 2007).

Recentemente, Schanz *et al.* (2012) refinaram a estratificação citogenética, criando novos grupos de impacto prognóstico a partir da análise de 2902 pacientes em um estudo multicêntrico. As alterações citogenéticas encontradas foram classificadas em 5 subgrupos: muito bom prognóstico; bom prognóstico; prognóstico intermediário; prognóstico desfavorável e muito desfavorável, com sobrevida média de 60.8, 48.6, 26.0, 15.8 e 5.9 meses, respectivamente (SCHANZ *et al.*, 2012) **(Tabela 1) (Figura 5)**.

**Tabela 1** – Nova proposta de estratificação citogenética.

GRUPO DE RISCO	ALTERAÇÕES CITOGENÉTICAS	SOBREVIDA MÉDIA (m)	TEMPO DE EVOLUÇÃO 25% DE EVOLUÇÃO P/ LMA (m)
MUITO FAVORÁVEL	del(11q), -Y	60.8	NA
FAVORÁVEL	normal, del(12p), del(20q), del(5q) isolada ou com 1 alteração adicional	48.6	NA
INTERMEDIÁRIO	del(7q), +8, i(17q), +19, +21, demais clones com 1 alteração, clones com 2 alterações (exceto del(5q)+1)	26.0	78.0
DESFAVORÁVEL	inv(3)/t(3q)/del(3q), -7, -7/del(7q) com 1 alteração adicional, cariótipo complexo (até 3 alterações).	15.8	21.0
MUITO DESFAVORÁVEL	Cariótipo complexo (>3 alterações)	5.9	8.2

**Legenda:** NA = não alcançado m = (meses)

Fonte: Adaptado de SCHANZ *et al.* (2012).

**Figura 5** – Representação de uma cariotipagem por banda G mostrando alteração recorrente na SMD.



### 1.1.6 Classificação

Um sistema de classificação que estima a sobrevida dos pacientes e a probabilidade de evolução para LMA orienta a terapia mais adequada e é necessário dada a complexidade e heterogeneidade da SMD (MUFTI *et al.*, 2008).

A classificação do grupo franco-americano-britânico (FAB) foi baseada exclusivamente em critérios citomorfológicos e distingue cinco subgrupos: Anemia Refratária (AR); AR com Sideroblastos em Anel (ARSA), Leucemia Mielomonocítica Crônica (LMMC); AR com Excesso de Blastos (AREB) e AREB em transformação (AREB-t) (BENNETT *et al.*, 1976, 1982).

Classifica-se como; **1)** AR: pacientes com anemia, menos de 5% de mieloblastos e menos que 15% de sideroblastos em anel; **2)** ARSA: pacientes com 15% ou mais de sideroblastos em anel; **3)** AREB: pacientes com 5-20% de mieloblastos; **4)** AREB-t: pacientes com 20-30% de mieloblastos e **5)** LMMC: pacientes com monocitose absoluta persistente no sangue periférico ( $>1 \times 10^9/L$ ) (BENNETT *et al.*, 1982).

A classificação FAB tem limitações por não considerar critérios importantes como o número de linhagens acometidas, a intensidade das citopenias e a presença de alteração citogenética, mas teve a vantagem de estimar e agrupar pela primeira vez a sobrevida e o risco de transformação para LMA.

Em 1999, um comitê da Organização Mundial da Saúde (OMS) propôs modificação na classificação FAB e incorporou características biológicas e genéticas. A partir de 2001, as subcategorias tornaram-se mais homogêneas e novos critérios foram incluídos na estratificação (JAFFE *et al.*, 2001). O grupo AREB foi dividido em AREB I, com 5 a 9% de blastos na medula e AREB II, com 10 a 19% e o percentual de blastos para diagnóstico de LMA foi reduzido de 30 para 20%. Essa redução foi proposta após a observação de que pacientes no grupo AREB-t apresentavam prognóstico semelhante àqueles com LMA (KOMROKJI; ZHANG; BENNETT, 2010).

Os grupos AR e ARSA passaram a agrupar apenas pacientes com displasia restrita à linhagem eritróide. Foram excluídos os subtipos AREB-t e LMMC. A LMMC por suas características clínicas e biológicas foi considerada um quadro intermediário entre SMD e neoplasias mieloproliferativas (NMP), assim como a leucemia mielomonocítica juvenil e a leucemia mielóide crônica atípica (JAFFE *et al.*, 2001).

Também, foi introduzido o subtipo citopenia refratária com displasia multilinhagem (CRDM), com maior grau de insuficiência medular e curso mais agressivo. Nesse grupo, além da displasia na linhagem eritróide os pacientes também apresentam mais de 10% de displasia nas linhagens granulocítica e/ou megacariocítica.

A classificação da OMS categorizou como síndrome 5q- pacientes que apresentam deleção isolada do braço longo do cromossomo 5 e menos de 5% de blastos na medula óssea. Esses pacientes apresentam bom prognóstico, com baixa probabilidade de evolução para LMA (JAFFE *et al.*, 2001).

Casos que não preenchem critérios para as outras categorias foram agrupados como SMD não classificável (SMD-U) (JAFFE *et al.*, 2001).

A classificação da OMS foi revisada e atualizada em setembro de 2008 e algumas mudanças foram propostas com o objetivo de criar categorias mais precisas. Foram propostos os subtipos citopenia refratária com displasia unlinhagem (CRDU), que inclui AR, neutropenia refratária (NR) e trombocitopenia refratária (TR), ARSA, AREB I e II, CRDM, SMD não classificável (SMD-U) a qual agrupou pacientes com citopenia persistente (>6 meses) sem displasia significativa mas com alteração citogenética recorrente e a SMD associada à deleção 5q- isolada. (SWERDLOW *et al.*, 2008).

### **1.1.7 Prognóstico – estratificação de risco**

A idade avançada e as comorbidades tornam o prognóstico mais sombrio e dificultam o manejo da doença (LICHTMAN; ROWE, 2004). Devido à grande heterogeneidade da SMD é necessário um modelo de estratificação de risco para direcionar a terapia a ser utilizada (KOMROKJI; ZHANG; BENNETT, 2010).

Mais de vinte sistemas de estratificação de risco foram propostos até 2012 com o objetivo de estimar sobrevida, probabilidade de evolução para leucemia aguda e auxiliar na decisão terapêutica. Entre eles, destacam-se: IPSS (*International Prognostic Scoring System*) (GREENBERG *et al.*, 1997), WPSS (*WHO classification-based Prognostic Scoring System*) (MALCOVATI *et al.*, 2007) e o MPSS (*MD Anderson Prognostic Scoring System*) (KANTARJIAN *et al.*, 2008). Os dois primeiros são os mais usados.

#### **IPSS (*International Prognostic Scoring System*)**

Em 1997, Greenberg *et al.*, propuseram o escore IPSS baseado em percentagem de blastos na medula óssea, tipo de alteração citogenética e número de citopenias. O sistema de escore foi desenvolvido a partir de uma coorte de 816 pacientes não tratados. A doença foi estratificada em quatro categorias prognósticas: baixo risco, risco intermediário I, risco intermediário II e alto risco, com diferenças significativas na sobrevida global e risco de transformação para LMA. A mediana de sobrevida varia de 5,7 anos para o baixo risco a 0,4 ano para o alto risco.

O IPSS foi extensivamente validado e tornou-se referência para ensaios clínicos e decisão de conduta, sendo considerado até hoje padrão-ouro para avaliação prognóstica. Contudo, apesar da sua importância histórica, apresenta várias limitações: foi desenvolvido numa época em que os critérios para SMD incluíam os casos com percentual inferior a 30% de blastos na medula óssea, não considerou a gravidade das citopenias, subestimou as alterações citogenéticas de mau prognóstico, incluiu apenas um número limitado de alterações citogenéticas, além do que não foi validado como escore dinâmico (ALESSANDRINO *et al.*, 2008; STEENSMA, 2009; KOMROKJI; ZHANG; BENNETT, 2010).

### **WPSS** (*WHO Classification-based Prognostic Scoring System*)

Em 2005, Malcovati *et al.*, desenvolveram um modelo prognóstico dinâmico baseado na classificação da OMS, criando assim o WPSS. Esse sistema inclui três fatores prognósticos: cariótipo segundo o IPSS, subgrupo WHO e um critério clínico, a dependência transfusional de hemácias. Foram propostas 5 categorias de risco: muito baixo, baixo, intermediário, alto e muito alto com medianas de sobrevida e riscos de progressão para LMA de 140 meses e 3%, 66 meses e 14%, 48 meses e 33%, 26 meses e 54% e 9 meses e 84%, respectivamente.

O impacto maior dessa proposta, quando comparada com o IPSS, foi observado nos pacientes sem excesso de blastos principalmente devido à inclusão da dependência transfusional, embora considerada um critério com muita subjetividade (GARCIA-MANERO, 2010).

Posteriormente, o critério dependência transfusional foi substituído pela presença de anemia, definida como Hb < 8mg/dL para mulheres e Hb < 9mg/dL para homens, diminuindo assim a subjetividade dessa proposta (MALCOVATI *et al.*, 2011).

### **1.1.8 Tratamento**

O tratamento da SMD continua sendo um desafio. Os portadores, em geral, têm idade superior a 60 anos o que tem impacto negativo na sobrevida global em especial para pacientes de baixo risco (MALCOVATI *et al.*, 2005). A idade indiretamente afeta também a sobrevida dos pacientes de alto risco, limitando sua elegibilidade para tratamentos mais agressivos (KUENDGEN *et al.*, 2006;

ALESSANDRINO *et al.*, 2008), estando associada a uma alta prevalência de comorbidades (REPETTO *et al.*, 2002; ZIPPERER *et al.*, 2009; GOLDBERG *et al.*, 2010; SPERR *et al.*, 2010). As comorbidades estão associadas de forma independente ao risco de morte não relacionada à leucemia. O índice de comorbidade proposto por Della Porta *et al.* (2011) estratifica os pacientes portadores de SMD em três grupos de risco (**Tabela 2**).

**Tabela 2** – SMD - Índice de comorbidades I

<b>Comorbidade</b>	<b>Pontuação</b>
Doença cardíaca	2
Doença hepática (moderada a severa)	1
Doença pulmonar severa	1
Doença renal	1
Tumor sólido	1

Baixo risco: 0 ponto, risco intermediário: 1 a 2 pontos, risco alto:> 2 pontos  
 Fonte: Adaptado de Della Porta *et al.*, 2011

A terapia apropriada deve ser considerada de forma individualizada para cada paciente levando em conta a idade, a presença de comorbidades e a estratificação de risco da doença ao diagnóstico (BARZI; SEKERES, 2010). Os objetivos são a melhora hematológica nos pacientes de mais baixo risco e a modificação da história natural da doença naqueles de maior risco (CHESON *et al.*, 2000, 2006; DELFORGE *et al.*, 2011; GHOTI *et al.*, 2011).

Aproximadamente 90% dos pacientes com SMD necessitam de transfusão de hemácias em algum momento no curso da doença e um percentual menor faz uso de concentrado de plaquetas (HELLSTROM-LINDBERG; MALCOVATI, 2008). Repetidas transfusões de hemácias resultam em sobrecarga de ferro após cerca de 20 unidades transfundidas, uma vez que cada unidade contém entre 200 e 250mg de ferro (KUSHNER; PORTER; OLIVIERI, 2001; PORTER, 2001; MALCOVATI; DELLA PORTA; CAZZOLA, 2006).

Em pacientes com doença de baixo risco, com expectativa de vida maior que um ano e que tenham recebido mais de 20 concentrados de hemácias a quelação de ferro deve ser considerada (BOWEN *et al.*, 2003). Nesses pacientes com anemia sintomática, os agentes estimuladores da eritropoese como

eritropoetina (EPO) são considerados primeira linha de tratamento (ALESSANDRINO *et al.*, 2002; BOWEN *et al.*, 2003; RIZZO *et al.*, 2008). Agentes imunomoduladores, como a talidomida, são usados para reduzir a apoptose de células hematopoéticas e os requerimentos transfusionais em um subgrupo restrito de pacientes (RAZA *et al.*, 2001; INVERNIZZI *et al.*, 2005; KALE; LIST., 2006). Todavia, respostas objetivas são poucos frequentes e restritas à serie eritróide. A lenalidomida é a droga de escolha para pacientes portadores da deleção 5q- resultando em independência transfusional em significativa parcela de pacientes e eventualmente resposta citogenética (LIST *et al.*, 2006, 2012).

Agentes hipometilantes como azacitidina e decitabina são usados nos pacientes de alto risco em diversos países, mas somente a azacitidina foi capaz de demonstrar aumento da sobrevida global (FENAUX *et al.*, 2009). O transplante de medula óssea permanece a única opção curativa, embora para um número restrito de casos (CUTLER *et al.*, 2004).

### **1.1.9 Metabolismo do ferro e estresse oxidativo**

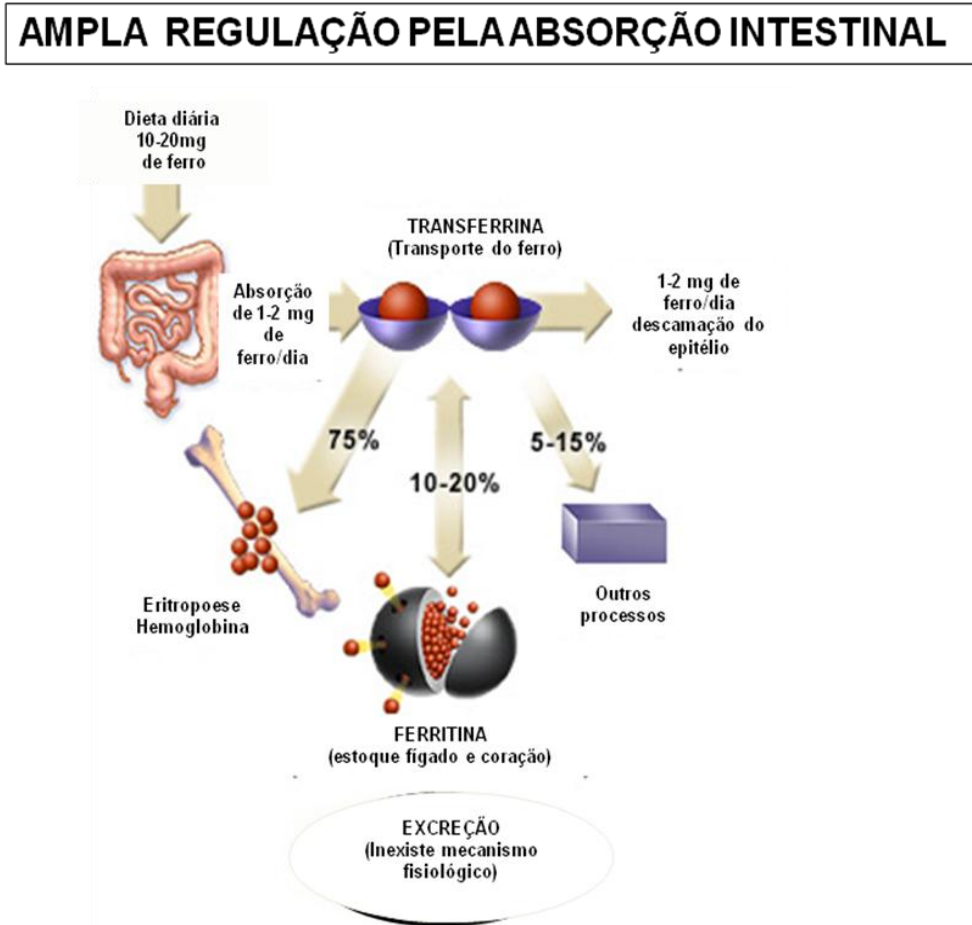
A hemoglobina é a proteína transportadora de oxigênio e constitui 95% das proteínas presentes no citosol dos eritrócitos. É um tetrâmero, de peso molecular de 64,5 kDa, composto por duas porções: a globina, fração protéica que varia geneticamente e heme, grupo prostético que contém o ferro ( $\text{Fe}^{2+}$ ) e protoporfirina. Consiste de dois pares de cadeias polipeptídicas, sendo um par de cadeias globina  $\alpha$  e outro par de cadeias  $\beta$ ,  $\gamma$  ou  $\delta$ , de acordo com o tipo de hemoglobina (TELEN; KAUFMAN, 1999).

O ferro é um elemento paradoxal, indispensável a toda forma de vida, essencialmente por assegurar o transporte de oxigênio, participar da síntese de DNA, catalisar reações de transferência de elétrons e metabolismo energético dos seres vivos (PUNTAROLO, 2005). O átomo de ferro liga-se aos quatro nitrogênios no centro do anel porfirínico e apresenta dois estados de oxidação: ferroso ( $\text{Fe}^{2+}$ ) ou férrico ( $\text{Fe}^{+3}$ ). Pode ligar-se com o oxigênio somente no estado ferroso e confere à molécula de hemoglobina sua capacidade de transporte de oxigênio (STRYER, 1995). É igualmente tóxico em razão de sua capacidade de catalisar reações oxidativas, e da produção de radicais livres (WIJAYANTI; KATZ; IMMENSCHUH, 2004; GROTTTO, 2008).



A quantidade normal de ferro corporal total em indivíduos adultos varia de 50 a 60 mg/kg de peso corporal em homens e de 35 a 40 mg/kg em mulheres. No estado de equilíbrio, 1 a 2 mg de ferro são absorvidos e excretados diariamente (DEVLIN, 2003; SIQUEIRA; ALMEIDA; ARRUDA, 2006; GROTTTO, 2008) (**Figura 6**).

**Figura 6 – Metabolismo do Ferro.**



Fonte: Grotto, 2008.

O ferro tem duas fontes principais: a dieta (BEUTLER; HOFFBRAND; COOK, 2003; SIQUEIRA; ALMEIDA; ARRUDA, 2006) e a reciclagem de hemácias senescentes (GROTTTO, 2008).

O ferro é absorvido nos enterócitos duodenais e, em menor escala, nas porções distais do intestino delgado. Uma proteína sintetizada pelo fígado, a hepcidina, é responsável pela manutenção da homeostase do ferro (CAZZOLA; DELLA PORTA; MALCOVATI, 2008).

O modo de ação da hepcidina envolve bloqueio celular do efluxo do ferro pela sua ligação à proteína ferroportina, fazendo com que haja sua internalização e degradação. O aumento na produção de hepcidina bloqueia a atividade da ferroportina nos macrófagos e enterócitos o que leva ao acúmulo de ferro no sistema retículo endotelial e reduz a quantidade de ferro absorvido da dieta. Ao contrário, sob condições de baixo fluxo de ferro, intensa atividade eritropoética e hipóxia, a síntese de hepcidina é suprimida e o ferro é liberado dos estoques celulares e absorvido a partir da dieta (NEMETH; GANZ, 2006; SANTINI *et al.*, 2011).

O ferro circula no plasma principalmente ligado à transferrina, sintetizada no fígado. Armazena-se na forma de ferritina ou hemossiderina (DEVLIN, 2003). A ferritina atua como depósito de ferro para que ocorra proteção quanto à toxicidade de sua forma livre e manutenção do estoque de reserva (EMERIT; BEAUMONT; TRIVIN, 2001; GROTTTO, 2008). Está presente no sistema retículo endotelial das células da medula óssea, baço, fígado e nos músculos esqueléticos. Estoca 4.500 átomos de ferro na forma de micelas de hidróxido férrico e, dessa forma, auxilia na manutenção do íon férrico, forma não tóxica. A incorporação do ferro na ferritina é requerida pela atividade da ferroxidase (PUNTAROLO, 2005).

Na vigência de processo infeccioso, inflamatório, neoplasia ou lesão tecidual a ferritina é produzida em grande quantidade como proteína de fase aguda. Nessas condições os resultados são de difícil interpretação, uma vez que não refletem necessariamente a sobrecarga de ferro (FINCH *et al.*, 1986; PORTER, 2005). Em boa parte dos casos, a interpretação de valores sequenciais de ferritina sérica associados aos de saturação da transferrina ajudam a diferenciar as situações reais de sobrecarga de ferro daquelas secundárias à resposta inflamatória, sem a necessidade de utilizar testes invasivos (PIPERNO, 1998).

A transferrina é uma betaglobulina sintetizada pelo fígado, responsável pelo transporte de ferro no plasma. Pode ser medida por turbidimetria a 340 nm, em soro ou plasma ou indiretamente pela Capacidade Total de Ligação do Ferro (CTLF), que se refere à quantidade total de ferro que a transferrina é capaz de se ligar.

Na prática clínica, utilizam-se testes bioquímicos para dosar parâmetros de SF, uma vez que são mais rápidos, apresentam menor custo, embora sejam menos precisos que a biópsia hepática ou a ressonância magnética.

Os mecanismos de excreção são menos desenvolvidos e eficazes do que aqueles que regulam a absorção e distribuição. No entanto, um perfeito sincronismo entre absorção, utilização e estoque de ferro é essencial para a manutenção do equilíbrio desse metal no organismo. Essa homeostase possibilita a manutenção das funções celulares essenciais e ao mesmo tempo evita possíveis danos aos órgãos e tecidos (GROTTO, 2008).

### **1.1.10 Geração e tipos de radicais livres**

A exposição das células aos radicais livres derivados da ativação do oxigênio, que têm potencial mutagênico e de destruição celular, é uma consequência inevitável do processo aeróbico.

Denomina-se radical livre qualquer íon, átomo ou molécula, com meia vida muito curta, da ordem de  $10^{-4}$  segundos, com capacidade de existência independente e que apresenta um ou mais elétrons desemparelhados no seu orbital de valência, o qual confere alta reatividade química pela tendência de procurar o seu equilíbrio tomando um elétron de uma molécula estabilizada, desestabilizando-a e causando reações em cadeia. São, dessa forma, elementos instáveis e atuam como indutores ou como produtos de reações de óxido-redução, por cederem o elétron solitário, oxidando-se ou reduzindo-se, quando recebem um elétron (FERREIRA; MATSUBARA, 1997; HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007).

Os radicais livres podem ser gerados na membrana, no citoplasma ou no núcleo das células de vários tecidos e as suas ações dependem do local onde são produzidos. Os principais fatores responsáveis pela sua produção são a respiração celular, os processos inflamatórios, a exposição a raios gama e ultravioleta, medicações, entre outras (HALLIWELL, 1993; FERREIRA; MATSUBARA, 1997; EMERIT; BEAUMONT; TRIVIN, 2001; HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007).

Entre os principais radicais livres destacam-se aqueles denominados oxiradicais e que possuem o oxigênio em sua estrutura, como ânion superóxido ( $O_2^-$ ) e o radical hidroxila ( $HO\bullet$ ), que é o mais reativo e tem ação extremamente potente, podendo alterar ou danificar qualquer estrutura celular próxima ao local no qual foi formado. Outros exemplos de radicais livres são a glutatona oxidada ( $GS\bullet$ ) com estrutura centrada no enxofre e o óxido nítrico ( $ON\bullet$ ) (HALLIWELL, 1993; FERREIRA; MATSUBARA, 1997; HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007).

Utiliza-se a expressão Espécies Reativas derivadas de Oxigênio (EROs) para abranger tanto os oxi-radicais quanto os elementos potencialmente danosos que não são radicais livres, mas são moléculas difusíveis, de baixo peso, oriundas de reduções incompletas do O<sub>2</sub> molecular, como o peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), ácido hipocloroso e ozônio (O<sub>3</sub>) (HALLIWELL, 1993; FERREIRA; MATSUBARA, 1997; HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007).

Os radicais livres podem ter ação benéfica ou deletéria em vários processos biológicos. Desempenham papéis fisiológicos importantes como o controle da pressão sanguínea, crescimento celular e sinalização intercelular, apoptose, fagocitose de agentes patogênicos, fenômeno em que essas espécies são produzidas para eliminar o agente agressor (DARLEY – HUSMAR; HALLIWELL, 1996; EMERIT; BEAUMONT; TRIVIN, 2001; VASCONCELOS *et al.*, 2007). Destacam-se como efeitos deletérios lesões nos ácidos graxos poli-insaturados das camadas fosfolipídicas das membranas, lesões em vários aminoácidos (tirosina, histidina, metionina, lisina e triptofano), cadeias carbônicas de carboidratos (ribose, proteoglicanos e ácido hialurônico), purina e pirimidina e consequente lesão nas membranas, proteínas, enzimas e DNA (MANTOVANI *et al.*, 2002).

Os eritrócitos representam um bom modelo para exemplificar a ação dos radicais livres, em que os principais focos de agressão são a membrana celular e a molécula de hemoglobina que tem a necessidade de manter o ferro integrante do grupo heme no estado ferroso, para que o mesmo possa exercer o transporte reversível de oxigênio. Qualquer modificação na estrutura química do grupo heme pode promover o deslocamento de elétrons e formar radicais livres, notadamente o radical superóxido, que inicia o processo de oxidação do eritrócito. Em condições normais, a oxidação da hemoglobina a oxi-hemoglobina produz metahemoglobina e radicais superóxido. Esses radicais sofrem dismutação pela SOD, interrompendo a propagação e geração de novos radicais livres (HEBBEL, 1986; GALLEANO; PUNTARULO, 1995).

### **1.1.11 O ferro na geração de radicais livres e estresse oxidativo**

O ferro é um metal de transição, catalisador de reação e essencial para o transporte de elétrons. Catalisa a formação de EROs, quando em excesso, pela ação de radicais hidroxila resultantes da reação do peróxido de hidrogênio com

moléculas de  $\text{Fe}^{2+}$ , ocasionando lesão de DNA e destruição celular (MELLO FILHO; HOFFMANN; MENEHINI, 1984). Daí a necessidade desse metal ser transportado associado à proteína de transporte (transferrina) e de armazenamento (ferritina) para reduzir a quantidade de ferro livre no interior das células e no meio extracelular. Essas proteínas participam da defesa antioxidante, inativando radicais e reações nocivas.

O radical superóxido tem a capacidade de mobilizar o ferro armazenado na forma de ferritina, tornando-o disponível para reações envolvendo radicais livres. O  $\text{Fe}^{2+}$  transfere um elétron para o oxigênio molecular ( $\text{O}_2$ ), com produção do superóxido ( $\text{O}_2^-$ ), que é o precursor do peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), não muito tóxico. Entretanto, ao reagir, gera um potente radical hidroxil ( $\text{HO}\cdot$ ), por meio da reação de Fenton (SIQUEIRA; ALMEIDA; ARRUDA, 2008). O peróxido de hidrogênio pode degradar proteínas que contêm grupamentos heme liberando ferro livre, que é iniciador da peroxidação dos lipídios da membrana, bem como agressor para as proteínas das membranas, enzimas, carboidratos e DNA (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1990; VASCONCELOS *et al.*, 2007; GROTTTO, 2008).

### **1.1.12 Estresse oxidativo e a sua relação com as doenças**

Numerosos e complexos produtos derivam da peroxidação lipídica. Eles são classificados em primários (hidroperóxidos lipídicos) e secundários, que derivam da ruptura dos hidroperóxidos lipídicos.

#### **• Espécies Reativas derivadas do Oxigênio (EROs)**

Em condições normais a produção das EROs ocorre em equilíbrio com a capacidade antioxidante e qualquer desequilíbrio no balanço redox de sistemas biológicos pode causar o estresse oxidativo que resulta quando a formação de EROs sobrepuja o sistema antioxidante, com dano consequente (HALLIWELL, 1993; VASCONCELOS *et al.*, 2007). A maioria das células tolera o estresse oxidativo de baixa intensidade, que geralmente se acompanha da elevação da atividade do sistema antioxidante. Entretanto, quando acentuado, resulta em alterações significativas, com aumento do cálcio intracelular, consumo de NAD e ATP, além da peroxidação lipídica (PL) (VASCONCELOS *et al.*, 2007).

A PL é o processo em cadeia no qual as ER agredem os ácidos graxos polinsaturados dos fosfolípídeos das membranas celulares, desintegram-as e permitindo a entrada de espécies reativas nas estruturas intracelulares (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1990; HALLIWELL, 1992; LIMA; ABDALLA, 2001; VASCONCELOS *et al.*, 2007). Além do radical hidroxila, que é a espécie iniciadora mais importante da PL, o ferro desempenha papel determinante nesse processo, sendo necessário, no meio, a presença de  $Fe^{3+}$  e  $Fe^{2+}$  em proporções iguais (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1990; HALLIWELL, 1992; GOGVADZE; WALTER; AMES, 2003; VASCONCELOS *et al.*, 2007). Os efeitos da PL estão relacionados às alterações da membrana celular, resultando na diminuição da sua fluidez, em alterações na permeabilidade, danos às proteínas da membrana, inativação de receptores, enzimas e canais iônicos e conseqüentemente liberação de enzimas hidrolíticas e produção de malonaldeído, culminando com a morte celular (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1990; HALLIWELL, 1992; VASCONCELOS *et al.*, 2007).

O malonaldeído (MDA) é uma molécula com alta reatividade e um produto secundário da PL das membranas, derivado da ruptura de ácidos graxos polinsaturados, como o ácido linoléico e o ácido araquidônico. Age nos fosfolípídios e nas proteínas das membranas eritrocitárias através de ligações cruzadas diminuindo a sobrevivência dos eritrócitos, sendo considerado um bom indicador de dano oxidativo no plasma sanguíneo. Níveis elevados de MDA são indicativos de aumento de peroxidação lipídica, bem como isoprostanos, lipoperóxidos e outros derivados da peroxidação lipídica das membranas celulares (FERREIRA; MATSUBARA, 1997; HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007; VASCONCELOS *et al.*, 2007; CIMEN, 2008).

- **Espécies Reativas derivadas do Nitrogênio (ERN)**

O óxido nítrico (NO) é rapidamente metabolizado a produtos estáveis, nitrito e nitrato. Quando em presença de  $O_2$ , forma  $ONOO^-$ , que promove diferentes efeitos biológicos a partir de três reações: reação redox direta, reação com  $CO_2$  formando  $CO_3$  e hemólise de ácido peroxinitroso. O método de determinação mais comumente utilizado é o de Griess que se baseia na reação de diazotação, específico para nitrito e que não detecta nitrato. O tratamento da amostra com agentes redutores ou enzimas gera o total de produtos de nitrito e nitrato, por

detecção espectrofotométrica. Existem diversas limitações para a determinação de nitrato e nitrito em sangue, destacando-se: sua meia vida curta no plasma, cerca de 1 h e 30 min, e excreção pela urina e valores plasmáticos dependentes da integridade renal. Assim, o real valor de sua determinação ainda não foi estabelecido. A combinação de NO com outras EROs gera reagentes que promovem a nitração das biomoléculas, incluindo resíduos de tirosina e tocoferol localizados nas membranas (FERREIRA; MATSUBARA, 1997; VASCONCELOS *et al.*, 2007).

Há evidências da importância do estresse oxidativo nos processos de envelhecimento, transformação e morte celular, com consequências diretas em muitos processos patológicos, entre eles, sobrecarga de ferro hereditária ou adquirida, carcinogênese, diabetes, alcoolismo, síndrome demencial, disfunções hormonais, doenças inflamatórias, doença falciforme, talassemia, cardiopatias, doenças do pulmão decorrente da exposição ao tabagismo, enxofre e quimioterápicos, radiação ionizante, retinopatias degenerativas e doenças crônico-degenerativas (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1990; FERREIRA; MATSUBARA, 1997; TRINDER *et al.*, 2002; VASCONCELOS *et al.*, 2007).

- **Defesas antioxidantes**

Os organismos aeróbios interrompem as reações em cadeia, reduzindo os níveis de  $O_2^-$ , sequestrando os metais de transição e/ou impedindo sua conversão a EROs por meio da ação de enzimas antioxidantes, as quais removem e detoxificam, assegurando a proteção das moléculas biológicas (FERREIRA; MATSUBARA, 1997; KOHEN; NISKA, 2002; VASCONCELOS *et al.*, 2007). A intensidade e patogenicidade deste desequilíbrio vão depender das concentrações locais de espécies pró e antioxidantes e da velocidade de reação com as moléculas (SCHAFER; BUETTNER, 2001).

Todas as células do organismo estão equipadas com eficiente sistema antioxidante para prevenir ou reduzir as lesões oxidativas causadas por radicais livres (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1990; FERREIRA; MATSUBARA, 1997; KOHEN; NISKA, 2002; VASCONCELOS *et al.*, 2007). É importante destacar que a composição das enzimas antioxidantes varia conforme o tipo de tecido e célula, podendo exacerbar-se frente a processos oxidativos (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1990).

Esse sistema é classificado em enzimático e não enzimático. O enzimático é representado, principalmente, pelas enzimas antioxidantes superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutathione peroxidase (GPX). A **SOD** promove a dismutação do radical superóxido ( $O_2^\bullet$ ), convertendo-o em peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) que tem reatividade limitada. A redução do peróxido de hidrogênio para água, com consequente formação do radical hidroxil altamente reativo, e a conversão desse radical novamente em água, são etapas mediadas pelas **CAT** e **GPx**, que atua sobre peróxidos em geral, com utilização de glutathione como co-fator. Além disso, as enzimas antioxidantes também inibem a formação de radicais hidroxil catalisados principalmente pelo ferro (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1990; FERREIRA; MATSUBARA, 1997; VASCONCELOS *et al.*, 2007) (**Figura 7**).

A SOD corresponde a uma família de enzimas com diferentes grupos prostéticos em sua composição. O seu papel é acelerar a dismutação do radical tóxico superóxido produzido durante o processo oxidativo, o peróxido de hidrogênio e oxigênio molecular. Atua removendo o radical superóxido, dismutando-o a  $H_2O_2$  que é menos reativo e pode ser metabolizado por outras enzimas, como a CAT e a GPx (FERREIRA; MATSUBARA, 1997; HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007; VASCONCELOS *et al.*, 2007).

A CAT é uma hemoenzima que catalisa a dismutação  $H_2O_2$  para formar  $H_2O$  e  $O_2$ . Está presente na maioria das células aeróbicas, encontrada nos eritrócitos e em menor quantidade no plasma. É formada por quatro subunidades, cada uma possui um grupo heme contendo ferro em seu sítio ativo. Os grupos heme estão orientados em direção a sítios não polares e conectados na superfície da enzima por canais e cada subunidade está unida a uma molécula de NADH (FERREIRA; MATSUBARA, 1997; HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007; VASCONCELOS *et al.*, 2007). O  $H_2O_2$  não neutralizado interage com cátions de ferro ou cobre, originando o radical livre hidroxila, causando oxidação da hemoglobina e estresse oxidativo.

A GPx integra o grupo das selenoproteínas que apresenta em seu sítio ativo o selênio obtido da alimentação. Catalisa a redução do  $H_2O_2$  e peróxidos orgânicos às custas da conversão da glutathione reduzida à sua forma oxidada (FERREIRA; MATSUBARA, 1997; HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007; VASCONCELOS *et al.*, 2007).

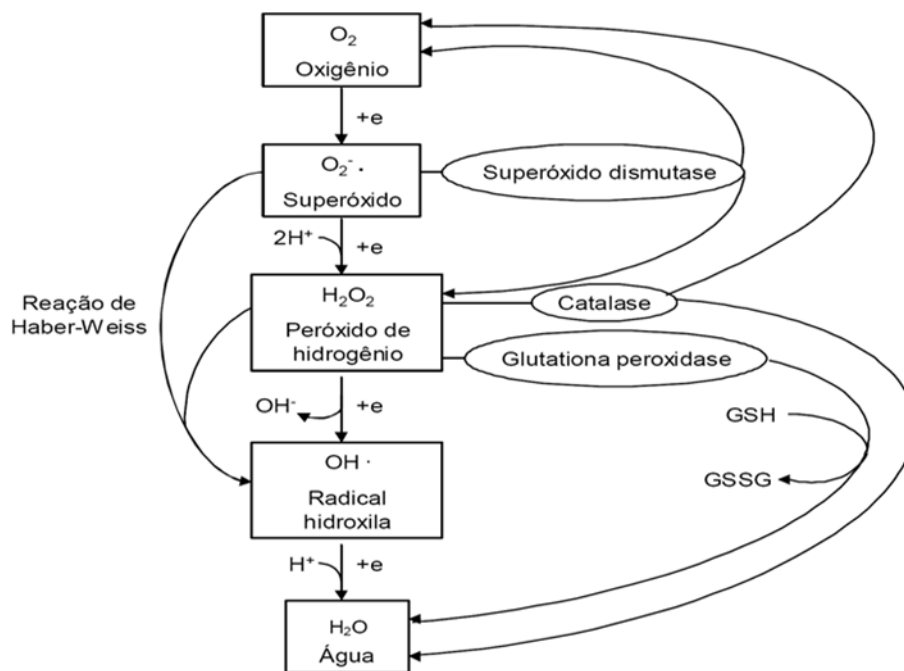
O sistema antioxidante não enzimático é formado por muitas substâncias, com destaque para a glutathione reduzida (GSH), principal composto antioxidante



intracelular, tocoferóis, ascorbato, ácido úrico e  $\beta$ -caroteno, além de proteínas de transporte de metais de transição, como a transferrina e ceruloplasmina (FERREIRA; MATSUBARA, 1997; VASCONCELOS *et al.*, 2007).

O sistema antioxidante enzimático e a glutatona estão presentes, predominantemente, no meio intracelular, daí a utilização do eritrócito para sua análise. Por outro lado, o sistema antioxidante não enzimático localiza-se, principalmente, no meio extracelular, sendo por isso analisado em soro e plasma. No sangue outros importantes antioxidantes circulam, como ácido úrico, albumina, vitaminas C, E e  $\beta$ -caroteno (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1986; FERREIRA; MATSUBARA, 1997; MANTOVANI *et al.*, 2002; VASCONCELOS *et al.*, 2007).

**Figura 7 - Sistema antioxidante enzimático**



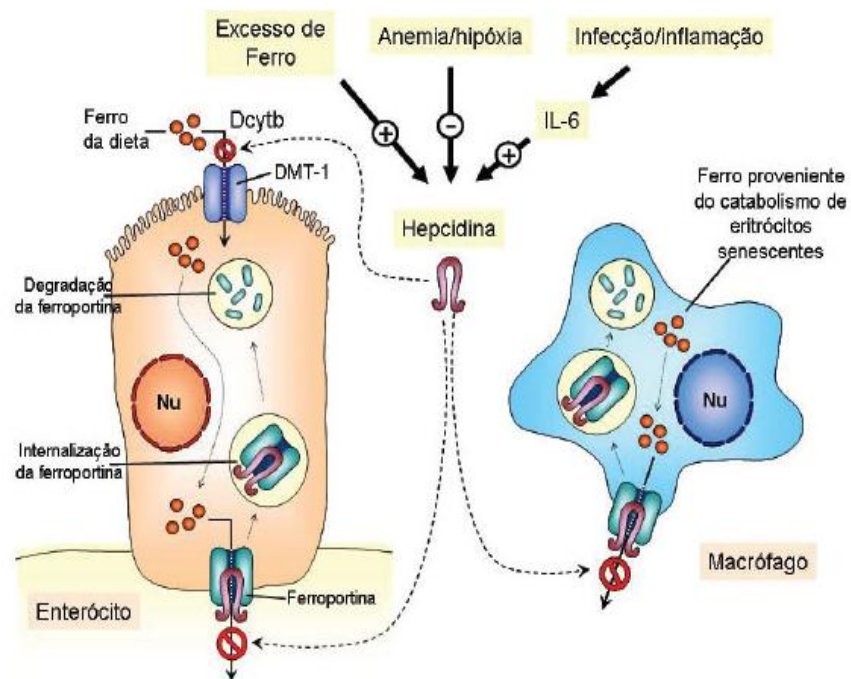
Redução tetravalente do oxigênio molecular na mitocôndria até a formação de água

Fonte: Adaptado de TELEN; KAUFMAN, (1999)

### 1.1.13 Sobrecarga de ferro

A sobrecarga de ferro é uma complicação que se desenvolve em várias doenças e pode resultar em lesões orgânicas e aumento da mortalidade. Dependendo do mecanismo envolvido na sua gênese, pode ser classificada em primária, quando resulta de um defeito primário na regulação como a hemocromatose hereditária (HH), ou condição adquirida, como a hemossiderose transfusional (HT) (OLIVIERI, 1999; MALCOVATI *et al.*, 2007; MALCOVATI; NIMER, 2008) (Figura 8).

**Figura 8** - Mecanismo de produção, transporte e armazenamento do ferro.



Fonte: Grotto, 2008

Um indivíduo com elevada necessidade transfusional chega a acumular de 8 a 16 mg de ferro ao dia. Com a progressão da sobrecarga de ferro, a capacidade de ligação da transferrina é excedida, causando acúmulo de ferro livre no plasma. A ausência de uma via fisiológica eficaz para excreção de quantidades maiores de ferro é o principal fator que contribui para a situação de sobrecarga (GROTTO, 2008; MAHESH; GINZBURG; VERMA, 2008; HARVEY, 2010).

O excesso desse metal pode se distribuir predominantemente no parênquima dos órgãos ou no sistema retículo-endotelial, o que indica mecanismos fisiopatológicos distintos de sobrecarga de ferro com implicações relevantes quanto ao prognóstico e tipo de disfunção orgânica ocasionada. Assim as lesões orgânicas por acúmulo de ferro são mais frequentes e relevantes quando o ferro é intraparenquimatoso, enquanto são menos expressivas quando o ferro encontra-se estocado no sistema retículo-endotelial dos órgãos. A sobrecarga de ferro no parênquima hepático é um evento que geralmente decorre do aumento da absorção intestinal de ferro, como observado na hemocromatose hereditária e nas anemias decorrentes da eritropoese ineficaz (ANDREWS, 1999).

No contexto de múltiplas transfusões, o acúmulo de ferro na fase inicial do processo ocorre nos macrófagos do sistema retículo-endotelial, que degradam a hemoglobina dos eritrócitos fagocitados, agrupando o ferro liberado em moléculas de hemossiderina. O ferro proveniente dos eritrócitos transfundidos, além de exceder a capacidade de saturação do plasma é redistribuído do sistema retículo-endotelial para os hepatócitos e parênquima de outros órgãos, provocando disfunção e lesão orgânica (PIPERNO, 1998).

A dependência transfusional é frequente nas síndromes mielodisplásticas, talassemia, doença falciforme, anemia aplástica e leucemias agudas. As complicações nos indivíduos poli-transfundidos e não tratados com quelantes são as disfunções cardíacas, hepáticas e endócrinas (MALCOVATI, 2007; MAHESH; GINZBURG; VERMA, 2008; SHANDER; CAPPELLINI; GOODNOUGH, 2009; HARVEY, 2010; LIST, 2010).

As principais complicações cardíacas são a hipertrofia e a dilatação do músculo cardíaco, além da degeneração das fibras do miocárdio. No fígado, o excesso de ferro causa a formação de colágeno e fibrose portal induzindo o quadro de cirrose nos casos mais graves. A disfunção endócrina pode resultar no desenvolvimento de diabetes mellitus, além de manifestações decorrentes de depósitos na hipófise anterior, na tireóide, paratireóide e nas glândulas adrenais (KUSHNER; PORTER; OLIVIERI, 2001).

### **1.1.14 Sobrecarga de ferro e estresse oxidativo em SMD**

A sobrecarga de ferro na SMD é decorrente da eritropoese ineficaz, que pode levar à liberação de substâncias como o GDF 15 (*growth differentiation factor 15*), que reduz a produção de hepcidina e aumenta significativamente a absorção intestinal de ferro e é agravada por múltiplas transfusões (YUATAKA *et al.*, 2008; YOO *et al.*, 2009, GHOTI *et al.*, 2011; SAIGO *et al.*, 2011; GATTERMANN, 2012). O excesso de ferro é tóxico e causa dano oxidativo, que vem sendo implicado na patogênese prognóstico da SMD, juntamente com citocinas inflamatórias, como o TNF $\alpha$  (SAIGO *et al.*, 2011).

Malcovati *et al.* (2005), em estudo retrospectivo, observaram que a principal causa de óbito não relacionada à leucemia em pacientes com SMD foi insuficiência cardíaca (50%), seguida de infecção (31%) e cirrose hepática (8%), o que pode ter sido consequência da sobrecarga de ferro e sua toxicidade nesses órgãos.

Saigo *et al.* (2011, 2013) observaram uma correlação positiva entre os níveis de ferritina e de espécies reativas derivadas de oxigênio em pacientes com SMD, o que sugere que a sobrecarga de ferro eleva a produção de ERO, ocasionando estresse oxidativo. Uma associação de anormalidades no cariótipo e desequilíbrio entre o sistema pró e antioxidante, como decréscimo da glutatona reduzida, também tem sido relatada (GHOTI *et al.*, 2007; KIKUCHI *et al.*, 2012).

A detecção direta das EROs por meio de testes laboratoriais é difícil, uma vez que estas se encontram em concentrações muito reduzidas e apresentam velocidade de reação extremamente rápida. Os métodos mais utilizados para avaliação do estresse oxidativo são os espectrofotométricos e cromatométricos. Também é possível aferir os subprodutos das ERO com auxílio da ressonância paramagnética de elétrons, todavia o custo limita o uso rotineiro dessa técnica (FERREIRA; MATSUBARA, 1997).

O diagnóstico e o tratamento da sobrecarga de ferro são ferramentas importantes para manejo clínico da SMD. A quantidade de ferro no organismo pode ser determinada por testes bioquímicos, exames de imagem, biopsia, RM (T2\*), SQUID. Os testes mais utilizados consistem do ferro sérico, saturação da transferrina e ferritina sérica (SHANDER; CAPPELLINI; GOODNOUGH, 2009).

### 1.1.15 Hemocromatose hereditária/ gene HFE

A HH é uma desordem autossômica recessiva, caracterizada por sobrecarga de ferro sistêmica devido à absorção inadequada e acúmulo progressivo, trazendo como consequências, danos estruturais e funcionais ao coração, fígado e pâncreas. Pode ser decorrente de defeito genético primário no processo de homeostase do ferro, que pode comprometer o gene HFE, Hemojuvelina (HJV), Hecpidina (HAMP), o gene do Receptor de Transferrina 2 (TFR2) e o gene da Ferroportina (SLC40A1) (SANTOS *et al.*, 2008).

O gene HFE possui aproximadamente 10 Kb, está localizado no cromossomo 6 (6p21,3) e está associado com a molécula HLA-A do complexo principal de histocompatibilidade de classe 1 (FEDER *et al.*, 1996; RHODES; TROWSDALE, 1999;). Várias mutações foram descritas. No entanto, as três mais pesquisadas são: C282Y, H63D e S65C (OLIVEIRA *et al.*, 2006).

A proteína HFE é expressa nos enterócitos e hepatócitos e sua função fisiológica está associada ao controle de ferro no organismo, embora não esteja completamente elucidada. Duas hipóteses foram sugeridas: 1- a proteína normal produzida pelo gene HFE, quando associada à  $\beta$ 2-microglobulina, se liga com receptor de transferrina 1 (TFR1) na membrana basolateral dos enterócitos, reduzindo a afinidade desse receptor à transferrina, regulando os níveis de ferro no organismo pela diminuição da afinidade do receptor transferrina pelo ferro (FEDER *et al.*, 1998). 2- a proteína HFE regula a expressão da hepcidina (NICOLAS *et al.*, 2003).

Têm sido descritas, com maior frequência, duas mutações no gene *HFE*: 1- uma transição G - A na posição 845 do gene, que resulta na troca do aminoácido 282 da cadeia polipeptídica (845 G - A; C282Y), que determina a substituição de uma cisteína (C) por uma tirosina (Y), incapacitando a interação entre o HFE, transferrina e  $\beta$ 2-microglobulina (CIMBUROVÁ *et al.*, 2005), diminuindo a densidade da proteína HFE na membrana celular e, dessa forma, impossibilitando a célula de controlar a entrada de ferro no seu interior, o que resulta em maior absorção do metal no organismo (WAHEED *et al.*, 1997). 2- uma transição na C - G na posição 187 do gene, resultando em uma substituição de histinina por ácido aspártico (187 C - G; H63D) (ANDERSON; POWEL, 2002). A mutação H63D não impede a associação da proteína com a  $\beta$ 2- microglobulina e nem sua expressão na superfície

celular, entretanto, esta dificulta a interação do receptor transferrina com o ferro, sendo associada à forma leve de HH (FEDER *et al.*, 1996).

A presença da mutação indica a existência de alteração genética e maior predisposição ao desenvolvimento do fenótipo da doença, mas não é suficiente para o diagnóstico da HH, fato que reforça a hipótese de penetrância incompleta desse gene e expressão fenotípica da doença baixa, tornando difícil prever quem desenvolverá ou não a clínica (BEUTLER; HOFFBRAND; COOK, 2003).

A mutação no gene *HFE* é influenciada por variáveis étnicas (MARTINELLI *et al.*, 2005) e os indivíduos apresentam fenótipo diverso, sendo observado sobrecarga de ferro somente em alguns homozigotos (BITTENCOURT *et al.*, 2002; BONINI-DOMINGOS, 2007). Estima-se que em torno de 85% dos casos de HH estão associados à mutação C282Y em homozigose, enquanto que menos de 6% são heterozigotos para C282Y e H63D (FEDER *et al.*, 1996; BACON, 2001; BEUTLER; HOFFBRAND; COOK, 2003; BEUTLER, 2006; FERREIRA *et al.*, 2008). Na presença dos demais genótipos os indivíduos são considerados portadores de HH, desde que seja constatada a presença de sobrecarga de ferro.

A HH apresenta longo período de latência e está dividida em 3 fases: de 0 a 20 anos de idade, em que não há acumulação detectável de ferro; entre 20 e 40 anos, em que há uma sobrecarga de ferro, no entanto, sem dano fisiológico, e acima de 40 anos, quando há uma sobrecarga de ferro e danos aos órgãos, inicialmente com fibrose e/ou cirrose hepática (FEDER *et al.*, 1996, 1998).

As manifestações clínicas geralmente ocorrem entre 40 e 60 anos de idade, predominantemente no sexo masculino (2-3 vezes mais comum do que em mulheres). Nas mulheres, devido à perda de sangue menstrual e gestação que funciona como controle fisiológico, os depósitos de ferro no corpo apresentam-se diminuídos (MARTINELLE *et al.*, 2005; SCOLET *et al.*, 2005; FERREIRA *et al.*, 2008).

É consenso que a mutação do gene *HFE* é mais frequente em populações originárias do norte da Europa, afetando aproximadamente 1 em cada 300 indivíduos caucasóides (PIETRANGELO, 2006), no entanto, há discrepâncias entre as populações mundiais. Desde 1996 vários estudos têm sido realizados para avaliar as frequências das mutações C282Y e H63D em diferentes populações e fornecer informações sobre sua distribuição (FEDER *et al.*, 1996). O genótipo homozigoto mutado C282Y, responsável pela forma clássica da doença, ocorre de

1,3% a 9,9% em populações europeias e é extremamente raro (inferior a 1%) em populações não-caucasianas na África, Ásia e América Central (SASSI *et al.*, 2004). Na população brasileira estima-se que a frequência alélica da mutação C282Y varia de 0,5 a 1,4%, de acordo com o grupo étnico, sendo muito baixa em negros e índios (AGOSTINHO *et al.*, 1999; FERREIRA *et al.*, 2008).

A frequência do alelo H63D varia de 11% a 14% em populações do norte da Europa, 12% a 20% em populações do sul da Europa, 0% a 1,9% em populações africanas e 0% a 2,8% em populações asiáticas (SASSI *et al.*, 2004).

A prevalência das duas mutações em pacientes brasileiros ainda é pouco conhecida (BITTENCOURT *et al.*, 2002). Agostinho *et al.* (1999) pesquisando as frequências do C282Y e H63D no sudeste, nordeste e norte do Brasil, encontraram uma frequência alélica para as mutações C282Y e H63D de 1,4% e 16,3% em caucasianos, 1,1% e 7,5% em afro-descendentes e 1,1% e 9,8% em mestiços e 0% em ameríngios nativos da Amazônia, respectivamente.

Indivíduos com a mutação H63D (H63D/H63D) em homozigose e aqueles que são heterozigotos compostos (C282Y/H63D) têm uma baixa taxa de expressão fenotípica e são responsáveis por cerca de 5% e 15% dos casos de HH, respectivamente. O genótipo C282Y/H63D (heterozigoto composto) ocorre em 2% dos brancos não-hispânicos, 0,33% dos hispânicos, 0,071% dos negros e em 0,0055% dos asiáticos (ADAMS *et al.*, 2005). Uma minoria que apresenta heterozigose para C282Y e H63D (1 a 2% em média) desenvolve sintomas clínicos da HH (PIETRANGELO, 2004).

A mutação S65C consiste na troca de serina por cisteína na posição 65 da proteína HFE. Embora pareça não representar risco maior para o desenvolvimento de sobrecarga de ferro, mesmo em homozigose, a frequência relatada do alelo 65C é de 0,6% e 1,0% em doadores de sangue brasileiros (SANTOS *et al.*, 2008). Para a mutação S65C a frequência apresentada foi de 1,3% (MARTINELLI *et al.*, 2005; CANÇADO *et al.*, 2006).

O diagnóstico é dependente de expressão fenotípica, mas isso pode ser modificado por fatores não-genéticos, como idade, composição da dieta, doação de sangue, menstruação, gravidez, perda patológica de sangue e coexistência de outras doenças que afetam o metabolismo do ferro.

No Brasil, relatos sobre a frequência da mutação do gene HFE em pacientes portadores de SMD e sua possível relação com as manifestações clínicas e sobrecarga de ferro são raros.

Investigação do perfil da expressão dos genótipos C282Y, H63D e S65C em indivíduos com valores persistentemente elevados de ferritina, saturação da transferrina e aumento do ferro tecidual está indicada (PIETRANGELO, 2004, 2006). É razoável supor que pacientes com mutação no gene HFE sejam mais vulneráveis à SF transfusional.

#### **1.1.16 TNF $\alpha$ e estresse oxidativo**

O fator de necrose tumoral alfa (TNF $\alpha$ ) é uma citocina pró-inflamatória multifuncional e um potente inibidor da hematopoese. Juntamente com outras citocinas estão envolvidos na patogênese da leucemia mielóide aguda e da SMD, embora seu impacto no prognóstico ainda seja controverso. Uma regulação aberrante e níveis elevados são observados na SMD, sinalizando para o envolvimento do microambiente na fisiopatologia e progressão da doença. Contribui para o quadro de apoptose excessiva que resulta no aumento da hematopoese ineficaz observado, em especial, nos pacientes de mais baixo risco e nas citopenias periféricas (SHETTY *et al.*, 2000).

O aumento da angiogênese, fator importante e necessário para a progressão da doença é, também, induzido pelos níveis elevados dessa citocina. O TNF $\alpha$  ativa ainda o fator nuclear kappa B (NF- $\kappa$ B), contribuindo para vantagem proliferativa e progressão da doença. Além de indutor de apoptose, o TNF $\alpha$  estimula a geração de moléculas genotóxicas, NO e EROs, que podem causar danos no DNA e resultar em novas mutações (HUSSAIN; HOFSETH; HARRIS, 2003).

É possível que níveis aumentados de TNF $\alpha$  contribuam, junto à SF, para a geração de espécies reativas derivadas de oxigênio, potencializando o ambiente de toxicidade medular resultante do estresse oxidativo.

Tendo em vista que estudos que investiguem a sobrecarga de ferro decorrente da dependência transfusional, estresse oxidativo, mutação do gene HFE, e o perfil do TNF $\alpha$  em pacientes com SMD são escassos, pesquisas que avaliem e correlacionem esses parâmetros podem contribuir para o entendimento dessa patologia, assim como gerar novos alvos terapêuticos e parâmetros prognósticos



para essa doença clonal primária da medula óssea mais comum do mundo ocidental em indivíduos com idade superior a 60 anos.

# OBJETIVOS

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Geral

Avaliar a relação entre o *status* do ferro e os parâmetros do dano oxidativo, frequência das mutações do gene HFE (c.282C>Y, c.63H>D e c.65S>C) e fator de necrose tumoral (TNF- $\alpha$ ) em portadores de SMD com e sem sobrecarga de ferro transfusional, acompanhados no Serviço de Hematologia do Hospital Universitário Walter Cantídio da Universidade Federal do Ceará (HUWC-UFC).

### 2.2 Específicos

- Avaliar as características demográficas, de apresentação ao diagnóstico e de prognóstico de pacientes portadores de SMD;
- Analisar os níveis de ferritina, ferro sérico, capacidade total de ligação do ferro e índice de saturação da transferrina para diagnóstico da sobrecarga de ferro;
- Mensurar o perfil bioquímico através da dosagem de alanina aminotransferase (AST), aspartato aminotransferase (ALT), creatinina, uréia, ácido úrico e lactato desidrogenase (LDH);
- Determinar a peroxidação lipídica por meio da avaliação dos níveis de malonaldeído (MDA) e de nitrito (NO<sup>2-</sup>);
- Verificar a atividade das enzimas antioxidantes: superóxido dismutase (SOD); catalase (CAT) e glutathiona peroxidase (GPx);
- Identificar a frequência do polimorfismo C282Y, H63D e S65C do gene HFE e associar com sobrecarga do ferro e dano oxidativo;
- Dosar fator de necrose tumoral (TNF $\alpha$ ) e correlacionar com sobrecarga de ferro;
- Correlacionar a sobrecarga de ferro com os achados do dano oxidativo (MDA e NO<sup>2-</sup>); atividade antioxidante (CAT, GPx, SOD) e com o fator de necrose tumoral (TNF- $\alpha$ ).

# CASUÍSTICA E MÉTODOS

### 3 CASUÍSTICA E MÉTODOS

#### 3.1 Casuística e aspectos éticos

##### 3.1.1 Desenho do estudo

O estudo é transversal, prospectivo, analítico, observacional, experimental e de campo com o propósito de investigar laboratorialmente portadores de SMD acompanhados no serviço de Hematologia do Hospital Universitário Walter Cantídio – UFC, no período de maio de 2010 a setembro de 2011. Para pacientes com suspeita de SMD, na ausência de excesso de blastos, um protocolo de exclusão de causas não clonais de mielodisplasia é rotineiramente utilizado no Serviço durante a investigação inicial (**Quadro 1**).

**Quadro 1** - Protocolo de exclusão de causas não clonais que cursam com citopenias e/ou dispoeses.

Deficiências nutricionais: vitamina B12 e ácido fólico
Exposição recente a agentes tóxicos: metais pesados, benzeno e derivados do petróleo.
Etilismo.
Exposição recente a drogas citotóxicas e fatores de crescimento.
Disfunções endócrinas.
Disfunções metabólicas: doença hepática crônica e insuficiência renal
Doenças inflamatórias crônicas.
Doenças auto imunes.
Infecções: síndrome da imunodeficiência adquirida, hepatites, citomegalovírus, toxoplasmose, calazar

**Fonte:** adaptado de MAGALHÃES; LORAND-METZE, 2004.

##### 3.1.2 Critérios de inclusão dos casos

Durante o período do estudo, pacientes adultos, de ambos os sexos, com idade igual ou superior a dezoito anos, acompanhados com diagnóstico laboratorial confirmado de SMD, segundo os critérios da OMS foram estudados. Todos os

pacientes foram informados sobre os objetivos e metodologias da pesquisa e convidados a participar do estudo de acordo com o termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE – APÊNDICE A). Os pacientes foram estratificados de acordo com os critérios abaixo:

**Sobrecarga de ferro (SF)**: duas dosagens sequenciais de ferritina  $\geq 1000$ ng/mL.

**Anemia**: valores de Hb  $\leq 10$ g/dL, independente do sexo;

**Anemia dependente de transfusão**: para o sexo masculino, Hb  $< 9$ g/dL, e para o sexo feminino, Hb  $< 8$ g/dL (MALCOVATI *et al.*, 2011)

**IPSS**: favorável (baixo risco e intermediário I) e desfavorável (intermediário II e alto risco) (GREENBERG *et al.*, 1997);

### **3.1.3 Critérios de exclusão e descontinuidade para os casos**

Foram excluídos do estudo, 23 indivíduos por diversas causas detectadas através de questionário, entre elas: uso de hemocomponentes em um período  $\leq 8$  dias, pacientes com clínica ou diagnóstico de infecção, etilistas, tabagistas, portadores de insuficiência renal crônica, hepatopatias, doenças autoimunes e aqueles que se recusaram a participar do estudo. Foi utilizada como critério de descontinuidade a perda de seguimento.

### **3.1.4 Critérios de inclusão e exclusão para os controles**

Para compor o grupo controle, 98 idosos, provenientes de clínicas de repouso (Casa de Nazaré e Lar São Francisco), sem infecção aparente no momento da coleta, não etilistas, não fumantes e que concordaram em participar da pesquisa de acordo com o termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE - APÊNDICE B) tiveram seus dados pessoais e amostras coletadas. Desses, 87 idosos constituíram o grupo controle, com exames hematológicos e bioquímicos dentro dos valores de referência normais. Após análise dos exames, 11 idosos foram excluídos do estudo

por apresentarem anemia ou achados laboratoriais sugestivos de processo infeccioso.

Os casos e controles foram assim distribuídos:

**GRUPO 1:** controles

**GRUPO 2:** portadores de SMD sem SF

**GRUPO 3:** portadores de SMD com SF

### ***3.1.5 Aspectos éticos e legais***

Os aspectos éticos e legais da presente pesquisa seguiram a Resolução 1996/96 e 466/2012 do Conselho Nacional de Saúde/Ministério da Saúde, sendo aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa do HUWC/UFC, com registro 000150/2009.

Todos os experimentos realizados seguiram as normas de biossegurança de acordo com a Lei nº 11.105 de março de 2005, regulamentada pelo decreto nº 5.591 de 22 de novembro. O descarte do material biológico foi realizado segundo a resolução da diretoria colegiada – RDC 306 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária, de 7 de dezembro de 2004.

### **3.2 Dados clínicos e coleta de amostras biológicas**

Os dados clínicos e sóciodemográficos foram obtidos através da análise dos prontuários (APÊNDICE C). Todos os participantes receberam um código para garantir o sigilo de sua identidade.

Para extração do DNA, dosagens hematológicas e das enzimas antioxidantes (SOD, CAT e GPx) foram colhidos 5mL de sangue venoso com anticoagulante EDTA (ácido etilenodiamino tetraacético) e para dosagem do malonaldeído (MDA) e nitrito foram coletados 5 mL de sangue com anticoagulante heparina. Para avaliação da sobrecarga de ferro, dos parâmetros bioquímicos e dosagem do TNF- $\alpha$  utilizaram-se 5 mL de sangue coletado em tubo com gel separador.

### **3.3 Preparação de amostras e testes realizados**

O sangue coletado com anticoagulante heparina e gel separador foi centrifugado a 3.500 rpm por 15 minutos para obtenção do plasma e soro, respectivamente. Alíquotas do sobrenadante, com volumes iguais foram armazenadas em tubos previamente identificados. Todas as amostras foram mantidas em freezer a -80°C até a análise.

Para extração do DNA genômico do sangue periférico, primeiramente realizou-se a análise hematológica da amostra colhida com EDTA. Logo em seguida, retirou-se uma alíquota de 300µL do sangue total para extração do DNA e posterior análise das mutações do gene HFE, a partir dos leucócitos periféricos (protocolo BIOPUR). Após essa etapa, o restante do sangue colhido com EDTA foi centrifugado a 3.500 rpm por 10 minutos, seguido de remoção completa do plasma. O concentrado de hemácias passou por três lavagens sucessivas com solução salina (NaCl 0,9%), seguidas de centrifugações a 3.500 rpm por 10 minutos. Posteriormente, efetuou-se a lise desse concentrado de eritrócitos pela adição de volumes iguais de água destilada (água de injeção 1:1), homogeneizando-se por agitação. Para conservação das alíquotas utilizaram-se 10 µL do inibidor irreversível de proteases serinas (tripsina, quimiotripsina, cisteína e trombina), fluoreto fenilmetilsulfonil (PMSF- BIOSYSTEMS/AMRESCO®). Essas amostras foram armazenadas em freezer - 80°C até a análise.

#### **3.3.1 Determinação do perfil hematológico**

O hemograma foi realizado utilizando-se método automatizado, no aparelho Cell Dyn Ruby® (Abbott® Laboratory), calibrado regularmente com controle interno e externo. A análise da morfologia foi realizada em extensão sanguínea, corada por método Panótico Rápido LB/ Laborclin, que se baseia no princípio de coloração estabelecida por Romanowsky, atuando em 15 segundos.



### **3.3.2 Determinação da sobrecarga do ferro, avaliação bioquímica e do fator de necrose tumoral $\alpha$ (TNF $\alpha$ )**

Para diagnóstico da SF foram utilizados o ferro sérico, capacidade total de ligação do ferro (CTLF), índice de saturação da transferrina (IST) e a ferritina sérica. Esses parâmetros foram avaliados por ensaio colorimétrico em automação Olympus AU 400e e foram considerados os seguintes valores de referência: ferro sérico: 50 - 212  $\mu\text{g/dL}$ , CTLF: 200 - 412  $\text{mg/dL}$ . O índice de saturação da transferrina (IST) foi determinado através da equação:  $\text{ferro sérico/CTLF} \times 100$  e considerou-se como referência 20-45% (CANÇADO *et al.*, 2007).

A ferritina foi mensurada pelo método de enzimaímunoenensaio de micropartículas, de acordo com o fabricante Abbott®/Laboratory. Foram considerados como valores normais para o sexo feminino: 6,9 a 233  $\text{ng/mL}$  e 18,7 a 323  $\text{ng/mL}$  para o sexo masculino.

Os parâmetros alanina aminotransferase (referência: 7-52U/L) e aspartato aminotransferase (referência: 13-39 U/L), uréia (referência: 15-55  $\text{mg/dL}$ ), creatinina (referência: 0,6-1,3  $\text{mg/dL}$ ), ácido úrico (referência: 2,5-7,0  $\text{mg/dL}$ ) e lactato desidrogenase (LDH, referência: 220 a 450  $\text{mg/dL}$ ) foram avaliados por ensaio enzimático, metodologia Olympus AU 400e.

A concentração sérica do Fator de Necrose Tumoral  $\alpha$  (TNF  $\alpha$ ) foi mensurada por enzimaímunoenensaio de acordo com as instruções do fabricante (Human TNF alpha ELISA Ready-SET-Go® (Ref: 88-7346 -22 / eBIOSCIENSE An Affymetrix Company). A curva de calibração foi realizada após diluições de padrões (4-500  $\text{pg/mL}$ ).

### **3.3.3 Determinação das espécies reativas**

A detecção direta das EROs por meio de testes laboratoriais é difícil, uma vez que apresentam velocidade de reação extremamente rápida e encontram-se em concentrações reduzidas (FLOYD, 1990). Aferir os subprodutos das EROs é possível com o auxílio de ressonância paramagnética de elétrons; todavia, o custo e outras limitações dificultam o uso rotineiro dessa técnica. Desse modo, os métodos mais utilizados na avaliação laboratorial do estresse oxidativo são os espectrofotométricos e cromatométricos, que determinam a concentração de MDA e

nitrito (avaliação da peroxidação lipídica de membranas) e a atividade das enzimas SOD, CAT e GPx (defesas antioxidantes).

## **Peroxidação lipídica**

### **Determinação do nitrito**

A concentração de nitrito foi determinada segundo o método de Green *et al.* (1981), que se baseia em revelar a presença de nitrito na amostra por uma reação de diazotização que forma um cromóforo de cor rósea, com pico de absorvância de 560 nm, após 10 minutos de incubação. Para esta experiência, 100 µL do plasma foram adicionados a 100 µL do reativo de Griess (sulfanilamida a 1%/ cloridrato de N-(1-naftil)-etilenediamina 0,1% / H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> em 1% de água destilada) e incubados à temperatura ambiente por 10 min. A curva padrão foi elaborada com várias concentrações de NaNO<sub>2</sub> (variando de 0,75 a 100 µM), sob as mesmas condições (DRAPER; HADLEY, 1990).

### **Determinação do MDA**

O método empregado baseou-se na reação com ácido tiobarbitúrico (TBARS) que consiste na medida de um cromógeno róseo formado pela reação do MDA com duas moléculas de TBARS, em meio ácido e em alta temperatura (80-100°C), formando o complexo MDA:TBARS (1:2), C<sub>11</sub>H<sub>8</sub>N<sub>4</sub>S<sub>2</sub>O<sub>4</sub>H<sub>2</sub>O (PM=342,35), que tem absorção máxima no espectro visível de 532nm (JANERO, 1990; BENZIE, 1996).

Em tubos de ensaio, 125µL do plasma foram incubados em banho-maria a 37 °C por 1 hora. Logo em seguida, adicionaram-se 200 µL de ácido perclórico a 35% para precipitar as proteínas. A mistura foi centrifugada a 1400 g por 20 minutos. Em tubos de ensaio de vidro adicionaram-se 300 µL do sobrenadante, 100 µL da solução de tiobarbiturato de sódio a 0,6%, agitando-se vigorosamente. Essa mistura foi levada ao banho-maria a 95°C por 30 minutos e posteriormente centrifugada a 1400 g por 10 minutos. Logo após 100 µL do sobrenadante foram adicionados aos poços da placa de ELISA para leitura em absorvância de 530 nm (DRAPER; HADLEY, 1990).

Para se calcular a concentração de TBARS, usou-se uma curva padrão com concentrações conhecidas (0,005; 0,098; 0,195; 0,390; 0,780; 1,560; 3,125; 6,250; 12,500; 25,000; 50,000). O valor de referência utilizado foi de 1-3  $\mu\text{M}$  (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007).

## **Antioxidantes**

### **Determinação da superóxido dismutase (SOD)**

A medida da atividade da SOD nos eritrócitos foi determinada utilizando o protocolo do Kit Ransod (RANDOX®, Antrim, Inglaterra) que se baseia em adicionar xantina e xantina oxidase (XOD) na amostra estudada, como fonte de  $\text{O}_2$  para gerar radicais superóxido, os quais reagem com substrato adicionado, o clorido de 2-(4-iodofenil)-3-(4 nitrofenol)-5-feniltetrazolio (I.N.T) para formar um composto vermelho de formazan. O  $\text{O}_2$  transfere um elétron ao I.N.T e produz formazina.

Princípio da reação: Xantina  $\xrightarrow{\text{XOD}}$  ácido úrico +  $\text{O}_2$

I.N.T  $\xrightarrow{\text{O}_2}$  corante formazan ou  $\text{O}_2 \cdot + \text{O}_2 \cdot + 2\text{H}^+ \xrightarrow{\text{SOD}}$   $\text{O}_2 + \text{H}_2\text{O}_2$

A atividade da SOD presente na amostra corresponde à intensidade de inibição da reação descrita acima, detectada a 37°C, por espectrofotometria a 505nm, a partir da alteração da absorbância antes e ao final da reação. A absorbância inicial foi obtida após 30 segundos do branco, do padrão e das amostras, sendo o cronômetro acionado e realizada a leitura da absorbância final após 3 minutos.

Fórmula:  $\Delta A/\text{min}$  de padrão ou amostra =  $A_2 - A_1/3$

Os resultados foram inseridos em uma curva e a percentagem de inibição para cada amostra contra o log10 foi obtida (SOD/ml). Para conversão desses resultados em unidades SOD/gHb, utilizou-se a seguinte fórmula:

$$\text{SOD unid/gHemoglobina} = \frac{\text{SOD unid./mL}}{\text{gHb/mL}}$$

Dessa maneira, os valores de SOD foram também corrigidos para o valor da hemoglobina e expressos em unidades por grama de hemoglobina (VR: 1102-1601 U/gHb).

### **Determinação da catalase (CAT)**

Os ensaios para dosagem da atividade da enzima catalase (CAT) nas hemácias foram conduzidos por método espectrofotométrico em que se monitorou a

decomposição do  $\text{H}_2\text{O}_2$  e geração do oxigênio em absorbância de 240nm (TAKAHASHI, 2008), segundo reação:



A técnica foi executada como descrita abaixo:

**Passo 1-** Em 90 mL da solução  $\text{H}_2\text{O}_2$  10Mm, preparado no dia da análise, adicionaram-se 5mL de tampão TRIS/HCl-EDTA 1M (6,055g TRIS em 50mL de HCl 1M e 0,07305g de EDTA e 50mL de água destilada) a 4 mL de água mili-Q (SOLUÇÃO 1). O tampão foi ajustado para pH 8,0.

**Passo 2-** Do hemolisado previamente guardado, descongelaram-se 10  $\mu\text{L}$  e diluíram-se em 990  $\mu\text{L}$  do tampão TRIS/HCl-EDTA preparado previamente (SOLUÇÃO 2).

**Passo 3-** Em 990  $\mu\text{L}$  da solução 1 foram adicionados 10  $\mu\text{L}$  do hemolisado diluído (solução 2).

**Passo 4-** As dosagens das absorbâncias foram realizadas a cada minuto, por dois minutos.

Os valores obtidos em delta/min foram corrigidos por um fator de correção do decaimento da atividade da catalase por diluição do hemolisado, divididos pela absorvidade molar de  $\text{H}_2\text{O}_2$  ( $\epsilon$  0,0394Lmmol<sup>-1</sup> 1mm<sup>-1</sup>) (AEBI, 1984). Para o cálculo da catalase por unidade de grama de hemoglobina (U/gHb) foi utilizada a média das absorbâncias, o volume da amostra (10 $\mu\text{L}$ ), o coeficiente de extinção do peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$  – 0.071) e a concentração da hemoglobina. Uma unidade de catalase corresponde à atividade de enzima necessária para o consumo de 1  $\mu\text{mol}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$  em 1 minuto. Os valores de catalase foram expressos em U/gHb (VR: 16500 – 26500 U/gHb) (ARMSTRONG, 1998; VASCONCELOS *et al.*, 2007).

### **Glutationa peroxidase (GPx)**

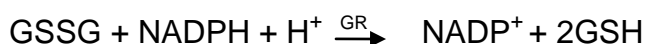
A atividade da glutathione peroxidase (GPx) nos eritrócitos foi determinada de acordo com Paglia e Valentine (1967) observando o decaimento do NADPH durante a oxidação de NADPH a  $\text{NADP}^+$  (nicotinamida adenina dinucleotídeo) a 340nm (TAKAHASHI, 2008).

Utilizou-se o kit Ransel Glutathione Peroxidase (RANDOX®, Antrim, Inglaterra) que usa o método UV, de determinação indireta, em que a glutathione peroxidase (GPx) catalisa a oxidação da glutathione (GSH) pelo hidropéroxido de cumeno. Na presença da glutathione reductase (GR) e NADPH (nicotinamida adenina

dinucleotídeo fosfato) a glutatona oxidase (GSSG) é imediatamente convertida na forma reduzida com uma oxidação concomitante da NADPH a NADP+. A diminuição na absorbância é determinada a 340nm.

Portanto, a análise de GPx foi realizada usando-se GSH, GR, NADPH e um peróxido para dar início à reação, sendo monitorada, observando-se quando o NADPH foi convertido a NADP. Os resultados foram expressos em U/gHb (VR: 27,5 – 73,6 U/gHb e 4171 – 10881U/L).

**Princípio da Reação:**



**Legenda:** GPX: glutatona peroxidase; GSH: glutatona; ROOH: hidroperóxido de cumeno; ROH: hidróxido de cumeno; GSSG: glutatona oxidada; GR: glutatona redutase.

### **3.3.4 Análise da citogenética clássica**

A citogenética clássica por banda G foi realizada no Laboratório de Citogenômica do Cancer (Universidade Federal do Ceará - UFC), segundo descrito por Chauffaille *et al.* (1996). A medula óssea, colhida em heparina foi dividida em dois frascos contendo 7 mL do meio RPMI (pH 7,0) e 3 mL de soro bovino fetal. Este material foi cultivado por 24 horas em estufa a 37°C. Uma hora antes do término da cultura foram adicionados 50 µL de colchicina (Colcemid®), por 30 minutos. Em seguida, o material foi centrifugado e ressuspensão em solução hipotônica de KCl 0,075 M e lavado com solução fixadora (solução de ácido acético e metanol, proporção 3:1), por 4 vezes. Para análise, as lâminas foram confeccionadas através de gotejamento do material e aquecimento por 3 minutos em microondas em potência alta. O bandamento foi realizado pela técnica de tripsina-Giemsa (GTG) e corado com kit panótico. Foram analisadas pelo menos 20 mitoses e os cromossomos foram classificados de acordo com o Sistema Internacional de Nomenclatura Citogenética Humana (ISCN) (SHAFFER; TOMMERUP, 2005). As metáfases foram capturadas e analisadas em sistema computadorizado (CHROMU) com software para cariotipagem. O procedimento encontra-se descrito no Anexo B.

### 3.3.5 Análise molecular

#### Extração

O isolamento do DNA dos leucócitos foi realizado de duas maneiras:

**Em controles:** o DNA dos leucócitos foi isolado a partir do sangue venoso total (Biometrix Diagnóstica/Biopur), através do método de *extração de DNA em coluna Biopur®* de acordo com o protocolo do fabricante.

**Em pacientes:** o DNA de células da medula óssea foi isolado com fenol/clorofórmio, seguido de precipitação com etanol. Para cada  $10^6$  células armazenadas em 1mL de trizol reagente® (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) foram adicionados 200µL de clorofórmio para desproteinização e posterior centrifugação a 11.000 rpm por 15' a 2°C. O RNA presente na fase aquosa foi transferido para um microtubo estéril de 1,5mL. Logo após, o DNA foi precipitado com 300µL de etanol absoluto/trizol reagente® (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) e misturado por inversão por 3 minutos. Posteriormente, as amostras foram incubadas por 3 minutos à temperatura ambiente e sedimentadas por centrifugação por 2000 rpm por 5 minutos a 4°C. Após a remoção do sobrenadante (proteínas), o pellet de DNA foi lavado com 1mL de solução 0,1 M de citrato de sódio em etanol 10%. Logo após o pellet de DNA foi incubado com a solução de lavagem por 30 minutos em temperatura ambiente, com inversão periódica e posterior centrifugação em 2000 rpm, por 5 minutos a 4°C. Após a lavagem, o pellet de DNA foi ressuspendido em 2mL de etanol 75%, armazenado em repouso por 15 minutos em temperatura ambiente e centrifugado em 2000 rpm por 5 minutos a 4°C. O pellet de DNA ficou em tubo aberto por 15 minutos para secar. Em seguida, ressuspendeu-se em 350µL de NaOH (8mM – pH: 8,4), sendo armazenado a -20°C para os experimentos de genotipagem.

Foram realizadas leituras espectrofotométricas para aferição de pureza, concentração e contaminação das amostras nos comprimentos de ondas de 220, 260 e 280nm. A integridade da amostra foi aferida por eletroforese em gel de agarose a 1% corado com gelred (10u/µL) e visualizado em transluminador (Mastercycler - pro vapo protect technology (Eppendorf, Hamburg, Germany).

O DNA extraído do pool celular e considerado adequado foi caracterizado quanto ao polimorfismo do gene HFE (C282Y, H63D e S65C), por meio de amplificação enzimática seguida de restrição do fragmento amplificado com

endonucleases de restrição (PCR-RFLP) utilizando oligonucleótidos específicos (FEDER *et al.*, 1996; CANÇADO *et al.*, 2006; VIANA-BARACIOLI *et al.*, 2011).

**Amplificação:** O processo ocorreu em três etapas, determinadas por oscilações de temperatura: **Desnaturação:** separação da dupla fita do DNA a ser amplificada, com a temperatura ótima entre 90 e 95°C. **Anelamento:** ligação do “primer” à sua região complementar à temperatura entre 45 e 60°C. **Extensão:** adição dos nucleotídeos complementares à fita molde pela polimerase, a partir dos fragmentos iniciadores como descrito por Feder *et al.* (1996) e Cançado *et al.* (2006).

As reações de PCR foram efetuadas utilizando os *primers sense* R63 (5' ATC CCC AGC CTT GTT AAC TG 3') e o *anti-sense* L63 (5' ACA TGG TTA AGG CCT GTT GC 3') para a mutação H63D, os *primers sense* R282 (5' CTC AGG CAC TCC TCT CAA CC 3') e o *anti-sense* L282 (5'GGG TAT TTC CTT CCT CCA ACC 3') para a mutação C282Y e os *primers sense* R63 (5' ATC CCC AGC CTT GTT AAC TG 3') e o *anti-sense* L63 (5' ACA TGG TTA AGG CCT GTT GC 3') para a mutação S65C. O mix de amplificação continha 18 µM de *primers*, 1,25 mM de cada desoxinucleotídeo, 10 ng de DNA genômico (Promega, Madison-USA), 2,0 mM MgCl<sub>2</sub>, 2,5 µL de tampão (1x) e 1U de Taq Polimerase em um volume final de 25 µL. A reação foi submetida a 94°C por 5 minutos para desnaturação inicial, seguida de 30 ciclos a 94°C por 30 segundos, 60°C por 30 segundos, 72°C por 1 minuto e uma extensão final de 72°C por 10 minutos. A análise dos produtos amplificados foi realizada em gel de agarose a 2,0% (p/v) em tampão TEB (1X) e corrida eletroforética a 80V por 2 horas. Nos géis foram aplicados 10µL de cada amostra misturados com 5 µL de azul de bromofenol juntamente com dois marcadores de massa molecular. As imagens resultantes foram visualizadas e fotografadas sob luz UV, com gelred, sendo a interpretação dos resultados efetuada por análise do tamanho dos fragmentos de restrição comparando com dois marcadores de massa molecular diferentes.

### **Restrição (RFLP)**

Após a amplificação, os produtos foram submetidos à digestão enzimática com as enzimas **Rsal** (10000U/mL) para a mutação C282Y, **BclI** (15000U/mL), para a mutação H63D e **HinfI** (1FDU/µL) para a mutação S65C. Para cada enzima de restrição utilizou-se tampão correspondente fornecido pelo fabricante (Biolabs/New

England). As condições de digestão para as enzimas foram as seguintes: 12µL de água ultra pura autoclavada, 2,1µL de tampão (33mM tris-acetato pH 7,9, 10mM de acetato de magnésio, 66mM de acetato de potássio e 0,1mg/ml BSA), 0,7µL (15-10 U/µL) de enzima e 5µL do produto de amplificação por 07 horas ou *overnight*. A temperatura de digestão para *Rsal* foi de 37°C, para *BclI* e *Hinfl* foi de 50°C.

O produto de digestão (10µL) foi aplicado em gel de agarose a 3% em tampão TEB (1X), com corrente de 80V por 65 minutos. O gel foi visualizado e fotografado sob luz UV, com gel red ([www.lhgdh.ibilce.unesp.br/protocolos](http://www.lhgdh.ibilce.unesp.br/protocolos)). O **Quadro 2** descreve a amplificação dos fragmentos dos éxons 2 e 4, no qual se localizam as três mutações do gene HFE, no códon 282 (TGC > TAC), códon 63 (CAT > GAT), códon 65 (AGT > IGT).

**Quadro 2** - Detecção do polimorfismo do gene HFE: localização, substituição, sequência, enzima de restrição e tamanho do fragmento.

GENES	SEQUÊNCIAS	ENZIMAS DE RESTRIÇÃO	TAMANHOS DOS FRAGMENTOS
C282Y (TGC > TAC)	L282 5' GGG TAT TTC CTT CCT CCA ACC 3' R282 5' CTC AGG CAC TCC TCT CAA CC 3'	<b>Rsal</b> (10000U/mL)	441pb
H63D (CAT > GAT)	L63 5' ACA TGG TTA AGG CCT GTT GC 3' R63 5' ATC CCC AGC CTT GTT AAC TG 3'	<b>BclI</b> (15000U/mL)	496pb
S65C (AGT > IGT)	L63 5' ACA TGG TTA AGG CCT GTT GC 3' R63 5' ATC CCC AGC CTT GTT AAC TG 3'	<b>Hinfl</b> (1FDU/µL)	496pb

Fonte: Adaptado de Feder *et al.*, (1996) e Simonsen *et al.* (1999)

As denominações 282CC, 63HH, 65SS; 282CY, 63HD, 65SC e 282YY, 63DD, 65CC referem-se ao alelo selvagem, alelos heterozigotos e alelos homozigotos, respectivamente. Fragmentos de 296 e 145pb foram encontrados para o alelo selvagem (282CC), de 296, 145, 116 e 29pb para o alelo heterozigoto (282CY) e de 296, 116 e 29pb para o alelo homozigoto (282YY). Fragmentos de 352 e 144pb correspondem ao alelo selvagem (63HH), de 496, 352 e 144pb ao alelo heterozigoto (HD), enquanto um fragmento de 496pb foi observado na presença do alelo homozigoto (63DD). Fragmentos de 274, 147, 69 e 6pb foram observados para o alelo normal (65SS), 274, 216, 147, 69 e 6pb para o alelo mutante heterozigoto



(65SC) e fragmentos 274, 216 e 6pb para o alelo mutante homozigoto (65CC) (Quadro 3).

**Quadro 3** - Fragmentos obtidos após digestão do produto de PCR e seu significado

GENES	FRAGMENTOS OBTIDOS APÓS DIGESTÃO (pb)		
	alelos selvagens (282CC, 63HH, 65SS)	alelos mutantes homozigotos (282YY, 63DD, 65CC)	alelos mutantes heterozigotos (282CY, 63HD, 65SC)
<b>C282Y</b>	296 e 145pb	296, 116 e 29	296, 145, 116 e 29
<b>H63D</b>	352 e 144	496	496, 352 e 144
<b>S65C</b>	274, 147,69 e 6	274, 216 e 6	274, 216, 147,69 e 6

As principais etapas e metodologias aplicadas na pesquisa estão demonstradas nas figuras 9 e 10.

### 3.4 Análises estatísticas

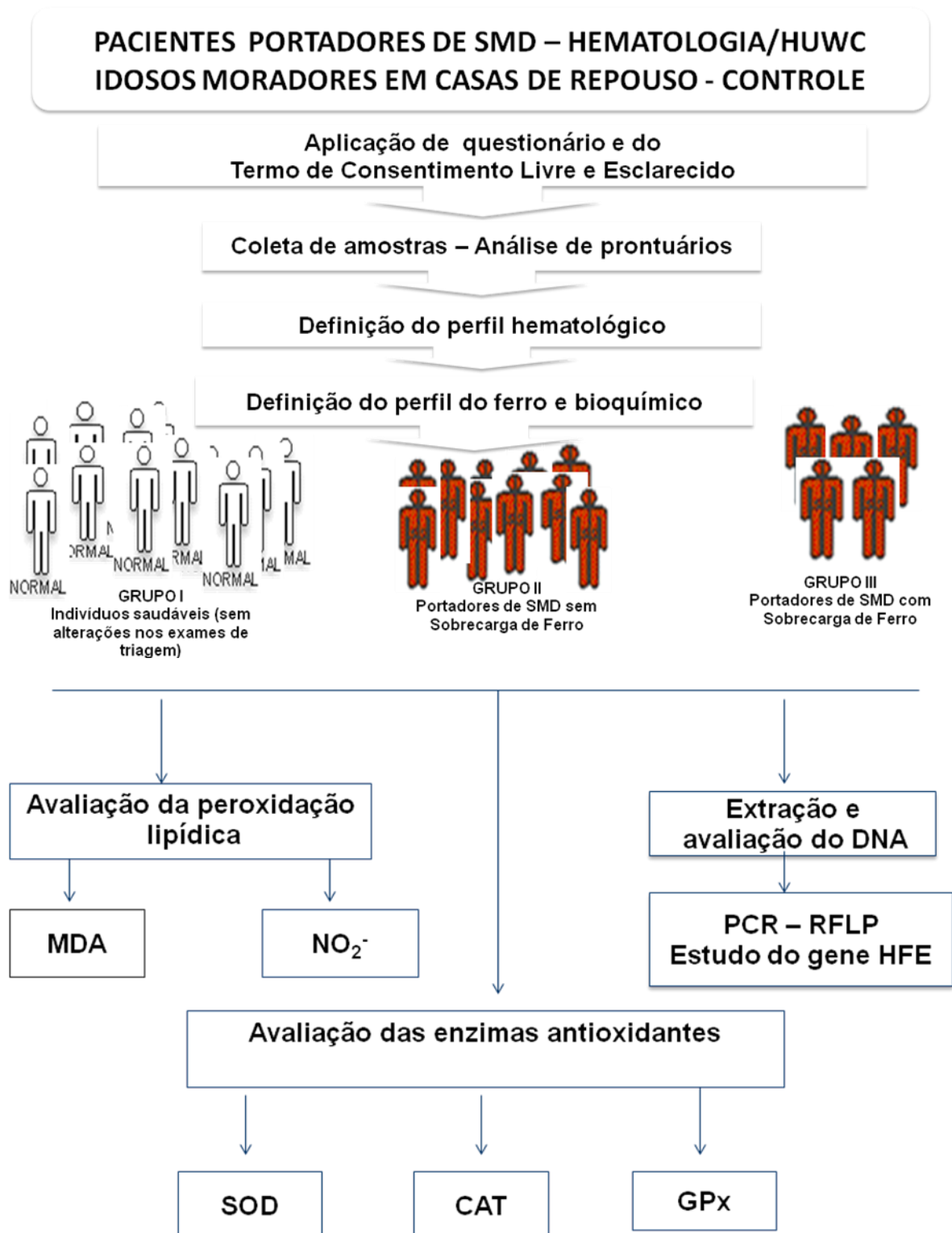
As variáveis contínuas quantitativas foram testadas para determinar se sua distribuição é normal ou não, usando o teste de Kolmogorov-Smirnov. A seguir, a comparação entre dois ou três grupos foi feita usando os testes t de Student não pareado ou ANOVA com pós-teste de Newman-Keuls respectivamente caso a distribuição fosse normal ou usando os testes de Mann-Whitney ou Kruskal-Wallis com pós teste de Dunns caso a distribuição fosse não normal.

Para testar a existência de correlações entre duas variáveis quantitativas contínuas foram usados os testes de Pearson ou Spearman, conforme a distribuição das variáveis.

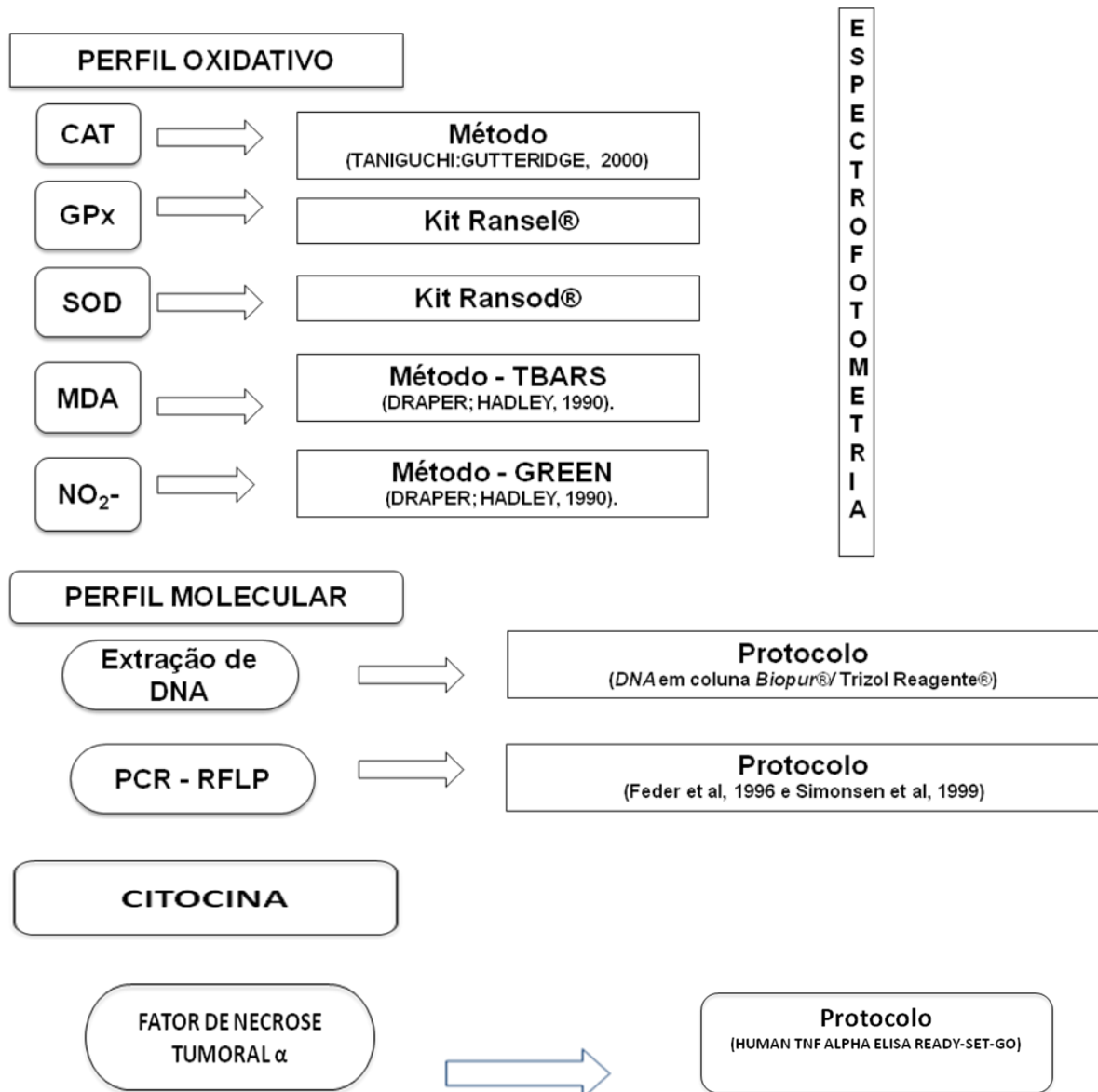
Para testar diferenças entre as frequências entre dois ou mais grupos foi usado o teste do Qui-quadrado ( $X^2$ ). Quando pelo menos uma frequência foi menor que quatro foi usado o teste exato de Fisher.

As análises estatísticas foram realizadas por meio do programa GraphPrism (versão 5.01). Os resultados foram expressos pela média e desvio padrão (média  $\pm$  SD). Os valores de  $p < 0,05$  foram considerados significativos.

**Figura 9 - Fluxograma das principais etapas da Pesquisa**



**Figura 10** - Delineamento da metodologia da Pesquisa



RESULTADOS

## 4 RESULTADOS

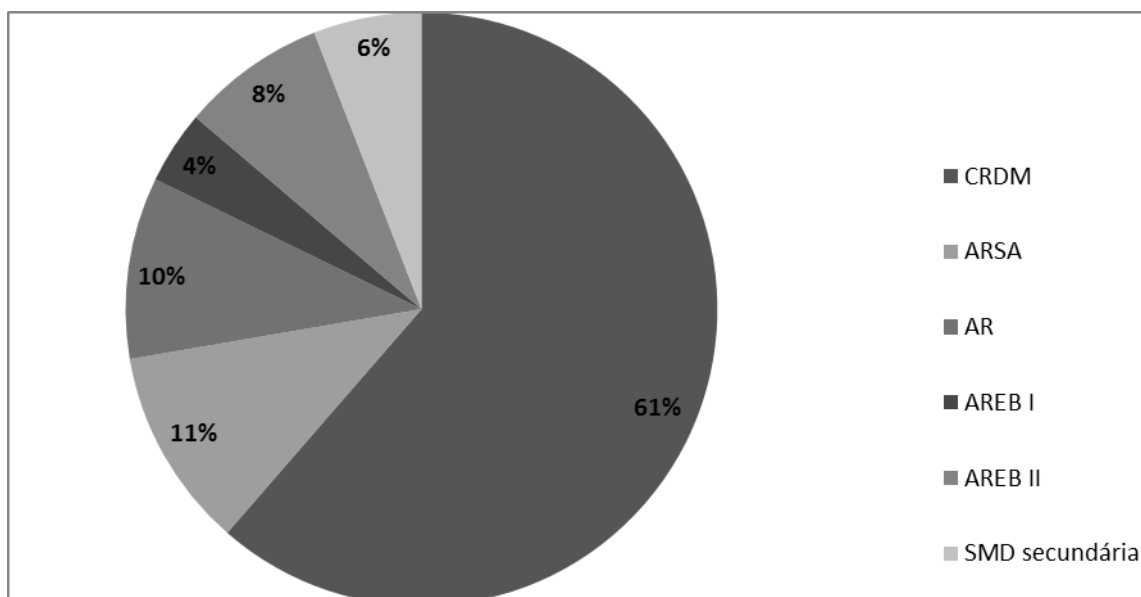
### 4.1 Características clínicas e epidemiológicas

Cento e vinte e quatro portadores de SMD foram atendidos de maio de 2010 a setembro de 2011. O sexo feminino representou 57,3% (n=71) e o masculino 42,7% (n=53). Cento e dezesseis (93,5%) pacientes foram classificados como SMD primária (**Anexo A**).

Desses, 101 compuseram a casuística, sendo 51 (50,5%) do sexo feminino. Noventa e cinco (94,1%) tiveram diagnóstico de SMD primária e apresentaram mediana de idade de 68 anos (65 pacientes com idade  $\geq$  60 anos). Sessenta e oito (67,3%) eram provenientes da zona urbana.

Dos pacientes diagnosticados como SMD primária, 61,4% apresentaram mais de duas citopenias no sangue periférico e de acordo com a classificação OMS, o subtipo predominante foi CRDM (61%), seguido pelo subtipo ARSA (11%) e AR (10%) (**Figura 11**).

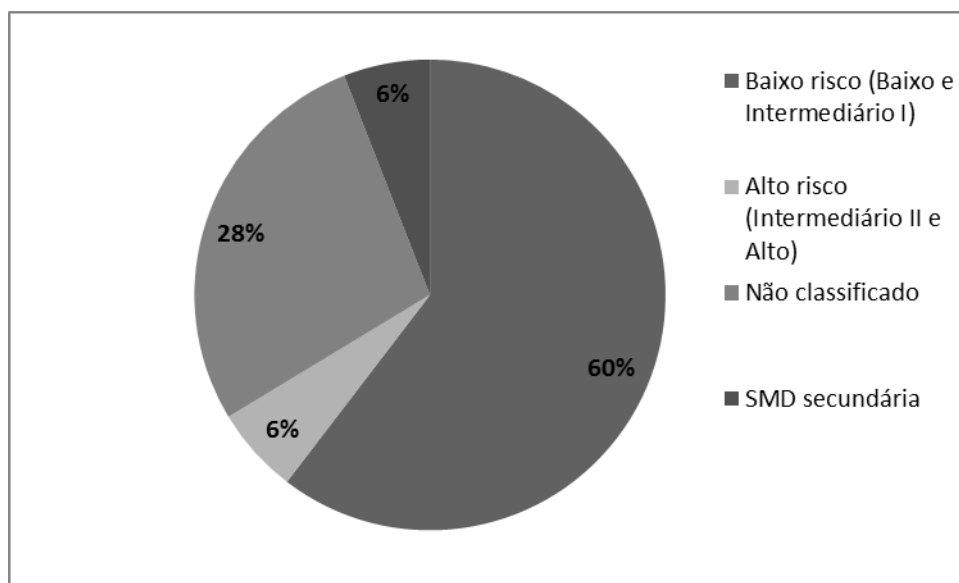
**Figura 11** - Distribuição dos 101 pacientes portadores de SMD, de acordo com a classificação OMS.



**Legenda:** AR (Anemia Refratária); ARSA (Anemia Refratária com Sideroblastos em Anel); CRDM (Citopenia Refratária com Displasia Multilinhagem); AREB I e II (Anemia Refratária com Excesso de Blastos).

Segundo o IPSS, dentre os 61 pacientes classificados como de baixo risco (33% pertenciam ao grupo de menor risco e 67% ao de risco intermediário I). O sexo masculino representou 52,5% do grupo de baixo risco. Seis pacientes (6%) pertenciam ao grupo de mais alto risco (intermediário II e alto), sendo a maioria (83,3%) do sexo masculino. Em 28% dos casos não foi possível a estratificação de risco pela ausência da análise citogenética. A classificação de SMD secundária foi atribuída a seis pacientes (01 caso secundário à radioterapia, 02 à quimioterapia e 03 casos após uso do imunossupressor azatioprina) (**Figura 12**).

**Figura 12** - Distribuição dos pacientes portadores de SMD primária, segundo Sistema Internacional de Escore Prognóstico (IPSS-1997).



Sessenta e três (62,4%) pacientes apresentaram a hemoglobina  $\leq 10$  g/dL, sendo 30 (47,6%) do sexo feminino e 33 (52,4%) do sexo masculino.

A neutropenia, com média de neutrófilos –  $1.207/\text{mm}^3$ , esteve presente em 69 pacientes (68,3%), sendo 30 (43,5%) do sexo feminino e 39 (56,5%) do sexo masculino.

A plaquetopenia foi observada em 53 (52,5%) pacientes, sendo 22 (41,5%) do sexo feminino e 31 (58,5%) do sexo masculino. O número médio de plaquetas apresentado pelo grupo foi de  $51.168/\text{mm}^3$ .

Em 21 (20,8%) indivíduos o total de blastos na medula óssea foi superior ou igual a 5% (33,3% do sexo feminino e 66,7% do sexo masculino).

A anemia com dependência transfusional foi observada em 49 pacientes (48,5%). Desses, 30 (61,2%) eram do sexo masculino e 19 (38,8%) do sexo feminino.

Na **tabela 3** estão demonstradas as características clínicas e epidemiológicas da população com suas características laboratoriais.

**Tabela 3** – Características clínicas e epidemiológicas dos portadores de SMD sem e com sobrecarga de ferro.

Parâmetros	SMD geral (n=101)	SMD sem sobrecarga (n=77)	SMD com sobrecarga (n=24)
<b>Sexo</b>			
Masculino	50 (49,5%)	38 (49,4%)	12 (50,0%)
Feminino	51 (50,5%)	39 (50,6%)	12 (50,0%)
<b>Idade (anos)</b>			
Mediana	68,0	66,0	70,0
Média	64,6	63,5	68,4
< 60 anos (%)	36 (35,6%)	30 (39,0%)	06 (25,0%)
≥ 60 anos (%)	65 (64,4%)	47 (61,0%)	18 (75,0%)
<b>Procedência</b>			
Interior	33 (32,7%)	24 (31,2%)	9 (37,5%)
Capital	68 (67,3%)	53 (68,8%)	15 (62,5%)
<b>Classificação</b>			
SMD primária	95 (94,1%)	72 (93,5%)	23 (95,8%)
SMD secundária	06 (5,9%)	05 (6,5%)	01 (4,2%)
<b>Distribuição OMS (n=95)</b>			
CRDM	62 (65,3%)	49 (51,6%)	13 (13,7%)
ARSA	11 (11,6%)	05 (5,3%)	06 (6,3%)
AR	10 (10,5%)	09 (9,5%)	01 (1,0%)
AREB I	04 (4,2%)	04 (4,2%)	-
AREB II	08 (8,4%)	05 (5,3%)	03 (3,1%)
<b>Nº de citopenias</b>			
0/1	39 (38,6%)	31 (40,3%)	08 (33,3%)
2/3	62 (61,4%)	46 (59,7%)	16 (66,7%)
<b>Dependência transfusional (%)</b>			
SIM	49 (48,5%)	29 (37,7%)	20 (83,3%)
NÃO	52 (51,5%)	48 (62,3%)	04 (16,7%)
<b>Hemoglobina (g/dL)</b>			
≤ 10	63 (62,4%)	40 (52,0%)	23 (95,8%)
>10	38 (37,6%)	37 (48,0%)	01 (4,2%)

<b>Plaquetas (mm<sup>3</sup>)</b>			
≤ 100.000	53 (52,5%)	40 (51,9%)	13 (54,2%)
>100.000	48 (47,5%)	37 (48,1%)	11 (45,8%)
<b>Neutrófilos (mm<sup>3</sup>)</b>			
≤ 1.800	69 (68,3%)	53 (68,8%)	16 (66,7%)
> 1.800	32 (31,7%)	24 (31,2%)	08 (33,3%)
<b>IPSS</b>			
Baixo (baixo e INT- I)	61 (60,4%)	49 (63,6%)	12 (50,0%)
Alto (INT- II e alto)	06 (5,9%)	05 (6,5%)	01 (4,2%)
SMD secundária	06 (5,9%)	05 (6,5%)	01 (4,2%)
Não classificado	28 (27,7%)	18 (23,4%)	10 (41,7%)

SMD: síndrome mielodisplástica; AR (anemia refratária); ARSA (AR com sideroblastos em anel); CRDM (citopenia refratária com displasia multilineagem); AREB I e II (anemia refratária com excesso de blastos); IPSS (Sistema Internacional de Escore Prognóstico).

## 4.2 Características citogenéticas

### 4.2.1 Citogenética clássica (banda G)

A análise citogenética foi realizada em todos os sujeitos do estudo. Não foi verificada metáfase em 30 (29,7%) indivíduos. Dos 71 pacientes com metáfases analisadas, 48 pacientes (67,6%) foram classificados como prognóstico favorável, 16 pacientes (22,5%) possuíam prognóstico intermediário e 7 pacientes (9,9%) prognóstico desfavorável, segundo os critérios utilizados pelo IPSS (GREENBERG *et al.*, 1997) (**Tabela 4**) (**Figura 13**).

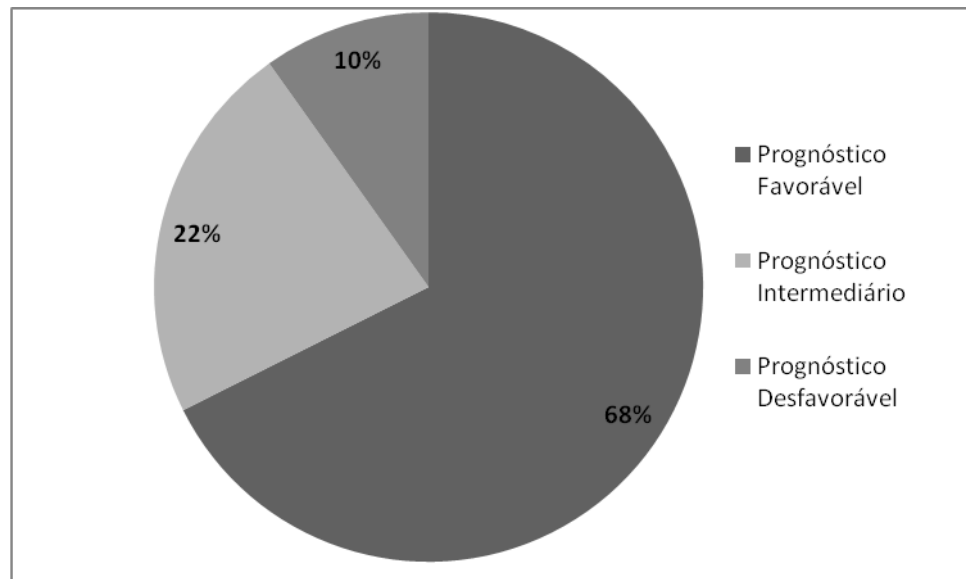


**Tabela 4** - Dados citogenéticos dos pacientes com SMD sem e com sobrecarga de ferro.

<b>Citogenética</b>	<b>SMD (n=71)</b>	<b>SMD sem sobrecarga (n=57)</b>	<b>SMD com sobrecarga (n=14)</b>
<b>Análise do Cariótipo</b>			
Normal	37/71 (52,1%)	31/37 (83,8%)	6/37 (16,2%)
Alterado	34/71 (47,9%)	26/34 (76,5%)	8/34 (23,5%)
<b>Nº de alterações citogenéticas</b>			
Uma alteração	21/34 (61,8%)	16/21 (76,2%)	5/21 (23,8%)
Duas alterações	10/34 (29,4%)	6/10 (60%)	4/10 (40%)
≥ 3 alterações	3/34 (8,8%)	3/3 (100%)	-
<b>Cromossomos envolvidos</b>			
Cromossomo 5 (-5/5q-)	13/34 (38,3%)	9/13 (69,2%)	4/13(30,8%)
Cromossomo 7 (-7/7q-)	3/34 (8,8%)	3(100%)	-
Cromossomo 11 (-11/11q-)	3/34 (8,8%)	3(100%)	-
Cromossomo 16 (+16)	3/34 (8,8%)	3(100%)	-
Cromossomo 17 (-17/17p-)	3/34 (8,8%)	2/3(66,7%)	1/3(33,3%)
Cromossomo 20 (-20/20q-)	1/34 (2,9%)	1(100%)	-
Outros	8/34(23,6%)	5/8(62,5%)	3/8(37,5%)
<b>Grupo citogenético (IPSS)</b>			
Favorável	48/71 (67,6%)	39/48 (81,2%)	9/48 (18,8%)
Intermediário	16/71 (22,5%)	12/16 (75,0%)	4/16 (25,0%)
Desfavorável	7/71 (9,9%)	6/7 (85,7%)	1/7 (14,3%)

SMD: síndrome mielodisplástica; IPSS (Sistema Internacional de Escore Prognóstico).

**Figura 13** – Análise citogenética, segundo o IPSS nos portadores de SMD, sem e com sobrecarga de ferro.



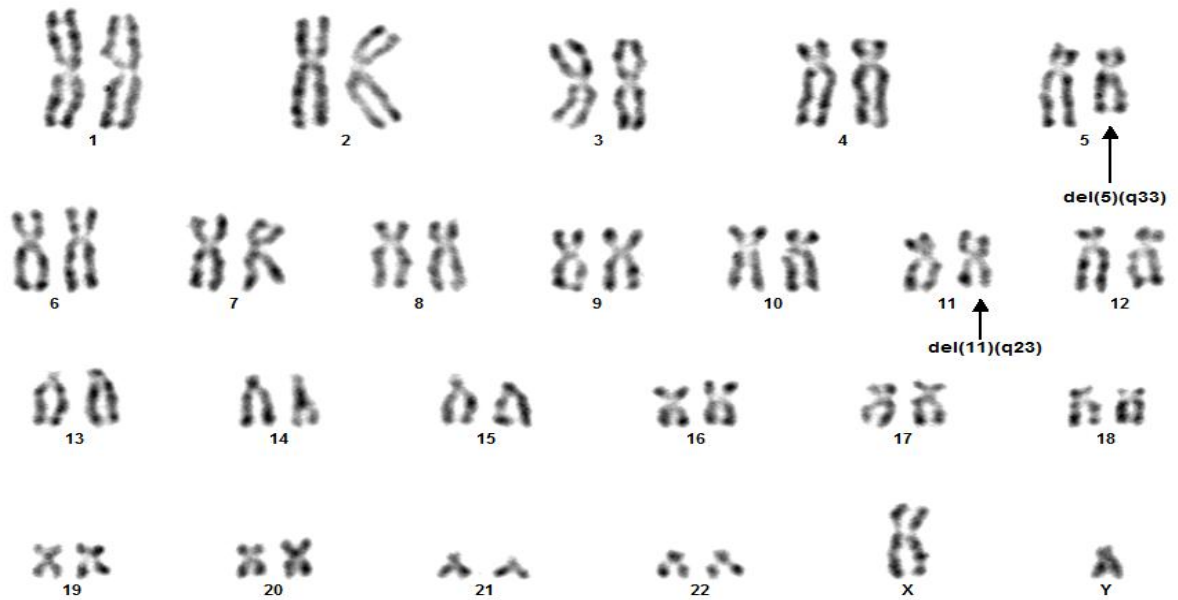
Dos 34 pacientes (47,9%) com cariótipo alterado, 21 (61,8%) apresentaram uma alteração, 10 (29,4%) apresentaram clones com duas alterações e 3 (8,8%) apresentaram cariótipo com 3 ou mais alterações citogenéticas. O cromossomo 5 (-5/5q-) foi o mais envolvido no estudo, ocorrendo em 13 (38,3%) dos 34 pacientes (**Figura 13**).

**Figura 14** - Citogenética clássica (bandamento G). Cariótipo com apenas uma alteração cromossômica: 46, XY,del(5)

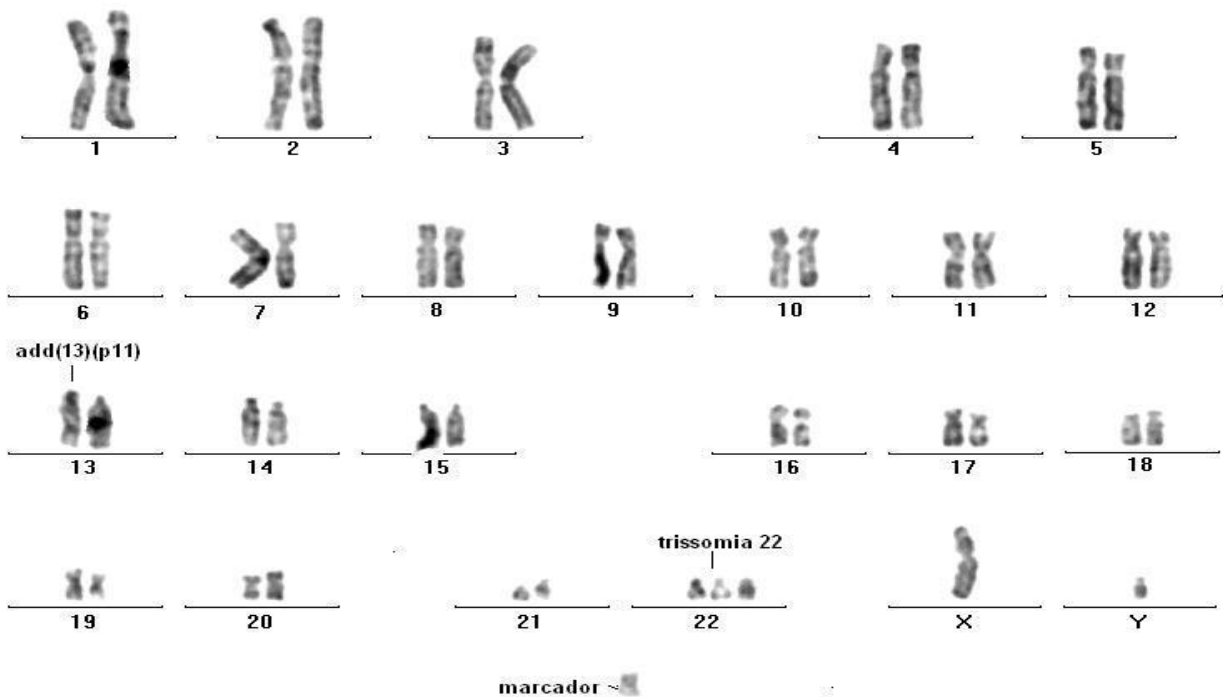


Observaram-se alterações envolvendo o cromossomo 7 (-7/7q-) em 8,8% dos casos, cromossomo 16 (+16) em 8,8%, cromossomo 17 (-17/17p-) em 8,8% e o cromossomo 20 (-20/20q-) em 2,9% dos pacientes. As alterações cromossômicas estão demonstradas nas **Figuras 15 e 16**.

**Figura 15** - Citogenética clássica (bandamento G). Cariótipo com duas alterações cromossômicas: 46,XY,del(5)(q15q33),del(11)(q23).



**Figura 16** - Citogenética clássica (bandamento G). Cariótipo complexo: 48,XY,add(13)(p11),+22,+mar.



### 4.3 Características laboratoriais

A **tabela 5** sumariza as características clínicas e as análises laboratoriais realizadas em todos os participantes do estudo, 87 indivíduos saudáveis (**grupo 1**) e 101 portadores de SMD, sendo 77 sem sobrecarga e 24 com sobrecarga ferro, **grupo 2 e grupo 3, respectivamente.**

**Tabela 5** - Características laboratoriais dos indivíduos saudáveis e portadores de SMD sem e com sobrecarga de ferro

Variáveis	Indivíduos saudáveis (87)	SMD sem sobrecarga (77)	SMD com Sobrecarga (24)	p
<b>Sexo</b>				
Masculino (%)	9 (10,3%)	38 (49,4%)	12 (50%)	-
Feminino	78 (89,7%)	39 (50,6%)	12 (50%)	-
<b>Idade</b>				
Média (anos)	72,40 ± 11,34	63,47 ± 18,25 <sup>a</sup>	68,38 ± 16,58	<b>0.0011</b>
<b>Parâmetros Hematológicos</b>				
Hemoglobina (g/dL)	13,4 ± 0,9	9,9 ± 3,1 <sup>a</sup>	6,4 ± 1,7 <sup>b,c</sup>	<b>&lt;0.0001</b>
Neutrófilos (/mm <sup>3</sup> )	3.765 ± 1.083	1.917 ± 1.557 <sup>a</sup>	2.036 ± 1.920 <sup>b</sup>	<b>&lt;0.0001</b>
Plaquetas (/mm <sup>3</sup> )	250.356 ± 59.277	143.643 ± 142.645 <sup>a</sup>	163.588 ± 176.433 <sup>b</sup>	<b>&lt; 0.0001</b>
<b>Perfil do Ferro</b>				
Ferro sérico (µg/dL)	87,41 ± 28,55	103,74 ± 47,37	196,42 ± 65,00 <sup>b,c</sup>	<b>&lt; 0.0001</b>
Ferritina (ng/mL)	140,90 ± 96,75	297,70 ± 210,40 <sup>a</sup>	2.853,25 ± 2.529 <sup>b,c</sup>	<b>&lt; 0.0001</b>
Índice de saturação da transferrina (%)	32,4 ± 8,82	42,88 ± 21,90 <sup>a</sup>	80,83 ± 19,98 <sup>b,c</sup>	<b>&lt; 0.0001</b>
CTLF (mg/dL)	275,49 ± 68,62	257,50 ± 66,03	241,25 ± 47,87 <sup>b</sup>	<b>0.0109</b>
<b>Parâmetros Bioquímicos</b>				
Ácido úrico (mg/dL)	4,85 ± 0,98	4,35 ± 1,25 <sup>a</sup>	3,79 ± 1,03 <sup>b</sup>	<b>&lt; 0.0001</b>

Creatinina (mg/dL)	0,82 ± 0,22	0,91 ± 0,36	0,78 ± 0,22	0.1644
Uréia (mg/dL)	27,55 ± 10,71	33,43 ± 16,93	30,46 ± 7,95	0.0524
AST (U/L)	27,89 ± 10,22	26,97 ± 15,03	30,88 ± 20,68	0.2281
ALT (U/L)	19,00 ± 6,3	25,70 ± 19,4	39,50 ± 24,5 <sup>b</sup>	<b>0.0006</b>
LDH (mg/dL)	84,28 ± 43,29	167,7 ± 99,73 <sup>a</sup>	247,0 ± 128,8 <sup>b,c</sup>	<b>&lt; 0.0001</b>
<b>Parâmetros Dano Oxidativo</b>				
Malonaldeído (µM)	3,85 ± 1,28	9,81 ± 3,77 <sup>a</sup>	14,33 ± 1,80 <sup>b,c</sup>	<b>&lt;0.0001</b>
Nitrito (nM)	0,40 ± 0,15	3,80 ± 1,90 <sup>a</sup>	6,68 ± 2,29 <sup>b,c</sup>	<b>&lt;0.0001</b>
Glutaciona peroxidase (Ug/Hb)	60,84 ± 9,31	80,79 ± 16,03 <sup>a</sup>	154,0 ± 17,90 <sup>b,c</sup>	<b>&lt;0.0001</b>
Catalase (Ug/Hb)	16.636 ± 1.003	24.822 ± 3.354 <sup>a</sup>	27.118 ± 3.894 <sup>b</sup>	<b>&lt;0.0001</b>
Superóxido dismutase (Ug/Hb)	1.607 ± 57,74	3.478 ± 567,9 <sup>a</sup>	5.107 ± 443,6 <sup>b,c</sup>	<b>&lt;0.0001</b>
<b>Citocina</b>				
TNF-α (pg/mL)	31,94 ± 23,77	45,01 ± 32,24 <sup>a</sup>	112,8 ± 163,0 <sup>b,c</sup>	<b>&lt; 0.0001</b>

SMD: síndrome mielodisplástica; CTLF: capacidade total de ligação do ferro; ALT/TGP: alanina aminotransferase; AST/TGO: aspartato aminotransferase; LDH: lactato desidrogenase; TNF-α: Fator de necrose tumoral alfa; CTLF: capacidade total de ligação do ferro;

<sup>a</sup> quando se compararam pacientes sem sobrecarga de ferro x controles;

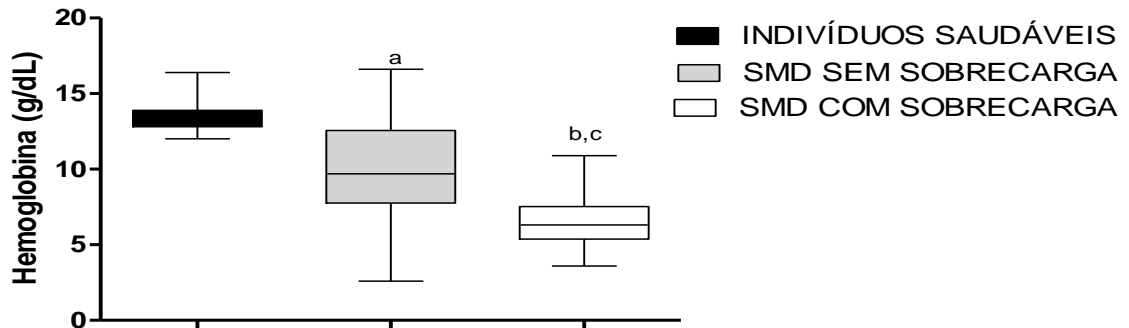
<sup>b</sup> quando se compararam pacientes com sobrecarga de ferro x controles;

<sup>c</sup> quando se compararam pacientes com sobrecarga x sem sobrecarga de ferro;

Ao analisar a idade, observou-se que o grupo de pacientes sem sobrecarga, apresentou menor média, sendo significativa a diferença ( $p=0.0011$ ) quando comparado à média de idade do grupo dos indivíduos saudáveis. Com relação ao sexo não foi observada diferença significativa entre os pacientes sem e com sobrecarga.

A **figura 17** mostra redução significativa ( $p<0.0001$ ) na hemoglobina quando se compararam pacientes portadores de SMD e indivíduos saudáveis, como também, pacientes com e sem sobrecarga de ferro. Com relação à contagem de neutrófilos e plaquetas observou-se redução significativa ( $p<0.0001$ ) apenas quando se compararam pacientes e indivíduos saudáveis.

**Figura 17** – Dosagem de hemoglobina nos portadores de SMD sem e com sobrecarga de ferro e indivíduos saudáveis.



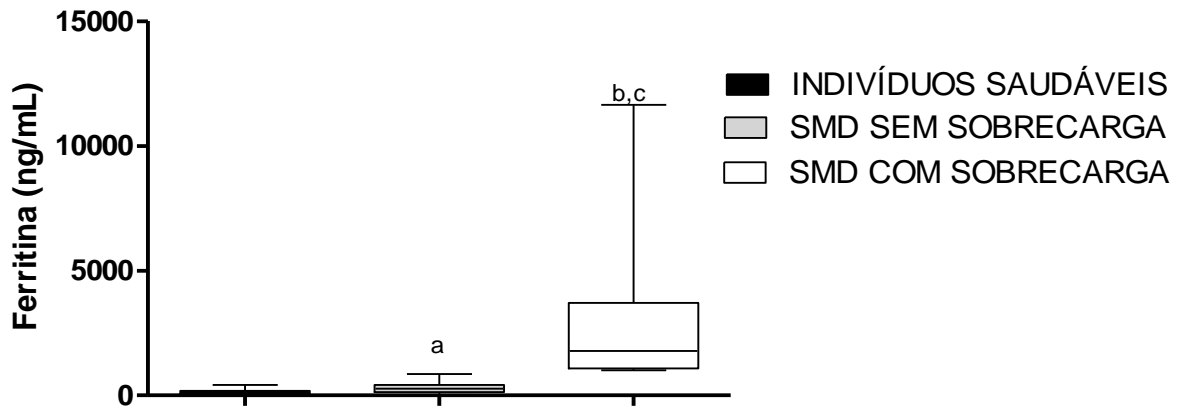
<sup>a</sup> quando se compararam pacientes sem sobrecarga de ferro x controles;

<sup>b</sup> quando se compararam pacientes com sobrecarga de ferro x controles;

<sup>c</sup> quando se compararam pacientes com sobrecarga x sem sobrecarga de ferro;

As **figuras 18, 19 e 20** revelam as médias dos parâmetros de sobrecarga de ferro. Nos pacientes do grupo 3 houve elevação significativa ( $p < 0.0001$ ) do ferro sérico, ferritina e saturação da transferrina quando comparados ao grupo sem sobrecarga de ferro e ao grupo de indivíduos saudáveis. Houve uma redução significativa da capacidade total de ligação do ferro (CTLF) ( $p = 0.0109$ ), em média, quando foram comparados os grupos com sobrecarga e de indivíduos saudáveis.

**Figura 18** – Ferritina sérica em portadores de SMD sem e com sobrecarga de ferro e indivíduos saudáveis.

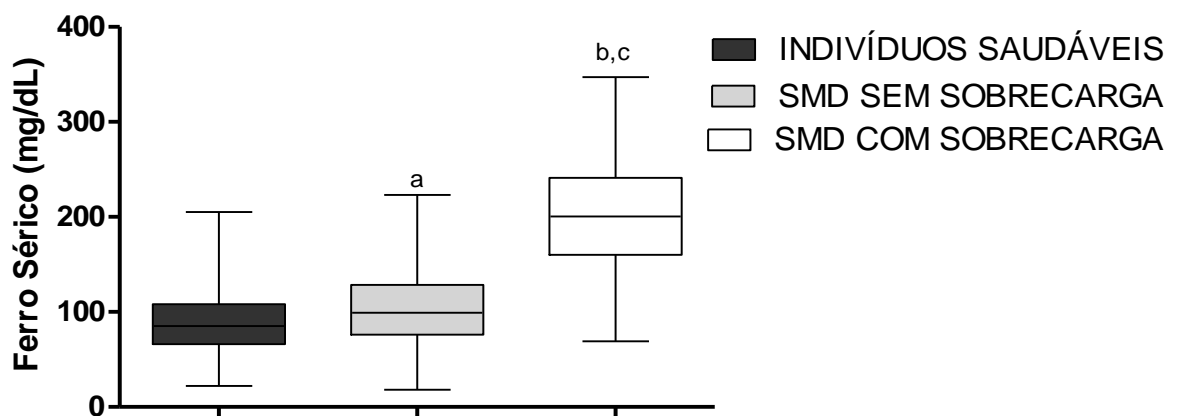


<sup>a</sup> quando se compararam pacientes sem sobrecarga de ferro x controles;

<sup>b</sup> quando se compararam pacientes com sobrecarga de ferro x controles;

<sup>c</sup> quando se compararam pacientes com sobrecarga x sem sobrecarga de ferro;

**Figura 19** – Ferro sérico nos portadores de SMD sem e com sobrecarga de ferro e indivíduos saudáveis.



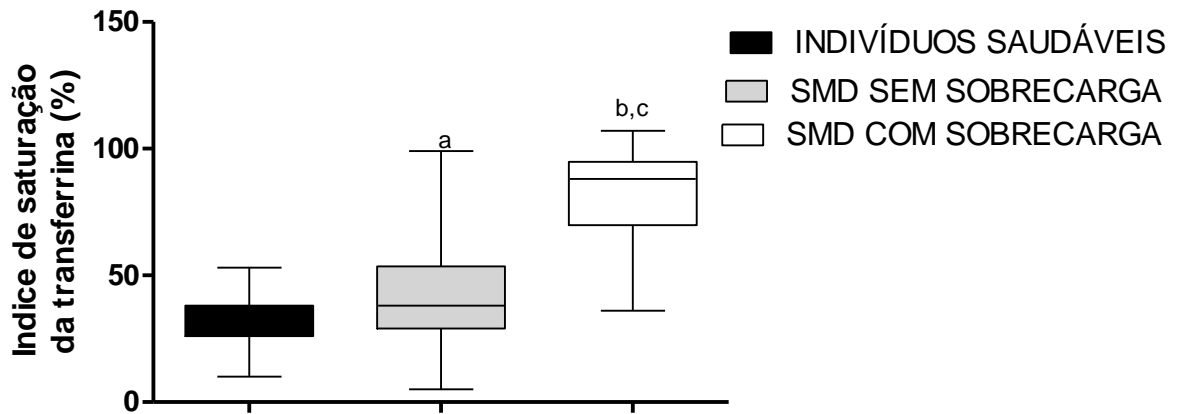
<sup>a</sup> quando se compararam pacientes sem sobrecarga de ferro x controles;

<sup>b</sup> quando se compararam pacientes com sobrecarga de ferro x controles;

<sup>c</sup> quando se compararam pacientes com sobrecarga x sem sobrecarga de ferro;



**Figura 20** – Índice de saturação da transferrina em portadores de SMD sem e com sobrecarga de ferro e indivíduos saudáveis.



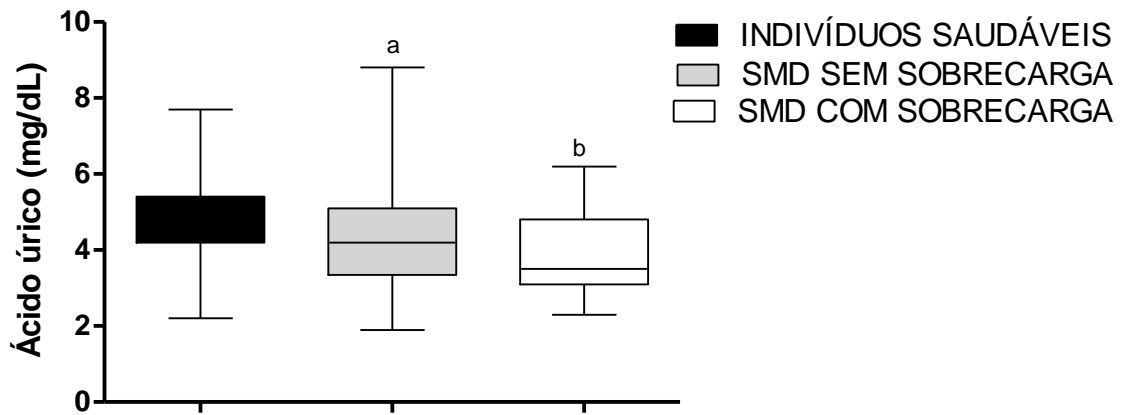
<sup>a</sup>definido quando se compararam pacientes sem sobrecarga de ferro x controles;

<sup>b</sup>definido quando se compararam pacientes com sobrecarga de ferro x controles;

<sup>c</sup>definido quando se compararam pacientes com sobrecarga x sem sobrecarga de ferro;

Na dosagem do ácido úrico, observou-se redução significativa ( $p < 0.0001$ ) quando se compararam os portadores de SMD sem e com sobrecarga de ferro e indivíduos saudáveis (**Figura 21**). Para alanina aminotransferase (ALT) houve aumento significativo ( $p=0.0006$ ) nos pacientes com sobrecarga de ferro quando comparado ao grupo controle (**Figura 22**).

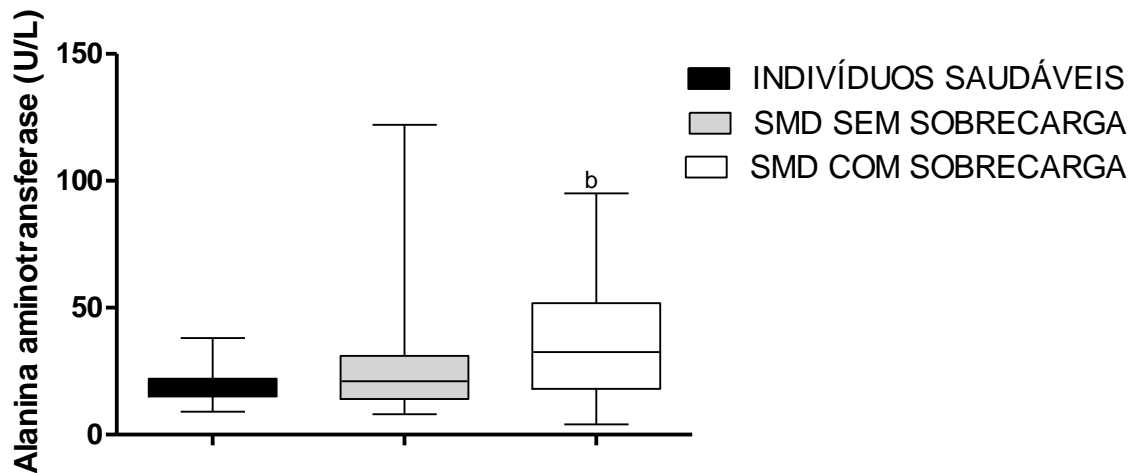
**Figura 21** – Ácido úrico em portadores de SMD sem e com sobrecarga de ferro e indivíduos saudáveis.



<sup>a</sup> quando se compararam pacientes sem sobrecarga de ferro x controles;

<sup>b</sup> quando se compararam pacientes com sobrecarga de ferro x controles;

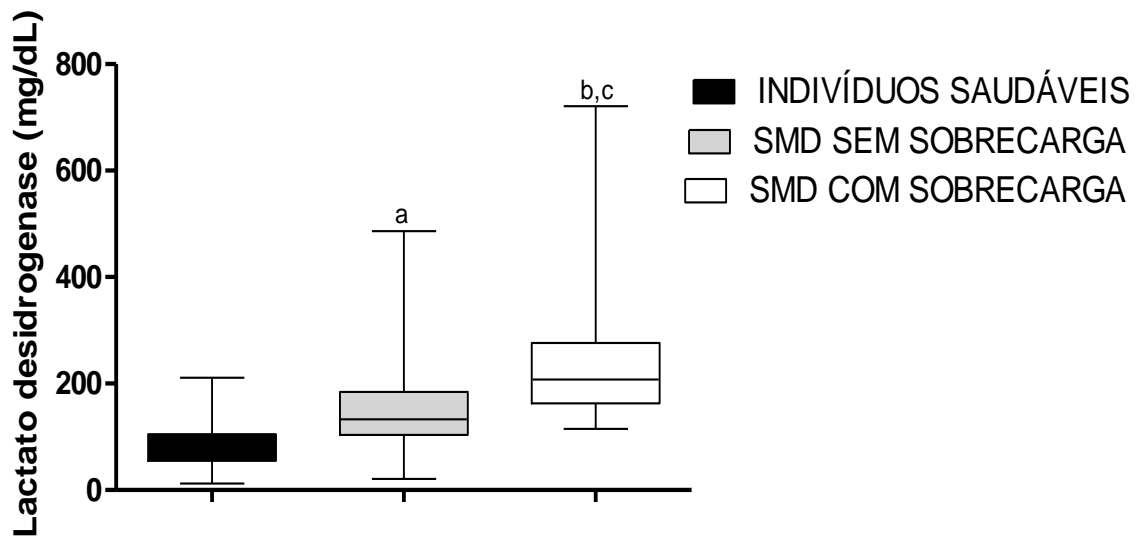
**Figura 22** – Alanina aminotransferase (ALT) em portadores de SMD sem e com sobrecarga de ferro e indivíduos saudáveis.



<sup>b</sup> quando se compararam pacientes com sobrecarga de ferro x controles;

Em relação à lactato desidrogenase (LDH) verificou-se aumento significativo ( $p < 0.0001$ ) nos portadores de SMD com sobrecarga de ferro em relação aos portadores sem sobrecarga e grupo controle (**Figura 23**).

**Figura 23** – Lactato desidrogenase (LDH) em portadores de SMD sem e com sobrecarga de ferro e indivíduos saudáveis.



<sup>a</sup> quando se compararam pacientes sem sobrecarga de ferro x controles;

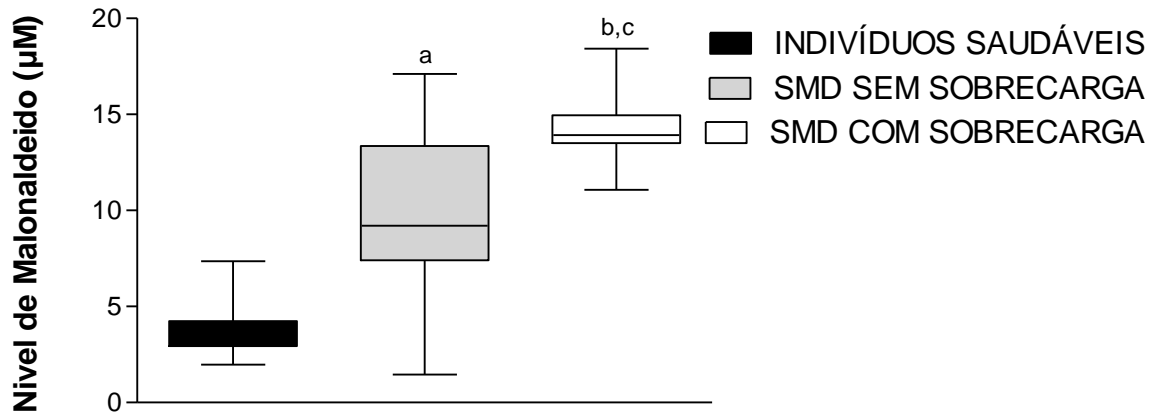
<sup>b</sup> quando se compararam pacientes com sobrecarga de ferro x controles;

<sup>c</sup> quando se compararam pacientes com sobrecarga x sem sobrecarga de ferro;

#### 4.3.1 Avaliação do estresse oxidativo

As concentrações dos marcadores da peroxidação lipídica, MDA e nitrito, foram significativamente maiores ( $p < 0.0001$ ) nos portadores de SMD com sobrecarga de ferro quando comparados aos portadores sem sobrecarga e indivíduos saudáveis (**Figura 24 e Figura 25**).

**Figura 24** – Nível de malonaldeído em portadores de SMD sem (n=77), com sobrecarga de ferro (n=24) e em indivíduos saudáveis (n=87).

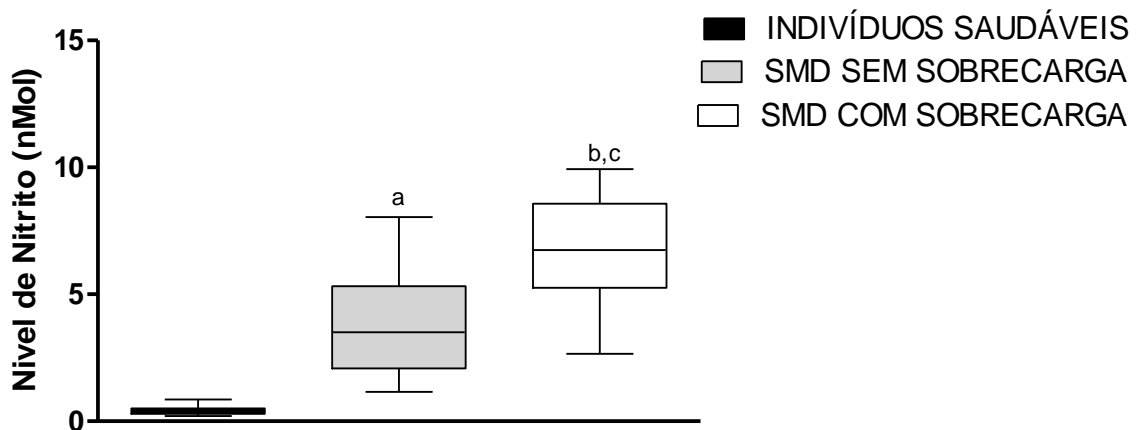


<sup>a</sup> quando se compararam pacientes sem sobrecarga de ferro x controles;

<sup>b</sup> quando se compararam pacientes com sobrecarga de ferro x controles;

<sup>c</sup> quando se compararam pacientes com sobrecarga x sem sobrecarga de ferro;

**Figura 25** – Nível de nitrito em portadores de SMD sem (n=77), com sobrecarga de ferro (n=24) e em indivíduos saudáveis (n=87).



<sup>a</sup> quando se compararam pacientes sem sobrecarga de ferro x controles;

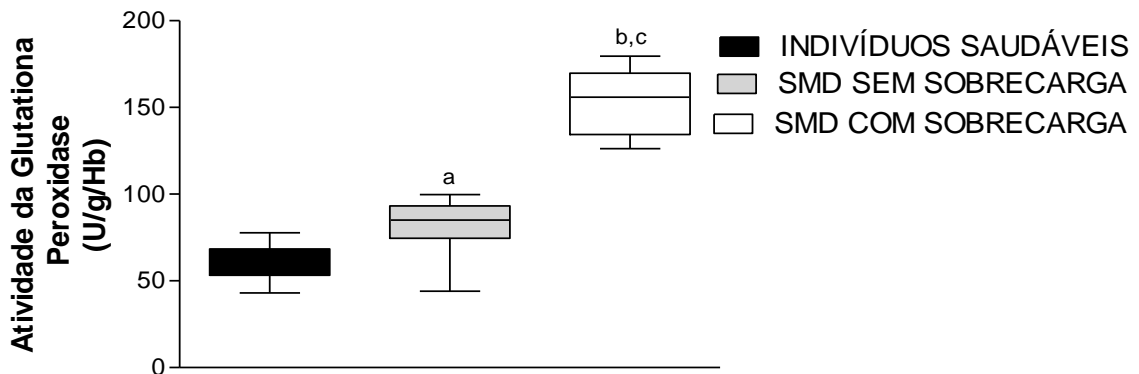
<sup>b</sup> quando se compararam pacientes com sobrecarga de ferro x controles;

<sup>c</sup> quando se compararam pacientes com sobrecarga x sem sobrecarga de ferro;

As **figuras 26 e 27** ilustram a atividade das enzimas glutathiona peroxidase (GPx) e superóxido dismutase (SOD), que foram significativamente superiores nos

pacientes com sobrecarga de ferro ( $p < 0.0001$ ) quando comparados aos pacientes sem sobrecarga de ferro e indivíduos saudáveis.

**Figura 26** – Atividade da enzima antioxidante glutatona peroxidase em portadores de SMD sem ( $n=77$ ), com sobrecarga de ferro ( $n=24$ ) e em indivíduos saudáveis ( $n=87$ ).

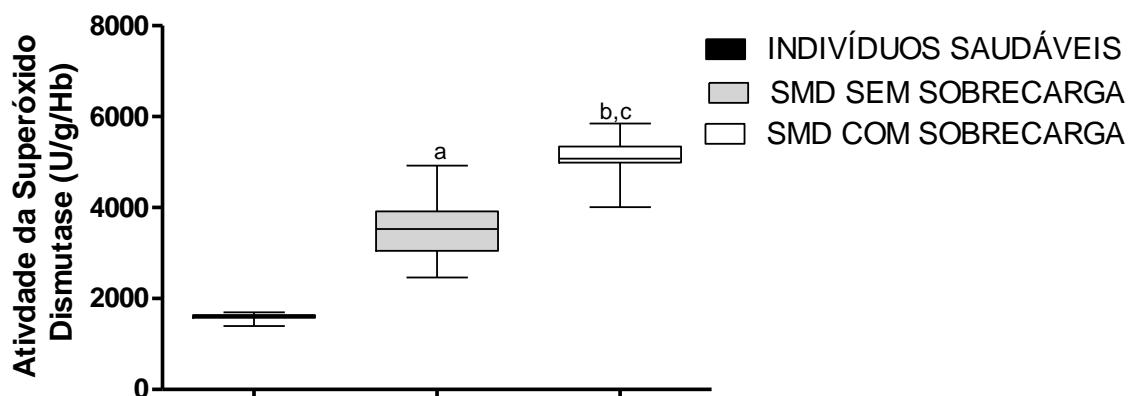


<sup>a</sup> quando se compararam pacientes sem sobrecarga de ferro x controles;

<sup>b</sup> quando se compararam pacientes com sobrecarga de ferro x controles;

<sup>c</sup> quando se compararam pacientes com sobrecarga x sem sobrecarga de ferro;

**Figura 27** – Atividade da superóxido dismutase em portadores de SMD sem ( $n=77$ ), com sobrecarga de ferro ( $n=24$ ) e em indivíduos saudáveis ( $n=87$ ).



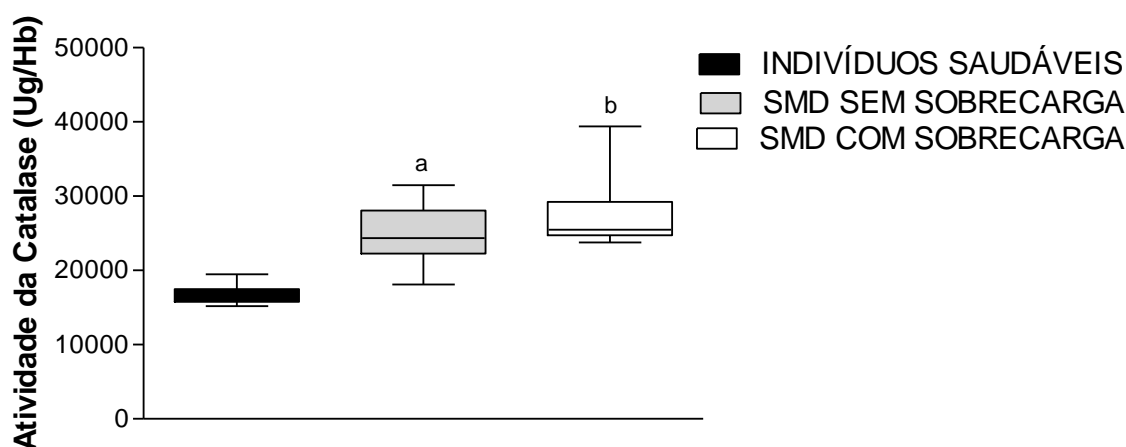
<sup>a</sup> quando se compararam pacientes sem sobrecarga de ferro x controles;

<sup>b</sup> quando se compararam pacientes com sobrecarga de ferro x controles;

<sup>c</sup> quando se compararam pacientes com sobrecarga x sem sobrecarga de ferro;

Foi observado aumento significativo na atividade da enzima antioxidante catalase ( $p < 0,0001$ ) quando comparados portadores de SMD e indivíduos saudáveis (**Figura 28**), porém, quando comparados pacientes com sobrecarga de ferro e sem sobrecarga, não se observou diferença significativa, embora, em média, a atividade dessa enzima tenha sido superior no grupo de pacientes com sobrecarga de ferro.

**Figura 28** – Atividade da enzima antioxidante catalase em portadores de SMD sem ( $n=77$ ), com sobrecarga de ferro ( $n=24$ ) e em indivíduos saudáveis ( $n=87$ ).



<sup>a</sup> quando se compararam pacientes sem sobrecarga de ferro x controles;

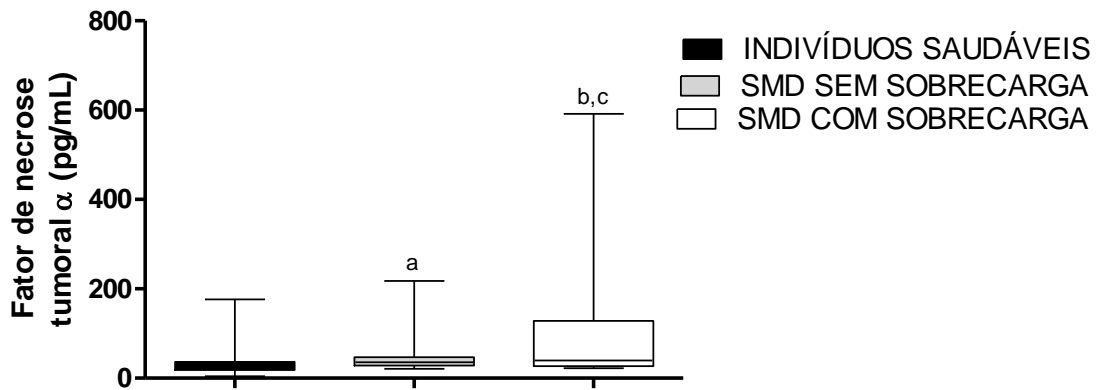
<sup>b</sup> quando se compararam pacientes com sobrecarga de ferro x controles;

<sup>c</sup> quando se compararam pacientes com sobrecarga x sem sobrecarga de ferro;

#### 4.3.2 Avaliação do fator de necrose tumoral $\alpha$ (TNF $\alpha$ )

A atividade do TNF  $\alpha$  foi superior ( $p < 0.0001$ ) nos portadores de SMD com SF quando comparados aos portadores sem SF e indivíduos saudáveis (**Figura 29**).

**Figura 29** – Atividade do fator de necrose tumoral  $\alpha$  em portadores de SMD sem e com sobrecarga de ferro e indivíduos saudáveis.



<sup>a</sup> quando se compararam pacientes sem sobrecarga de ferro x controles;

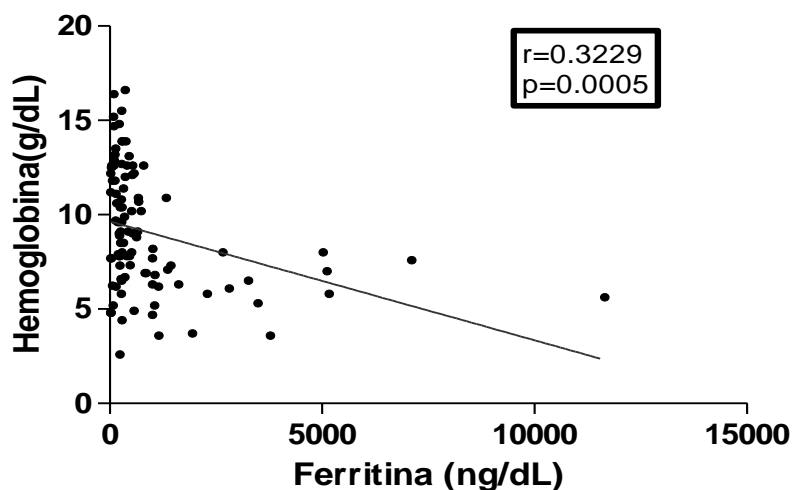
<sup>b</sup> quando se compararam pacientes com sobrecarga de ferro x controles;

<sup>c</sup> quando se compararam pacientes com sobrecarga x sem sobrecarga de ferro;

#### 4.3.3 Correlação entre nível de hemoglobina, sobrecarga de ferro, dano oxidativo, enzimas antioxidantes e citocina TNF $\alpha$ nos portadores de SMD

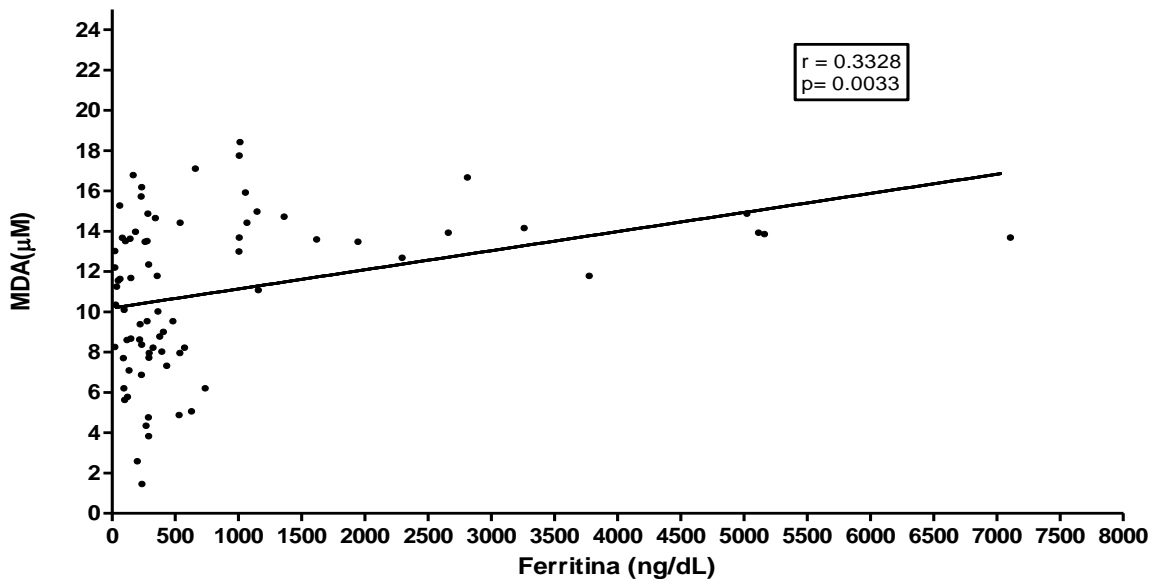
O nível de hemoglobina nos pacientes com sobrecarga de ferro foi significativamente menor ( $p < 0.0001$ ). Quanto menor a dosagem de hemoglobina maior o nível de ferritina nesses pacientes (**Figura 30**).

**Figura 30** – Correlação entre o nível de ferritina e hemoglobina nos pacientes com SMD



Observou-se aumento significativo do MDA e nitrito plasmático no grupo de pacientes com SF quando comparados aos outros grupos ( $p < 0.0001$ ), para ambas variáveis. O nível de MDA foi diretamente correlacionado com a ferritina sérica ( $r = 0.3328$ ,  $p = 0.0033$ ) (**Figura 31**).

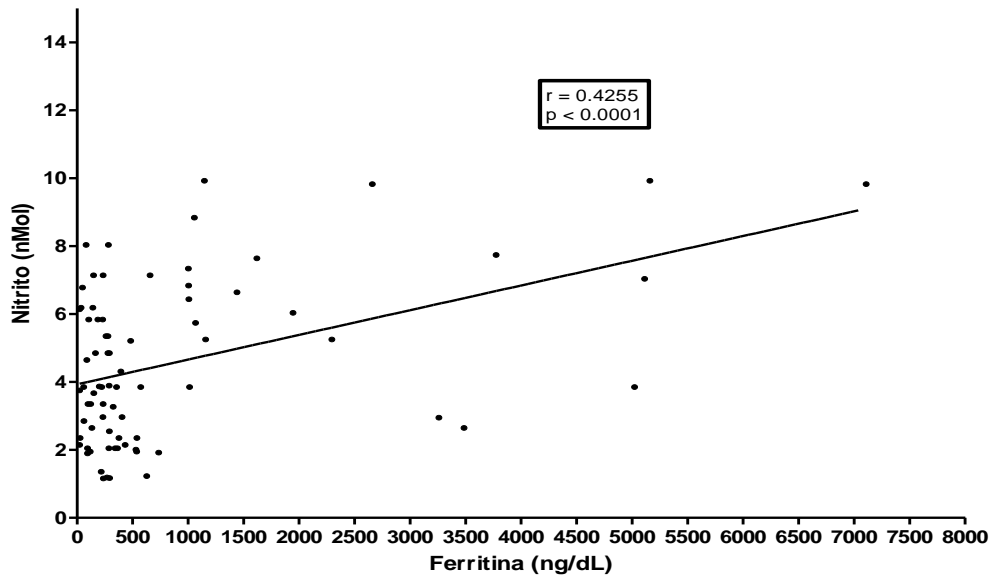
**Figura 31** – Correlação entre o nível de ferritina e malonaldeído nos pacientes com SMD.



A **figura 32** expressa a correlação positiva observada entre o nível de nitrito e a ferritina sérica ( $r = 0.4255$ ,  $p < 0.0001$ ).

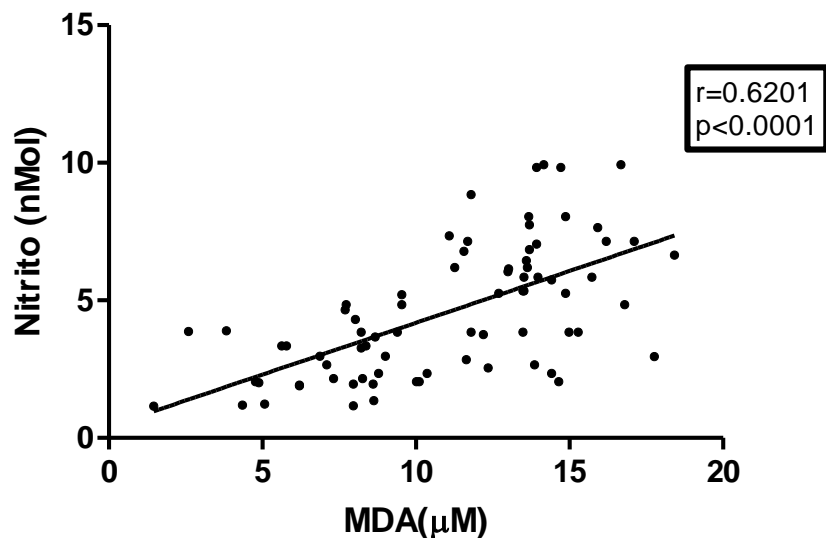


**Figura 32** – Correlação entre o nível de ferritina e nitrito nos pacientes com SMD.



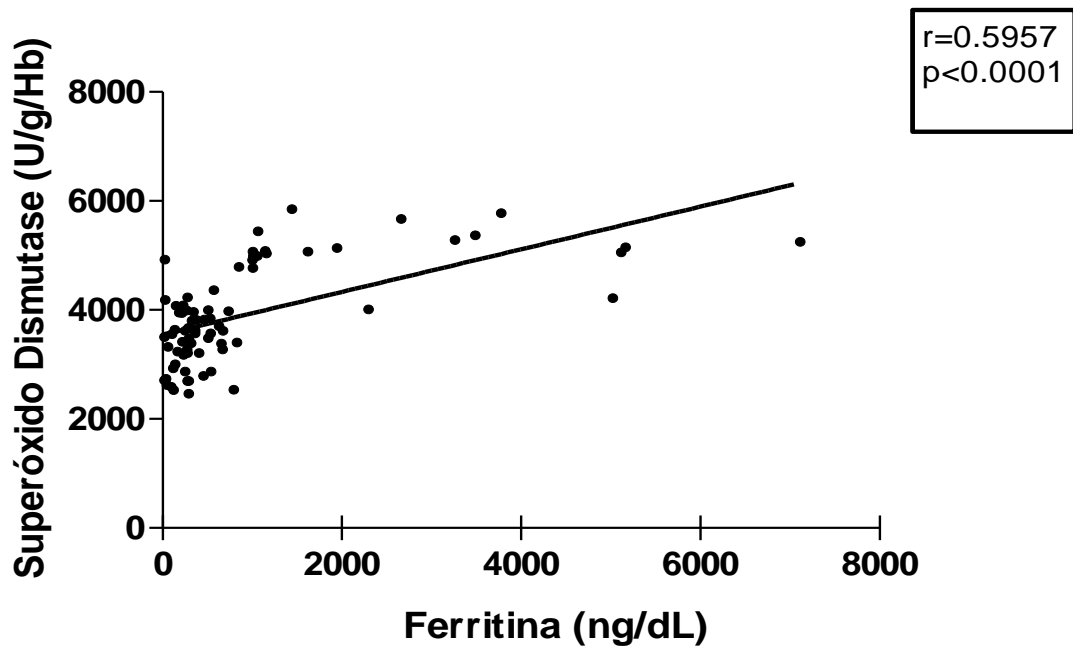
Observou-se também associação linear entre MDA e nitrito plasmático ( $r=0.6201$ ,  $p < 0.0001$ ) (**Figura 33**).

**Figura 33** – Correlação entre o nível de malonaldeído e nitrito nos pacientes com SMD.



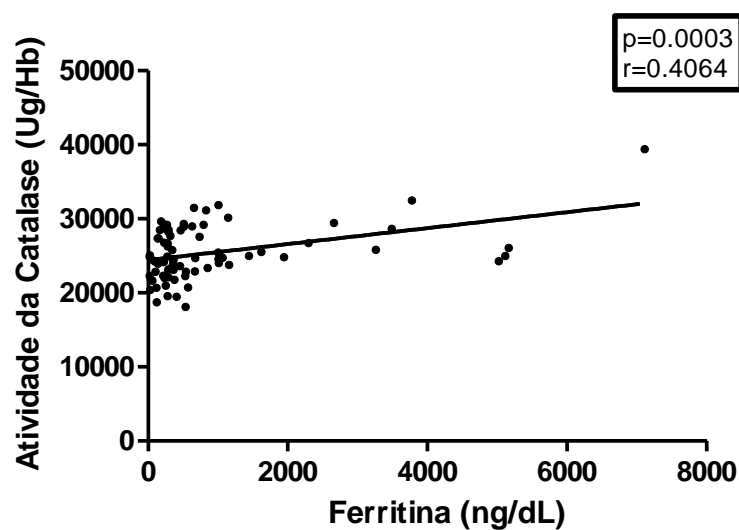
A **figura 34** mostra a correlação positiva observada entre a ferritina sérica e a atividade da enzima antioxidante superóxido dismutase ( $r=0.5957$ ,  $p < 0.0001$ ).

**Figura 34** – Correlação entre o nível de ferritina e superóxido dismutase nos pacientes com SMD.



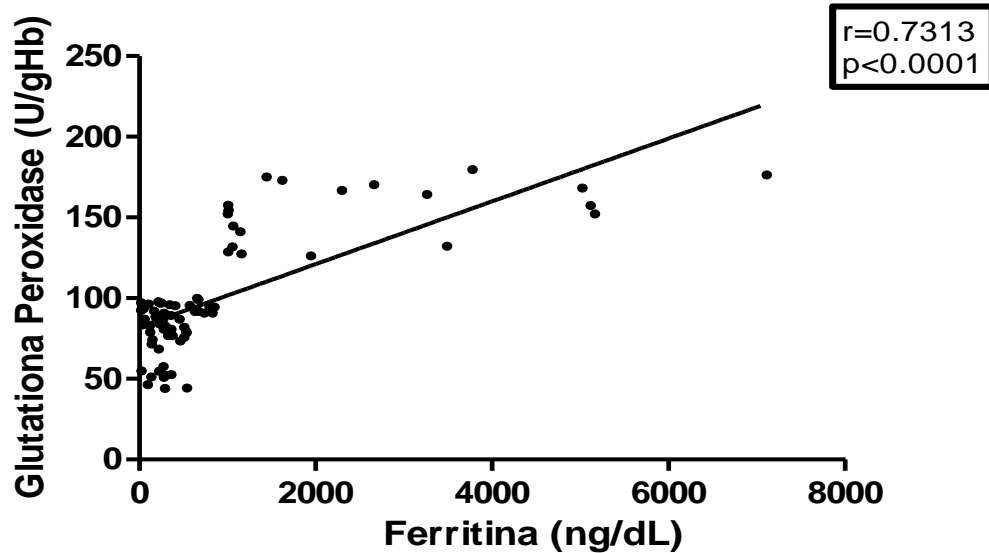
A figura 35 mostra a correlação positiva observada entre a ferritina sérica e a atividade da enzima antioxidante catalase ( $r=0.4064$ ,  $p=0.0003$ ).

**Figura 35** – Correlação entre o nível de ferritina e atividade da catalase nos pacientes com SMD



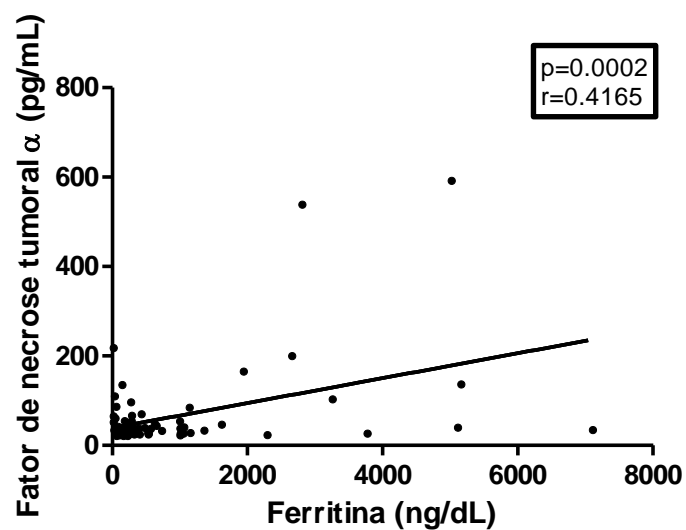
A figura 36 expressa a correlação positiva observada entre a ferritina sérica e a atividade da enzima antioxidante glutaciona peroxidase ( $r=0.7313$ ,  $p<0.0001$ ).

**Figura 36** – Correlação entre o nível de ferritina e glutatona peroxidase nos pacientes com SMD.



Observou-se aumento significativo do TNF  $\alpha$  plasmático nos pacientes com SF sendo correlacionado diretamente com a ferritina sérica ( $r=0.4165$   $p=0.0002$ ) (Figura 37).

**Figura 37** – Correlação entre o fator de necrose tumoral- $\alpha$  e o nível de ferritina nos pacientes com SMD.



#### 4.3.4 Caracterização do gene HFE

Dos 101 portadores de SMD que participaram do estudo, 78 (77,2%) foram analisados para o polimorfismo do gene HFE. Desses, 58 (74,4%) pertenciam ao grupo sem SF e 20 (25,6%) ao grupo de pacientes com sobrecarga de ferro. A pesquisa do gene HFE foi realizada em todos os indivíduos saudáveis participantes do estudo.

A **tabela 6** apresenta as características clínicas e laboratoriais desses indivíduos com análise para o gene HFE.

**Tabela 6-** Características clínicas e laboratoriais dos portadores de SMD sem e com sobrecarga de ferro e voluntários saudáveis com análise do gene HFE.

Variáveis	Voluntários saudáveis n=87	SMD sem sobrecarga n=58	SMD com sobrecarga n=20	Valor de p
<b>Demografica</b>				
Sexo (masculino/feminino)	9/78	31/27	9/11	
<b>Classificação (OMS)</b>				
Anemia refratária (AR)		6	-	
Anemia refratária com sideroblastos em anel (ARSA)		5	5	
Citopenia refratária com displasia multilineagem (CRMD)		36	12	
Anemia refratária com excesso de blastos (AREB – I)		2	-	
Anemia refratária com excesso de blastos (AREB – II)		4	2	
<b>SMD secundária</b>		5	1	
<b>Cariótipo</b>				
Favorável (normal, deleção 5q-, deleção 20q, monossomia Y)		29	7	
Desfavorável (mais de 3 alterações; anormalidades envolvendo o cromossomo 7)		6	1	
Intermediário (outras alterações)		9	4	
Sem metáfases		14	8	
<b>Grupos de risco (IPSS)</b>				
Baixo		12	3	
Intermediario I		24	7	

Intermediario II		4	1	
Alto		1	-	
Não se aplica		12	8	
<b>Número de Blastos (%)</b>				
< 5		52	18	
≥ 5		6	2	
<b>Número de transfusões (CH)</b>				
Sem transfusões		34	-	
< 10		21	-	
10 - 30		1	10	
31 – 50		2	3	
.> 50		-	7	
<b>Hemograma (média ± SD)</b>				
Hemoglobina (g/dL)	13,36 ± 0,95	9,62 ± 3,07	6,29 ± 1,80	<0.0001 <sup>a,b,c</sup>
Neutrófilos (mm <sup>3</sup> )	3.765 ± 1.083	1.805 ± 1.452	1.823 ± 1.716	<0.0001 <sup>a,b</sup>
Plaquetas (mm <sup>3</sup> )	250.356 ± 59.277	135.102 ± 134.584	124.089 ± 125.786	<0.0001 <sup>a,b,c</sup>
<b>Perfil do ferro (média ± SD)</b>				
Ferro sérico (µg/dL)	87,41 ± 28,55	107,6 ± 51,12	195,1 ± 70,21	<0.0001 <sup>a,b,c</sup>
Ferritina sérica (ng/mL)	140,9 ± 96,75	297,2 ± 223,8	2.880,0 ± 2.682,0	<0.0001 <sup>a,b,c</sup>
Índice de saturação da transferrina (%)	32,37 ± 8,82	44,66 ± 23,22	79,70 ± 21,24	<0.0001 <sup>a,b,c</sup>
<b>Parâmetros do Dano Oxidativo (média ± SD)</b>				
Malonaldeído (µM)	3,85 ± 1,27	10,13 ± 3,78	13,88 ± 1,40	<0.0001 <sup>a,b,c</sup>
Nitrito (nM)	0,40 ± 0,15	3,80 ± 1,90	6,68 ± 2,29	<0.0001 <sup>a,b,c</sup>
Glutaciona peroxidase (Ug/Hb)	60,84 ± 9,30	82,42 ± 16,08	152,4 ± 18,96	<0.0001 <sup>a,b,c</sup>
Catalase (Ug/Hb)	16.636 ± 1.003	24.822 ± 3.354	27.118 ± 3.894	<0.0001 <sup>a,b,c</sup>
Superóxido dismutase (Ug/Hb)	1.607 ± 57,74	3.535 ± 581,5	5.031 ± 443,5	<0.0001 <sup>a,b,c</sup>

**Citocina (pg/mL)**

TNF- $\alpha$	31,94 $\pm$ 23,77	50,42 $\pm$ 37,95	132,0 $\pm$ 177,9	<b>&lt;0.0001</b> <sup>a,b,c</sup>
---------------	-------------------	-------------------	-------------------	------------------------------------

SMD: síndrome mielodisplástica; OMS (Organização Mundial de Saúde); IPSS (Sistema Internacional de Escore Prognóstico); CH (concentrado de hemácias); TNF $\alpha$ : fator de necrose tumoral; CTLF: capacidade total de ligação do ferro;

<sup>a</sup> quando se compararam pacientes sem sobrecarga de ferro x controles;

<sup>b</sup> quando se compararam pacientes com sobrecarga de ferro x controles;

<sup>c</sup> quando se compararam pacientes com sobrecarga x sem sobrecarga de ferro;

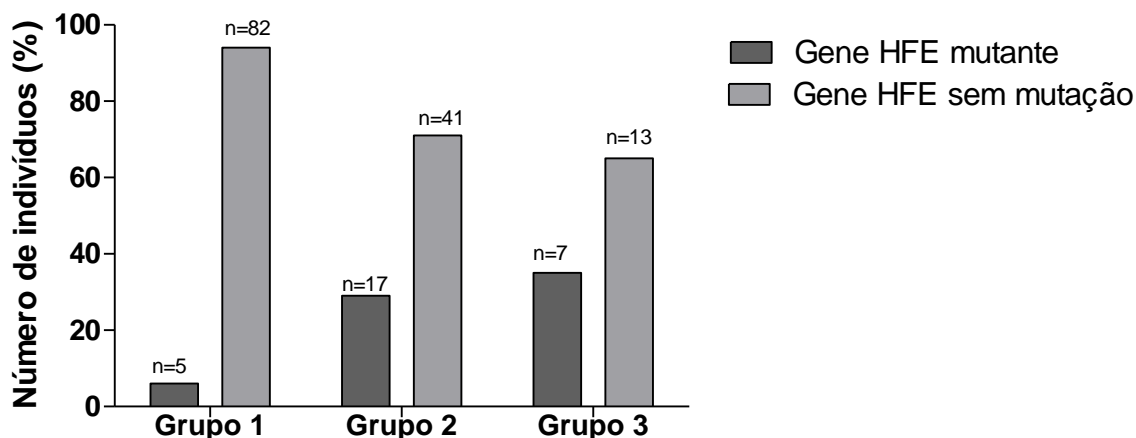
Dos 78 pacientes com SMD, 24 (30,77%) foram identificadas como tendo pelo menos uma mutação no gene HFE, sendo 14 (58,33%) do sexo masculino. Dos 87 voluntários saudáveis, 5 (5,74%) apresentaram pelo menos uma das mutações no gene HFE, sendo a maioria heterozigota para H63D. Um (5%) paciente do grupo com sobrecarga de ferro apresentou dupla heterozigose (C282Y/H63D). Nenhuma mutação para o polimorfismo S65C foi detectada. As frequências genotípicas encontradas nos pacientes com SMD e nos indivíduos voluntários saudáveis foram demonstradas na **Tabela 7 e Figura 38**.

**Tabela 7** - Distribuição da frequência genotípica para o gene HFE em relação ao sexo em voluntários saudáveis e portadores de SMD.

Genotipo (n=165)	C282Y/Wt (%)	H63D/H63D (%)	H63D/Wt (%)	C282Y/H63D (%)	Wt/Wt (%)
<b>Voluntários saudáveis (87)</b>					
<b>Masculino</b>	NE	NE	5 (5,75)	NE	82 (94,25)
<b>Feminino</b>	NE	NE	NE	NE	NE
<b>SMD sem sobrecarga (58)</b>					
<b>Masculino</b>	NE	2 (3,45)	8 (13,79)	NE	21 (36,2)
<b>Feminino</b>	NE	1 (1,72)	6 (10,34)	NE	20 (34,5)
<b>SMD com sobrecarga (20)</b>					
<b>Masculino</b>	* 1 (5,0)	NE	4 (20,0)	1 (5,0)	5 (25,0)
<b>Feminino</b>	NE	1 (5,0)	2 (10,0)	NE	8 (40,0)

SMD: síndrome mielodisplástica WT: alelo selvagem; \* paciente com dupla heterozigose (C282Y/H63D); NE: não encontrada

**Figura 38** – Portadores de SMD sem (n=58), com sobrecarga de ferro (n=20) e indivíduos saudáveis (n=87) com análise do gene HFE.



Ao se compararem as frequências genóticas entre todos os indivíduos, mutantes e não mutantes, verificou-se que houve diferença estatisticamente significativa entre eles ( $\chi^2 = 18.11,2$  e  $p=0,0001$ ). Quando as frequências genóticas foram comparadas entre voluntários saudáveis e pacientes com SMD com e sem SF, observou-se diferença significativa ( $p=0.0013$  e  $p=0.0002$ , respectivamente). No entanto, quando se comparou o grupo de pacientes com SMD sem e com SF não se observou diferença significativa ( $p = 0.6345$ ).

A frequência alélica para o H63D foi de 17,50% nos pacientes com SF e nos portadores de SMD sem SF foi de 14,66%. A frequência do alelo H63D no grupo de indivíduos saudáveis foi de 2,87%. O C282Y apresentou frequência alélica de 2,5% no grupo de pacientes com SF (**Tabela 8**).

**Tabela 8** – Frequência alélica para a mutação do gene HFE (C282Y e H63D) em voluntários saudáveis, portadores de SMD sem e com sobrecarga de ferro.

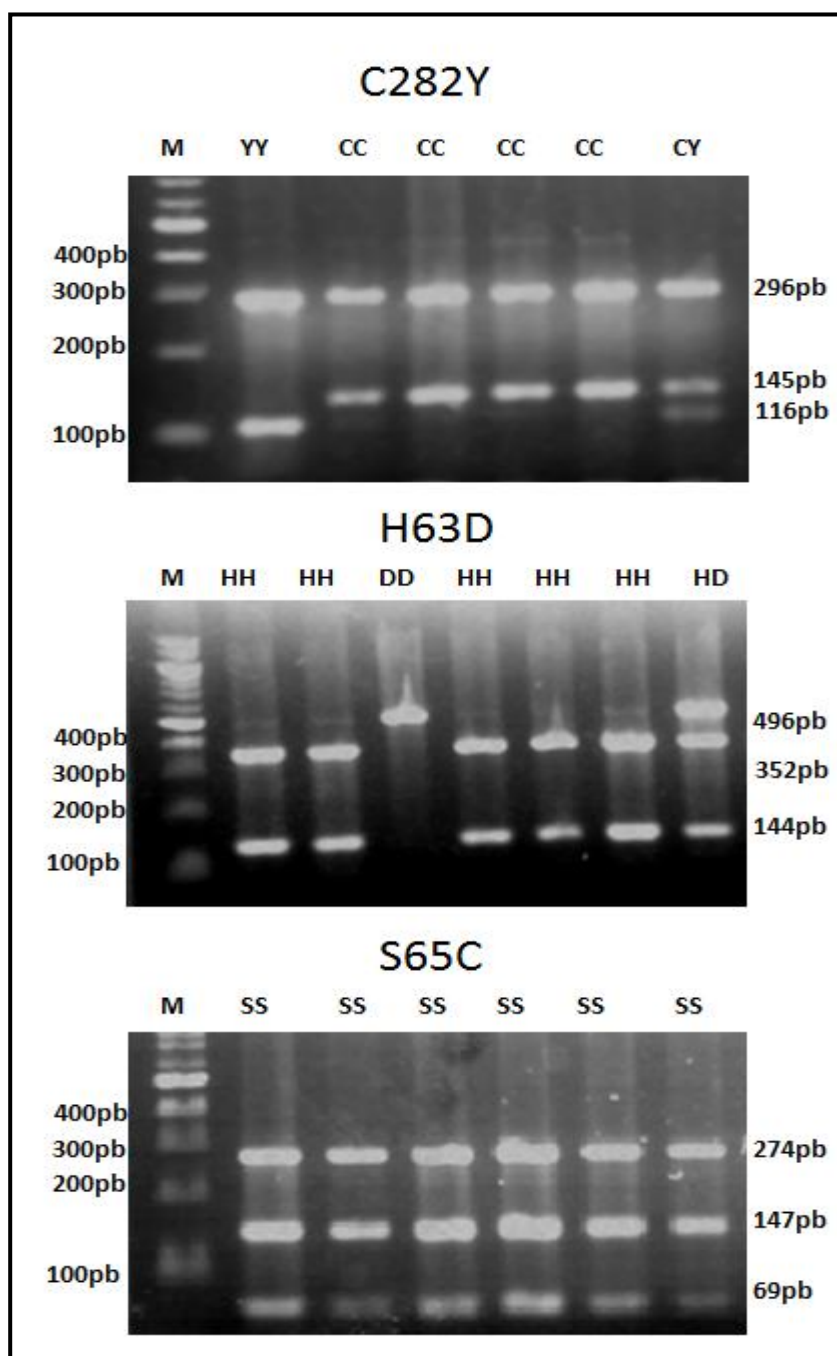
Grupos (n=165)	Mutação do gene HFE	Nº de Alelos	Alelos mutantes	Frequência alélica (%)
Voluntários saudáveis (87)	C282Y	174	-	-
	H63D	174	5	2,87
SMD sem sobrecarga (58)	C282Y	116	-	-
	H63D	116	17	14,66
SMD com sobrecarga (20)	C282Y	40	1	*2,50
	H63D	40	7	17,50

SMD: síndrome mielodisplástica; WT = alelo selvagem; C282Y = alelo mutante para C282Y; H63D = alelo mutante para H63D; \* paciente com dupla heterozigose (C282Y/H63D).

Sete (35%) pacientes com sobrecarga de ferro foram identificados com a mutação no gene HFE. Um deles, com 73 anos de idade, apresentou heterozigose dupla (C282Y/H63D) e o maior nível de ferritina sérica da população estudada, de 11.649,91 ng/mL, confirmado posteriormente com outras dosagens. Esse paciente foi encaminhado para a unidade de Hematologia com diagnóstico de síndrome mielodisplástica, classificada como anemia refratária com excesso de blastos tipo II. A investigação inicial mostrou hemoglobina 5,0 g/dL, leucócitos  $0,641 \times 10^9/L$ , contagem de plaquetas  $2 \times 10^9/L$ . A análise citogenética demonstrou 42, XY, -18, -19, -21, -22 / 46, XY. No seguimento o paciente apresentou notável pancitopenia com dependência transfusional. O número total de bolsas transfundidas foi de 24 unidades. Foi tratado com Dacogen  $20\text{mg}/\text{m}^2/\text{d}$  por 5 dias e morreu logo após o primeiro ciclo (**Figura 39**).



**Figura 39** – Representação da PCR – RFLP depois da digestão enzimática dos polimorfismos C282Y, H63D e S65C em seis pacientes.



A eletroforese foi realizada em gel de agarose a 3%, corada com gel/red 1x. M: marcador de 100 pb de DNA (Invitrogen). Seis pacientes estão representados. As bandas estão indicadas da esquerda para direita do painel. Homozigotos para o alelo C282Y (fragmentos 296pb, 116pb, 29pb); Heterozigotos para o alelo C282Y (fragmentos 296pb, 145pb, 116pb, 29pb); Homozigotos para o alelo H63D (somente 01 fragmento de 496pb); Heterozigotos para o alelo H63D

(fragmentos 496pb, 352pb e 144pb) e para o alelo S65C selvagem (fragmentos 274pb, 147pb, 69pb e 6pb).

#### **4.3.5 Características laboratoriais dos pacientes com e sem a mutação do gene HFE**

A **Tabela 9** compara as análises laboratoriais realizadas nos indivíduos saudáveis e portadores de SMD com e sem sobrecarga de ferro, com presença ou ausência da mutação no gene HFE.

No grupo de pacientes sem SF não foi observada diferença estatisticamente significativa ( $p=0.08843$ ) para hemoglobina quando se compararam aqueles com e sem a mutação. Também no grupo de pacientes com SF não houve diferença estatisticamente significativa ( $p=0.8278$ ) quando comparados aqueles com e sem a mutação para o gene HFE (**Tabela 10**).

Todos os pacientes com mutação para o gene HFE apresentaram os níveis de ferritina significativamente mais elevados, no grupo sem SF ( $p<0.0001$ ) e com SF ( $p=0.0189$ ), quando comparados aos pacientes com HFE do tipo selvagem. Também, os indivíduos saudáveis com mutação do gene HFE apresentaram nível de ferritina, em média, superior, aos indivíduos sem a mutação (FRT =  $288,70 \pm 120,40$  e  $131,8 \pm 88,27$ ng/mL, respectivamente) e essa diferença foi estatisticamente significativa ( $p=0.0054$ ).

Os níveis de malonaldeído e nitrito foram maiores nos pacientes com SF quando comparados aos outros dois grupos estudados. Comparando pacientes com SMD com e sem mutação, dentro do mesmo grupo, observou-se que houve diferença significativa somente no grupo de pacientes com SF ( $p=0.0273$ ). Embora os pacientes do grupo sem SF com mutação tenham apresentado médias superiores aos pacientes sem mutação, a diferença não alcançou significância estatística ( $p=0.2789$ ,  $p=0.6842$ , respectivamente).

Da mesma maneira, a atividade das enzimas antioxidantes SOD e catalase foram mais elevadas nos pacientes com SF quando comparados aos outros grupos estudados. No entanto, não foram observadas diferenças significativas ( $p=0.6376$  e  $0.0825$ , respectivamente) quando comparados pacientes com e sem mutação no mesmo grupo.

A atividade antioxidante da GPX foi superior nos pacientes com SF quando comparados aos outros indivíduos estudados. Nos pacientes com e sem SF e mutação, a atividade da GPX também foi maior quando comparados aos pacientes sem a mutação, com diferença significativa ( $p=0.0267$ ;  $p=0.0046$ , respectivamente).

O TNF $\alpha$  nos pacientes com SF foi maior que nos outros indivíduos estudados, no entanto esse aumento foi independente da mutação, uma vez que não foi observada diferença significativa nos pacientes dos grupos com e sem SF ( $p=0.2530$ ;  $p=0.2811$ ).

**Tabela 9** – Análises dos parâmetros laboratoriais entre os indivíduos saudáveis e portadores de SMD sem e com sobrecarga de ferro.

Grupos	Voluntários saudáveis	SMD sem SF	SMD com SF	
<b>Com mutação para o gene HFE</b>				
Parâmetros	n =05 (5,7%)	n =17 (29,3%)	n =07 (35%)	Valor de p
Hb (g/dL)	13,20 $\pm$ 1,29	9,52 $\pm$ 2,68	6,16 $\pm$ 1,44	<0.0001 <sup>1,2,3</sup>
FRT (ng/dL)	288,70 $\pm$ 120,40	518,6 $\pm$ 236,4	4.731 $\pm$ 3.684	<0.0001 <sup>1,2,3</sup>
MDA ( $\mu$ M)	5,413 $\pm$ 0,444	10,91 $\pm$ 4,651	14,85 $\pm$ 1,195	0.0079 <sup>1,2,3</sup>
Nitrito (nM)	0,7533 $\pm$ 0,1677	3,985 $\pm$ 1,978	9,150 $\pm$ 1,132	<0.0001 <sup>1,2,3</sup>
SOD (Ug/Hb)	1.624 $\pm$ 38,47	3.590 $\pm$ 563,1	5.334 $\pm$ 310,10	<0.0001 <sup>1,2,3</sup>
CAT (Ug/Hb)	17.485 $\pm$ 366,2	26.312 $\pm$ 3.669	30.506 $\pm$ 5.068	0.0005 <sup>1,2</sup>
GPx (Ug/Hb)	70,74 $\pm$ 4,29	91,16 $\pm$ 7,48	165,40 $\pm$ 15,27	<0.0001 <sup>1,2,3</sup>
IST (%)	28,40 $\pm$ 6,06	49,29 $\pm$ 21,75	92,14 $\pm$ 4,67	<0.0001 <sup>1,2,3</sup>
TNF $\alpha$ (pg/mL)	35,40 $\pm$ 16,11	50,53 $\pm$ 27,06	155,90 $\pm$ 198,70	0.0655
<b>Sem mutação para o gene HFE</b>				
Parâmetros	n =82 (94,3%)	n =41 (70,7%)	n =13 (65%)	Valor de p
Hb (g/dL)	13,37 $\pm$ 0,94	9,660 $\pm$ 3,25	6,353 $\pm$ 2,02	<0.0001 <sup>4,5</sup>
FRT (ng/dL)	131,8 $\pm$ 88,27	205,3 $\pm$ 139,7	1.883 $\pm$ 1.236	<0.0001 <sup>4,5,6</sup>
MDA ( $\mu$ M)	3,737 $\pm$ 1,247	9,592 $\pm$ 3,073	13,30 $\pm$ 1,227	<0.0001 <sup>4,5,6</sup>
Nitrito (nM)	0,3886 $\pm$ 0,1290	3,697 $\pm$ 2,171	5,635 $\pm$ 1,857	<0.0001 <sup>4,5,6</sup>
SOD (Ug/Hb)	1.605 $\pm$ 59,00	3.497 $\pm$ 603,8	4.850 $\pm$ 420,60	<0.0001 <sup>4,5,6</sup>
CAT (Ug/Hb)	16.576 $\pm$ 1.008	24.295 $\pm$ 3.669	25.888 $\pm$ 2.557	<0.0001 <sup>4,5,6</sup>
GPx (Ug/Hb)	60,13 $\pm$ 9,187	76,46 $\pm$ 17,73	144,50 $\pm$ 16,95	<0.0001 <sup>4,5,6</sup>
IST (%)	32,61 $\pm$ 8,929	42,73 $\pm$ 23,80	73,00 $\pm$ 23,75	<0.0001 <sup>4,5,6</sup>
TNF $\alpha$ (pg/mL)	31,73 $\pm$ 24,21	50,34 $\pm$ 44,50	117,70 $\pm$ 173,90	<0.0001 <sup>5,6</sup>

SMD (síndrome mielodisplástica); SF (sobrecarga de ferro); Hb (hemoglobina); FRT (ferritina); MDA (malonaldeído); SOD (superóxido dismutase); CAT (catalase); GPx (glutathione peroxidase); IST (índice de saturação da transferrina); TNF $\alpha$  (fator de necrose tumoral  $\alpha$ ). Resultados expressos em média  $\pm$  desvio padrão. Foi realizada análise de Variância (ANOVA), seguido do teste Kruskal-Wallis como *post hoc* teste.

<sup>1</sup>quando comparado portador de SMD sem sobrecarga e voluntários, com mutação HFE;

<sup>2</sup>quando comparado portador de SMD com sobrecarga e voluntários, com mutação HFE;

<sup>3</sup>quando comparado portador de SMD com e sem sobrecarga de ferro, com mutação HFE.

<sup>4</sup>quando comparado portador de SMD sem sobrecarga e voluntários, sem mutação HFE;

<sup>5</sup>quando comparado portador de SMD com sobrecarga e voluntários, sem mutação HFE;

<sup>6</sup>quando comparado portador de SMD com e sem sobrecarga de ferro, sem mutação HFE.

A **Tabela 10** detalha as análises laboratoriais dos pacientes com e sem mutação para o HFE, por grupo (com e sem SF).

**Tabela 10** – Avaliação laboratorial nos pacientes portadores de SMD, mutantes e não mutantes para o gene HFE.

Grupo	Parâmetros	Gene HFE sem mutação	Gene HFE com mutação	Valor de p
		n =41 (70,7%)	n =17 (29,3%)	
<b>SMD sem</b>	Hb (g/dL)	9,660 $\pm$ 3,25	9,529 $\pm$ 2,68	0.8843
	FRT (ng/dL)	205,3 $\pm$ 139,7	518,6 $\pm$ 236,4	<b>&lt;0.0001<sup>1</sup></b>
<b>Sobrecarga</b>	MDA ( $\mu$ M)	9,592 $\pm$ 3,073	10,91 $\pm$ 4,651	0.2789
	Nitrito (nM)	3,697 $\pm$ 2,171	3,985 $\pm$ 1,978	0.6842
<b>de Ferro</b>	SOD (Ug/Hb)	3497 $\pm$ 603,8	3590 $\pm$ 563,1	0.6376
	CAT (Ug/Hb)	24.295 $\pm$ 3.669	26.312 $\pm$ 3.669	0.0825
<b>(n =58)</b>	GPx(Ug/Hb)	76,46 $\pm$ 17,73	91,16 $\pm$ 7,48	<b>0.0046<sup>1</sup></b>
	IST (%)	42,73 $\pm$ 23,80	49,29 $\pm$ 21,75	0.3316
	TNF- $\alpha$ (pg/mL)	50,34 $\pm$ 44,50	50,53 $\pm$ 27,06	0.2530
Grupo	Parâmetros	n =13 (65%)	n =07 (35%)	Valor de p
	Hb (g/dL)	6,353 $\pm$ 2,02	6,161 $\pm$ 1,44	0.8278
	FRT (ng/dL)	1.883 $\pm$ 1.236	4.731 $\pm$ 3.684	<b>0.0189<sup>2</sup></b>
	MDA ( $\mu$ M)	13,30 $\pm$ 1,227	14,85 $\pm$ 1,195	<b>0.0273<sup>2</sup></b>
	Nitrito (nM)	5,635 $\pm$ 1,857	9,150 $\pm$ 1,132	<b>0.0010<sup>2</sup></b>

<b>SMD com</b>	SOD (Ug/Hb)	4.850 ± 420,60	5.334 ± 310,10	<b>0.0289<sup>2</sup></b>
<b>Sobrecarga</b>	CAT (Ug/Hb)	25.888 ± 2.557	30.506 ± 5.068	<b>0.0283<sup>2</sup></b>
	GPx(Ug/Hb)	144,50 ± 16,95	165,40 ± 15,27	<b>0.0267<sup>2</sup></b>
<b>de Ferro</b>	IST (%)	73,00 ± 23,75	92,14 ± 4,67	0.0515
<b>(n =20)</b>	TNF-α (pg/mL)	117,70 ± 173,90	155,90 ± 198,70	0.2811

SMD (*síndrome mielodisplástica*); SF (*sobrecarga de ferro*); Hb (*hemoglobina*); FRT (*ferritina*); MDA (*malonaldeído*); SOD (*superóxido dismutase*); CAT (*catalase*); GPx (*glutathione peroxidase*); IST (*índice de saturação da transferrina*); TNFα (*fator de necrose tumoral α*). Resultados expressos em média ± desvio padrão. Foram aplicados testes t-Student e Mann Whitney;

<sup>1</sup>quando comparados portadores de SMD sem sobrecarga de ferro, com e sem mutação do HFE.

<sup>2</sup>quando comparados portadores de SMD com sobrecarga de ferro, com e sem mutação do HFE.

DISCUSSÃO

## 5 DISCUSSÃO

As síndromes mielodisplásticas se caracterizam pela heterogeneidade biológica, morfológica e clínica. É considerada a condição hematológica mais comum em adultos, com incidência crescente com a idade, sendo mais frequente em indivíduos com idade superior a 60 anos.

No presente estudo, a maioria dos pacientes (64,4%) apresentou idade superior a 60 anos. A idade média dos portadores de SMD foi de 64,6 anos. Esses dados mostram que, apesar da SMD ser mais frequente na população de idosos, no Brasil a média de idade é inferior à relatada na maioria dos estudos americanos e europeus (MA X *et al.*, 2007; SEKERS, 2010; NEUKIRCHEN *et al.*, 2011), talvez uma consequência intrínseca da heterogeneidade genética da população brasileira ou uma consequência da exposição não controlada a fatores ambientais ocupacionais que contribuem para a patogênese de SMD.

Nos países ocidentais, a mediana de idade de pacientes com SMD ao diagnóstico é superior a 70 anos. Em estudos epidemiológicos realizados na Alemanha, França e nos Estados Unidos a mediana de idade encontrada foi de 71, 74 e 75 anos, respectivamente (GERMING *et al.*, 2004; NISSE *et al.*, 2001; MA X *et al.*, 2007). Estudos realizados em países asiáticos demonstraram que os pacientes são, no mínimo, 8 a 10 anos mais jovens do que nos países ocidentais. A mediana de idade é 59 anos em Taiwan (TIEN *et al.*, 1994), 60 no Japão (OGUMA *et al.*, 1995), 56 na Tailândia (INTRAGUMTORNCHAI *et al.*, 1998), 53 na Coreia (LEE *et al.*, 1999), 50 na China (ZHAO *et al.*, 2002) e 55 na Índia (DAKSHINAMURTHY *et al.*, 2005).

No Brasil, um país de dimensões continentais, dados sobre a epidemiologia da doença são escassos. Um registro retrospectivo de casos brasileiros, realizado no período de 2003-2007 analisou um total de 476 pacientes em 12 centros distribuídos pelas regiões Nordeste, Centro-Oeste, Sudeste e Sul. Embora não considerado representativo da população brasileira, observou-se uma mediana de idade de 68 anos (MAGALHÃES *et al.*, 2010).

A incidência da SMD é discretamente maior nos homens que nas mulheres (FARQUHAR; BOWEN, 2003). No presente estudo, a porcentagem de pacientes do sexo feminino com SMD foi de 50,5% com uma relação M/F de 1:1.02,

portanto, uma distribuição um pouco distinta do que é reportada na literatura por Oguma *et al.* (1995), Greenberg *et al.* (1997), Chen *et al.* (2005), Solé *et al.* (2005), Haase *et al.* (2007), Ma X *et al.* (2007), Neukirchen *et al.* (2011), mas semelhante àquela descrita por Magalhães *et al.* (2010), que mostraram, em pacientes brasileiros portadores de SMD, discreto predomínio do sexo feminino (50,8%) e por Ghoti *et al.* (2010) que apresentaram incidência de 63,15% do sexo feminino.

A média de idade dos pacientes foi de 76,3 anos para homens e 74,1 anos para mulheres. Os pacientes masculinos apresentaram a doença em idade mais avançada ou foram diagnosticados mais tardiamente, ao contrário do que foi demonstrado por Neukirchen *et al.* (2011), relato em que a média de idade foi de 69 e 78 anos para homens e mulheres, respectivamente.

O Brasil ocupa hoje a terceira posição no ranking dos maiores produtores agrícolas do mundo e é líder no consumo de agrotóxicos (ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE SAÚDE COLETIVA - ABRASCO), 2012). Os dados do censo agropecuário de 2006 demonstram o uso exacerbado de agrotóxico em todo o país. Apesar de o Ceará ser o quarto maior usuário de agrotóxicos do Brasil e o primeiro do Nordeste (IBGE 2009), não foi possível inferir qualquer relação entre exposição ocupacional e incidência da doença, uma vez que somente 32,7% dos pacientes advinham do interior no qual o uso de agrotóxico é mais frequente. Além do que, pelo caráter retrospectivo desse levantamento, apenas 25% dos prontuários registraram dados sobre exposição à carcinógenos.

A presença de 67,3% de pacientes provenientes de zona urbana chamou atenção. É possível que os pacientes cadastrem nos seus registros o endereço de amigos ou parentes da capital. No entanto, é preocupante a possibilidade da subnotificação e ainda de que grande parte dos pacientes da zona rural não tenham acesso aos centros de referência e, portanto, não tenham diagnóstico ou tratamento adequados.

A maioria dos pacientes (94,1%) foi diagnosticada como SMD primária e apenas 5,9% representavam a SMD secundária, sendo este número um pouco inferior ao relatado na literatura, que é em torno de 10%. Neukirchen *et al.* (2011) e Sekeres *et al.* (2008) relataram uma frequência de 9,2% e 10% de casos secundários, respectivamente.

Quanto à classificação da OMS, os resultados aqui obtidos se assemelham ao estudo apresentado por Haase *et al.* (2007) que mostrou uma



predominância de SMD de baixo risco (82% dos casos) nos países ocidentais, com maior prevalência dos subtipos AR, ARSA e CRDM. O subtipo predominante nesse estudo foi CRDM (61,4%). No registro de casos brasileiros, também o subtipo predominante foi CRDM (40,6%) de acordo com a classificação da OMS e AR (56,7%) de acordo com da FAB. (Magalhães *et al.* 2010). Estudos de Düsseldorf, um centro alemão de referência, revelaram frequência significativamente maior de subtipos OMS de alto risco (AREB-1 e AREB-2) em pacientes do sexo masculino (NEUKIRCHEN *et al.*, 2011), o que também foi constatado na série aqui estudada, com uma frequência de 58,3% nos pacientes masculinos e 41,7% nos pacientes femininos.

A anemia severa é um importante fator de morbidade e mortalidade, principalmente devido ao aumento de risco de doença cardíaca. Apesar de relatos discrepantes na prevalência de doença cardíaca, esses eventos foram identificados como uma importante comorbidade extra-hematológica e causa de morte em SMD (MALCOVATI *et al.* 2011). O estudo recente de Castro *et al.* (2012) mostrou uma forte correlação entre os baixos níveis de hemoglobina e marcadores pré-clínicos de lesão cardíaca. Sessenta e três (62,4%) pacientes aqui avaliados apresentaram hemoglobina  $\leq 10\text{g/dL}$ , sendo 52,4% do sexo masculino e 47,6% do sexo feminino, semelhante ao relatado por Ghoti *et al.* (2010).

A neutropenia e plaquetopenia foram observadas em 68,3% e 52,5% dos casos, respectivamente, e ambas foram observadas em maior proporção nos pacientes masculinos (56,5% e 58,5%, respectivamente), corroborando com o achado de Magalhães *et al.* (2013), de que a doença é diagnosticada em fase mais avançada nesses pacientes.

A frequência de medula hipocelular (28%) observada nesse estudo foi maior do que a descrita na literatura (10 - 20% dos casos) (CATENACCI; SCHILLER, 2005; GERMING *et al.*, 2008; DELLA PORTA *et al.*, 2009), porém condiz com estudos nacionais, que relatam frequência aproximada de 25% (LORAND-METZE *et al.*, 2004, VASSALLO; MAGALHÃES, 2009). É possível que, novamente, características populacionais e geográficas respondam por essas diferenças.

A análise do cariótipo é fundamental para o diagnóstico, indicador de prognóstico importante para a sobrevida e risco de transformação leucêmica e para a decisão terapêutica de pacientes com SMD. Dentre os pacientes com metáfases analisadas, observou-se que 52,1% dos pacientes apresentaram cariótipo normal e

em 47,9% pelo menos uma alteração foi detectada, estando de acordo com os estudos em SMD *de novo* de Dakshunamurthy *et al.* (2005) e Haase *et al.* (2007). Esse dado foi superior aos estudos nacionais publicados por Romeo *et al.* (2002) e Pinheiro, Chauffaille, (2009), nos quais foi observada uma frequência de 35,2% e 20,5% de alterações citogenéticas, respectivamente.

As deleções do braço longo do cromossomo 5 são as alterações mais frequentemente encontradas (HIRAI, 2003; HAASE, 2008). Os dados desse estudo comprovam a elevada prevalência de alterações envolvendo o braço longo do cromossomo 5 (38,3%) nos pacientes com alguma alteração citogenética clonal e em 18,3% de todos os pacientes com análise citogenética disponível. Achados semelhante aos observados por Magalhães *et al.* (2013) e superiores aos relatados por Haase *et al.* (2007) que encontraram del(5q) em 30% dos casos com cariótipo alterado e em 14% dos pacientes com análises cariotípicas. Mauritzson *et al.* (2002) e Romeo *et al.* (2002) observaram uma frequência de deleção da região 5q de 25% e 33,3%, respectivamente, entre os pacientes com qualquer alteração citogenética.

A alteração envolvendo o cromossomo 7 (-7/7q-) é descrita com frequência que varia de 11,1% a 17% (HAASE *et al.*, 2007). Na série aqui avaliada a frequência da alteração citogenética do cromossomo 11 (-11/11q-) foi 8,8%, diferente daquela relatada por Mauritzson *et al.* (2002) e Nösslinger *et al.* (2001) que observaram frequência de 2,5% e 1,1% respectivamente. A frequência de alterações do cromossomo 17 (-17/17p-), de 8,8% do total de pacientes com alteração citogenética, foi bem superior às descritas por Haase *et al.* (2007) e Bernasconi *et al.* (2008), que relataram frequências em torno de 5% (do total de pacientes com alteração citogenética) e 1,2% (do total de pacientes com SMD), respectivamente.

Dessa forma como descrito por outros autores, as alterações cromossômicas aqui encontradas foram predominantemente não balanceadas, sobretudo aquelas envolvendo o cromossomo 7 (-7/7q-), cromossomo 17 (-17/17p-) e principalmente perda da região 5q (5q-) (SOLÉ *et al.*, 2005; HAASE *et al.*, 2007; PEDERSEN-BJERGAARD; ANDERSEN; ANDERSEN, 2007; BERNASCONI *et al.*, 2008; HAASE, 2008). Esses fatores, possivelmente, contribuíram para a alta prevalência dos grupos de mais baixo risco na população estudada.

Variações nas frequências das alterações citogenéticas são relatadas como uma possível associação aos diferentes perfis étnicos da população estudada. As alterações isoladas do cromossomo 5 (-5/5q-) e 7 (-7/7q-) são mais frequentes

(variando entre 12,8%-23,1% e 3,1%-19,4%, respectivamente) nos países ocidentais do que nos países orientais nos quais representam um menor grupo de casos (CHEN *et al.*, 2005).

A frequência de cariótipos considerados de prognóstico favorável foi de 67,6% e de prognóstico desfavorável (9,9%) nos pacientes aqui avaliados. Greenberg *et al.* (1997) relataram frequência de 70% e 16%, respectivamente.

Magalhães *et al.* (2010) revelaram que 83,2% dos pacientes brasileiros foram classificados pelo IPSS como de baixo risco. Da mesma forma, nesse estudo 60,4% foram classificados como de baixo risco, sendo mais comum o subtipo intermediário-I (40,6%). Algumas diferenças foram observadas com relação à distribuição. O sexo masculino representou 61% do intermediário-1 e 83,3% do alto risco (alto + intermediário-2), sugerindo que a doença parece ter apresentação mais avançada nos pacientes masculinos ou o diagnóstico mais tardio, visto que esses pacientes apresentaram idade maior ao diagnóstico.

Em resumo, os pacientes do sexo masculino apresentaram idade mais avançada, maior número de citopenias, menor dosagem de hemoglobina, menor contagem de neutrófilos e de plaquetas, maior número de unidades transfundidas e IPSS de prognóstico mais desfavorável.

Ao se compararem características laboratoriais entre os grupos observou-se que a avaliação seriada dos parâmetros de SF (ferritina, ferro sérico e o índice de saturação da transferrina) revelou aumento significativo nos pacientes com SMD, quando comparados aos controles, o que se justifica pelo quadro de maior absorção intestinal de ferro secundária à eritropoese ineficaz associada à dependência transfusional. Esses dados são similares a outros estudos em SMD (ARMAND *et al.*, 2007; SANZ *et al.*, 2008; LIST, 2010; DELFORGE *et al.*, 2011; LIST *et al.*, 2012; GATTERMANN *et al.*, 2012; DE SOUZA *et al.*, 2013) e em outras doenças hematológicas (BELINI JUNIOR *et al.*, 2012; SANTOS, *et al.*, 2012; BARBOSA *et al.*, 2013).

As reações catalíticas favorecem a formação de radicais livres que promovem a oxidação espontânea dos ácidos graxos insaturados nas membranas celulares, principalmente na presença do ferro, causando peroxidação lipídica, e eventual lesão orgânica (FILLET; BEGUIN; BALDELLI, 1989). Os resultados deste estudo revelaram um aumento significativo nos níveis das enzimas ALT, AST e LDH nos portadores de SMD e SF quando comparados aos outros indivíduos estudados,

sugerindo um quadro clínico de maior toxicidade nestes doentes. Excesso de ferro no parênquima hepático pode desencadear e exacerbar a formação de colágeno e de fibrose, podendo evoluir para cirrose nos casos mais graves (KUSHNER; PORTER; OLIVIERI, 2001; TAKATOKU *et al.*, 2007; GATTERMANN, 2012; BARBOSA *et al.*, 2013; COSTA-MATOS *et al.*, 2013).

Na SMD a LDH foi considerada, através de análise multivariada, um fator de prognóstico independente e dinâmico, utilizado na estratificação de risco e no seguimento para detecção precoce de progressão (WIMAZAL, 2007). A elevação significativa dessa enzima observada nos pacientes com SF transfusional pode ter sido decorrência do excesso de ferro livre que favorece a formação de radicais livres e estresse oxidativo.

Em indivíduos normais o ácido úrico em excesso produz urato que leva à formação de cristais, atuando como pró-oxidante (REES; WILLIAMS; GLADWIN, 2011). Na presença de SF pode atuar como antioxidante por sua capacidade de quelar metais de transição (NAOUM, 2006). Nos pacientes com SF níveis significativamente menores de ácido úrico foram observados. É possível que isso represente um efeito protetor nesses pacientes expostos ao excesso de ferro.

Existe uma correlação positiva entre idade avançada e acumulação irreversível do estresse oxidativo (NOHL, 1993; GUO; HEYDARI; RICHARDSON, 1998; FINKEL; HOLBROOK, 2000; HAMILTON *et al.*, 2001). A exposição cumulativa a agentes oxidantes exógenos, assim como aos subprodutos dos processos metabólicos intracelulares leva à acumulação progressiva e dano oxidativo muitas vezes irreversível, além do que, o balanço de radicais livres sofre influências genéticas, ambientais, nutricionais e culturais (tabagismo, alcoolismo), o que é um complicador adicional (VASCONCELOS *et al.*, 2007).

Na série aqui estudada, os níveis dos produtos secundários da peroxidação lipídica, MDA e nitrito, foram significativamente maiores nos pacientes com sobrecarga de ferro transfusional. Esses dados estão de acordo com estudo de Saigo *et al.*, 2011 no qual 40 pacientes com SMD e SF foram analisados e um aumento significativo de marcadores de estresse, através de dosagens dos metabolitos derivados do oxigênio (teste dROM) e dos produtos de íons férrico e ferroso (FRAS) foi observado. Ghoti *et al.* (2010) também demonstraram, em 19 pacientes com SMD e SF transfusional, um aumento de espécies reativas derivadas de oxigênio e elevação significativa da peroxidação lipídica em eritrócitos. Outros

autores encontraram marcadores de estresse oxidativo em níveis significativamente elevados em indivíduos com SMD e sobrecarga de ferro transfusional, juntamente com anormalidades nos níveis das enzimas antioxidantes (FARQUHAR; BOWEN, 2003; GATTERMANN; RACHMILEWITZ, 2011).

A elevação do estresse oxidativo decorrente da SF pode dirigir um ciclo de instabilidade genômica que leva a quebras das cadeias duplas, erros de reparação, resultando em dano no DNA nuclear e mitocondrial, contribuindo, assim, para instabilidade genômica, evolução clonal, progressão e leucemia aguda (SALLMYR; FAN; RASSOUL, 2008). Além do aumento do estresse oxidativo, a capacidade prejudicada de reparo do DNA pode contribuir para o dano oxidativo irreversível do DNA (GATTERMANN; RACHMILEWITZ, 2011; RIBEIRO JUNIOR, 2013).

A célula possui sistemas enzimáticos específicos capazes de reduzir e neutralizar os radicais livres que podem atuar em duas linhas, detoxificando o agente antes que ele cause lesão (SOD, GPx e GSH reduzida) ou reparando a lesão já ocorrida (GPx e GSH redutase) (FERREIRA; MATSUBARA, 1997).

A SOD participa da primeira linha de defesa, catalisando a dismutação do ânion superóxido em peróxido de oxigênio, antioxidante (VASCONCELOS *et al.*, 2007). No presente estudo foi observado aumento na atividade da enzima SOD nos portadores de SMD, sobretudo em pacientes com SF quando comparados aos controles, o que pode ter ocorrido como resposta compensatória ao estresse oxidativo aumentado nesse grupo.

A CAT e a GPx, enzimas antioxidantes da segunda linha de defesa, mostraram-se também elevadas nos pacientes com sobrecarga de ferro quando comparados aos outros indivíduos avaliados. A CAT desempenha um papel importante na resposta adaptativa da célula e na aquisição de tolerância ao estresse oxidativo (GADJEVA; KUCHUKOVA; GEORGIEVA, 2005; HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007). O excesso de ferro e minerais como, cobre, zinco, manganês e selênio medeiam a atividade da GPx (CETIN *et al.*, 2004). Os achados de aumento significativo da atividade dessa enzima nos pacientes com SF corrobora com essa afirmação.

Naoum (2006) evidenciou elevação das atividades das enzimas antioxidantes em pacientes com sobrecarga de ferro, sugerindo um mecanismo compensatório ao aumento da produção de radicais livres. Uma correlação positiva

entre aumento das enzimas antioxidantes e sobrecarga de ferro foi observada. Diferentemente, Ghoti *et al.* (2010), encontraram o antioxidante GSH abaixo do valor de referência em pacientes com SMD e sobrecarga de ferro, sugerindo que haveria um “consumo” da defesa antioxidante não enzimática. É importante ressaltar que estudos relacionados ao estresse oxidativo apresentam resultados discrepantes ao avaliar a atividade antioxidante. Alguns demonstram valores aumentados, enquanto outros diminuídos ou, às vezes, sem diferença significativa. É possível que estas divergências ocorram devido a diferenças nas técnicas de medição, diferenças nos tipos de amostra a ser testada (células vermelhas, plasma ou soro) ou ainda devido à inclusão de pacientes em diferentes estágios da doença, origem étnica, estilo de vida (uso de álcool, fumo) e hábitos alimentares (RANJEKAR *et al.*, 2003; NG *et al.*, 2008). Mesmo na presença de grande quantidade de antioxidantes dentro das células, os fatores oxidantes podem superar essas defesas, causando lesões teciduais. Assim é possível que um antioxidante atue como protetor em determinado sistema, mas falhe na proteção de outros tecidos ou facilite a progressão das lesões induzidas (BIANCHI, ANTUNES, 1999; HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007; VASCONCELOS *et al.*, 2007).

Ghoti *et al.* (2007) encontraram correlação positiva ( $r = 0.60$ ) entre as concentrações de ferritina sérica e espécies reativas derivadas de oxigênio em pacientes com sobrecarga de ferro. No presente estudo os marcadores da peroxidação lipídica, MDA e nitrito, também apresentaram uma correlação positiva, direta, com os níveis de ferritina sérica. Uma correlação linear foi observada entre os marcadores do estresse oxidativo estudados, MDA e nitrito. As atividades das enzimas antioxidantes SOD, GPx e CAT também foram correlacionadas diretamente à sobrecarga de ferro. Esses achados estão condizentes com uma relação estabelecida entre, anemia, sobrecarga de ferro e estresse oxidativo (NAOUM, 2006; GHOTI *et al.*, 2007, 2010; GATTERMANN; RACHMILEWITZ, 2011; SAIGO *et al.*, 2011; GATTERMANN, 2012).

Esses marcadores são importantes para redução da morbidade e mortalidade. Além do que, foi demonstrado que há uma correlação inversa entre a resposta hematológica, concentração de ferro e intensidade do estresse oxidativo, uma vez que concentrações elevadas de EROs reduzem a sobrevivência de células hematopoéticas (BRADLEY *et al.*, 1997).

A terapia quelante está indicada em casos de sobrecarga de ferro em pacientes de baixo risco, com expectativa de vida superior a um ano e naqueles candidatos ao transplante de medula óssea. São benefícios esperados da quelação adequada, a menor incidência de eventos cardíacos, diabetes e disfunção hepática, melhora da função hematopoética, diminuição no risco de progressão para leucemia aguda e melhora da sobrevida global. A análise *post-hoc* de uma série de 341 pacientes mostrou melhora hematológica eritróide, em plaquetas e em neutrófilos em 21,5%, 13% e 22% respectivamente. O tempo médio de resposta foi 109, 169 e 226 dias, respectivamente. A redução dos níveis séricos de ferritina foi maior nos pacientes que apresentaram melhora hematológica. Entre os prováveis mecanismos implicados está a redução do estresse oxidativo e de seu efeito tóxico e inibitório sobre a hematopoese (GATTERMANN *et al.*, 2012). Tendo em vista a associação entre estresse oxidativo e sobrecarga de ferro é razoável supor que uma associação entre quelante e antioxidante possa aumentar ou potencializar a resposta hematológica.

Foi observada uma correlação entre os valores da ferritina sérica ( $r=0.3193$ ,  $p=0.0049$ ) e a enzima ALT, marcador de necrose hepática. Venturini *et al.* (2010) demonstraram essa associação em pacientes com hepatite C, o que comprova a disfunção hepática crônica, complicação comum em pacientes sabidamente com sobrecarga de ferro.

O TNF $\alpha$  e o estresse oxidativo, em decorrência da exarcebação de produção de espécies reativas estão descritos na literatura como fatores implicados na patogênese de SMD e progressão para leucemia (ROSENFELD; LIST, 2000; HUSSAIN; HOFSETH; HARRIS, 2003; MALCOVATI, 2007; SAIGO *et al.*, 2011).

O TNF $\alpha$  e o estresse oxidativo são fatores implicados na patogênese de SMD e progressão para leucemia (ROSENFELD; LIST, 2000; HUSSAIN; HOFSETH; HARRIS, 2003; MALCOVATI, 2007; SAIGO *et al.*, 2011). Níveis elevados de TNF- $\alpha$  tem papel na formação de espécies reativas derivadas de oxigênio, levando à instabilidade genômica, danos no DNA e mutações adicionais (ROSENFELD; LIST, 2000; FARQUHAR; BOWEN, 2003; HUSSAIN; HOFSETH; HARRIS, 2003; MALCOVATI, 2007; SAIGO *et al.*, 2011; ZHANG *et al.*, 2013). Além disso, em pacientes portadores de SMD, podem promover a apoptose de células hematopoéticas, contribuindo para o quadro de hematopoese ineficaz e citopenias encontradas no sangue periférico (SHETTY *et al.*, 2000).

Nos portadores de SMD e SF houve um aumento significativo do TNF $\alpha$  plasmático, quando comparados aos indivíduos saudáveis. Estudos de Verhoef *et al.* (1992), Allampallam *et al.* (2002) e Zhang *et al.* (2013), mostraram concentrações elevadas de TNF $\alpha$  no plasma e medula óssea de pacientes com SMD. Em outras doenças hematológicas também foi demonstrada uma elevação desta citocina (MALAVE *et al.*, 1993; PATHARE *et al.*, 2004; CERQUEIRA *et al.*, 2011). Foi observada uma correlação direta e significativa entre TNF $\alpha$  e ferritina sérica. Esses achados contribuem para a possibilidade de benefícios também na associação entre quelantes e drogas com efeito inibitório do TNF $\alpha$ .

Vários estudos têm sido realizados para avaliar a frequência das mutações do gene HFE em diferentes populações. Entretanto, no Brasil nenhum relato que avalie os efeitos dessa mutação sobre a sobrecarga de ferro decorrente da dependência transfusional em pacientes com SMD foi encontrado. É razoável supor que a presença da mutação constitui um fator adicional agravante nesses pacientes portadores de anemia dependente de transfusão.

A mutação C282Y é observada em quase 80% dos indivíduos com manifestações clínicas de HH e os outros pacientes com a doença, na sua maioria, apresentam genótipo composto heterozigótico (C282Y/H63D) (BEUTLER, 2004; SIAH *et al.*, 2006; SANTOS, *et al.*, 2012). No Brasil essa mutação apresenta distribuição heterogênea. É rara na região norte do país (TORRES *et al.*, 2008) enquanto na região sudeste foram descritas frequências entre 1,1% e 2,1% em doadores de sangue (SANTOS *et al.*, 2008). Por sua vez, a mutação H63D é relativamente frequente, não sendo observada diferença significativa entre as frequências na forma heterozigótica em portadores de malária e doadores de sangue da região norte (SANTOS *et al.*, 2008).

Neste trabalho, 165 indivíduos foram avaliados para a pesquisa de mutação no gene HFE. Pelo menos uma mutação foi identificada em 30,8% dos portadores de SMD e em 5,75% dos idosos saudáveis, a maioria em heterozigose. Dados semelhantes foram observados por Altes *et al.* (2003), que verificaram em 29,0% a mutação do gene HFE, quando analisaram 150 pacientes com evidência de sobrecarga de ferro por meio de parâmetros bioquímicos.

Na série de pacientes com sobrecarga de ferro, 35% foram identificados com pelo menos uma mutação do gene HFE, sendo 71,4% do sexo masculino. No estudo de Viana-Baracioli *et al.* (2012) em 28 pacientes com anemia falciforme e SF,



a presença de pelo menos um dos polimorfismos no gene HFE foi observada em 28,6% dos pacientes, sendo 50% do sexo masculino.

Os pacientes portadores de SMD e SF apresentaram frequência de 5% para dupla heterozigose (C282Y/H63D), semelhante ao estudo de Pietrangelo (2010), que demonstrou frequência para esse genótipo de 5% e superior a Adams *et al.* (2005) que observaram frequência de 2% para heterozigotos compostos. Estudos de Viana-Baracioli *et al.* (2012) e de Altes *et al.* (2003) observaram frequências para o genótipo heterozigotos compostos superiores ao relatado na serie aqui estudada, de 7,14% e 9,5%, respectivamente.

Os dados do presente estudo mostraram que 59,30% dos pacientes apresentaram a mutação para o H63D, 10,2% na condição de homozigose (H63D/H63D) e 49,10% em heterozigose (H63D/WT). Viana-Baracioli *et al.* (2012) observaram o genótipo em heterozigose (H63D/Wt) somente em 6 (21,43%) pacientes com anemia falciforme. No grupo com SF a frequência para o H63D foi de 30,0%, 5% em homozigose (H63D/H63D) e 25% em heterozigose (H63D/Wt), superior ao relato de LIST *et al.* (2012) que avaliaram 94 portadores de SMD para mutação do gene HFE e observaram frequência de 25,5% para H63D. Esses achados associados a condições patológicas capazes de alterar o metabolismo do ferro podem desempenhar papel importante na predisposição ao acúmulo patológico de ferro (PIETRANGELO, 2004, 2006, 2009, 2010).

No atual estudo foram observadas frequências alélicas para o C282Y de 2,50% nos pacientes com SF e para o H63D de 3,05% nos idosos saudáveis e de 17,5% nos pacientes com SF. Viana-Baracioli *et al.* (2012) observaram entre os pacientes com doença falciforme frequência alélica para o alelo C282Y de 3,5% e para o H63D de 10,7%. Alguns estudos analisaram população de indivíduos saudáveis. Santos *et al.* (2008) e Terada *et al.* (2009) relataram frequências do alelo C282Y de 1,1% e 2,1%, em doadores de sangue brasileiros, respectivamente. Para o alelo H63D, Santos *et al.* (2008) encontraram frequência de 13,8%. Viana-Baracioli *et al.* (2012) observaram em doadores de sangue frequência alélica para o C282Y de 2,1% e para o H63D de 13,4 %.

A baixa frequência da mutação C282Y, 3 a 8 vezes menor em brasileiros quando comparados aos caucasianos do norte da Europa, reforça a tese de uma menor dispersão dessa mutação. Provavelmente essa diferença se deve à diversidade étnica da população brasileira. A frequência alélica da mutação H63D

parece ser semelhante entre essas duas populações (AGOSTINHO *et al.*, 1999; SANTOS *et al.*, 2012).

Vários estudos relataram frequência de heterozigotos para a mutação S65C entre 0,4% e 2,1% (LIST *et al.*, 2012, SANTOS *et al.*, 2012). Diferentemente, neste estudo não foi encontrada essa mutação nos grupos avaliados.

Desta forma, observou-se que pode haver uma ampla variação na frequência da mutação do gene HFE, especificamente da mutação C282Y dependendo não apenas da população estudada, mas também dos critérios adotados na seleção da amostra e dos critérios utilizados para o diagnóstico de sobrecarga de ferro. Quando o critério inclui o diagnóstico histológico de sobrecarga em amostras pré-selecionadas, a frequência dessa mutação é maior quando comparada àquela observada quando os doentes são selecionados aleatoriamente, a partir de parâmetros bioquímicos de sobrecarga de ferro (BRADLEY; HADDOW; PALOMAKI, 1996; BACON *et al.*, 1999a; BRANDHAGEN *et al.*, 2000)

A elevada frequência da mutação do gene HFE frente a pouca evidência clínica e/ou laboratorial de sobrecarga de ferro levou à observação de penetrância incompleta do gene mutante, o que pode ser explicado pela flutuação do alelo, atribuído ao constante movimento, migração e a mistura das populações (BONINI-DOMINGOS, 2006; VIANA-BARACIOLI *et al.*, 2012). Os estudos brasileiros envolvendo esse gene ocorrem com um pequeno número de participantes. Análises multicêntricas são necessárias para definir melhor a população com relação à mutação do gene HFE.

Quando se correlacionou genótipo e parâmetros laboratoriais observou-se que todos os indivíduos com a mutação (controles e pacientes), apresentaram ferritina significativamente maior àqueles com ausência da mutação. A presença da mutação no gene HFE indica a existência de alteração genética relacionada à hemocromatose e maior predisposição do doente em desenvolver o fenótipo de sobrecarga, entretanto, não é suficiente para o diagnóstico de HH (BACON, 2001; BEUTLER, 2003).

Quando se analisaram os valores de MDA e nitrito observou-se que nos pacientes com SF os valores foram significativamente maiores, fato que se mostrou independente da presença da mutação do gene HFE. No grupo de pacientes sem SF não se observou diferença significativa, quando se compararam os pacientes

mutantes e não mutantes. Não ficou demonstrada, portanto a influência da mutação nos parâmetros do estresse oxidativo, talvez devido ao tamanho da amostra.

Os valores obtidos das atividades das enzimas antioxidantes, SOD, CAT e GPx, foram significativamente mais elevadas nos pacientes com SF, indicando que o aumento da peroxidação lipídica foi seguido do aumento da capacidade antioxidante. Para as atividades da SOD e CAT observou-se somente diferença significativa quando comparados pacientes com SF, mutantes e não mutantes, que justifica a não influência da mutação nessas variáveis.

Diferentemente, para a atividade da GPx foi observada uma diferença significativa quando comparados os dois grupos de pacientes, com e sem SF, com presença ou não da mutação. Acredita-se que essa variação observada esteja mais ligada à presença da SF transfusional do que à presença da mutação no gene HFE. Este fato isolado necessita de mais estudos para posterior confirmação, uma vez que somente esse parâmetro mostrou relação com a mutação do gene HFE nesses pacientes. A atividade da enzima GPx atua nos dois momentos, antes da lesão e no reparo da lesão já ocorrida, o que pode justificar o aumento da atividade dessa enzima nos pacientes, sem e com a mutação do gene HFE.

Os resultados deste estudo revelaram uma relação direta entre a sobrecarga de ferro, níveis elevados de TNF- $\alpha$  e marcadores de estresse oxidativo. Embora a compreensão destes efeitos aguarde estudos posteriores é consenso que a SF deve ser monitorada e gerenciada em um grupo selecionado de pacientes com base na estratificação de risco, expectativa de vida, sobrecarga de ferro e necessidade transfusional. Seria razoável a hipótese de que a presença da mutação no gene HFE poderia contribuir para um aumento dos valores séricos de MDA e nitrito. No entanto, a análise estatística não mostrou diferença significativa quando os pacientes com e sem mutação foram comparados, provavelmente devido ao tamanho da amostra.

Esses dados apontam para a necessidade de adoção de medidas profiláticas e terapêuticas para a sobrecarga de ferro e estresse oxidativo na SMD. O diagnóstico precoce e tratamento podem impedir ou retardar o desenvolvimento de complicações clínicas relacionadas à toxicidade pelo excesso de ferro e dão suporte para possíveis associações terapêuticas no tratamento quelante.

CONCLUSÕES

## 6 CONCLUSÕES

**1-** A síndrome mielodisplástica foi mais frequente em mulheres. A mediana de idade foi semelhante à reportada em casos brasileiros, superior aos asiáticos e inferior aos europeus e americanos. A doença apresentou-se mais tardiamente no sexo masculino e com mais critérios de gravidade e de pior evolução. A frequência da del(5q) foi mais elevada que em outras séries relatadas.

**2-** Aumento nos níveis das enzimas ALT, AST e LDH foi detectado nos portadores de SMD com SF, sugerindo maior toxicidade pelo excesso de ferro nestes doentes. Os níveis de ácido úrico se encontraram reduzidos significativamente, possivelmente pela sua ação antioxidante de quelar metais de transição, exercendo um efeito protetor.

**3-** Os marcadores da peroxidação lipídica apresentaram correlação positiva, direta com sobrecarga de ferro. Houve correlação linear entre os marcadores do estresse oxidativo, MDA e nitrito. As enzimas antioxidantes (SOD, CAT e GPx) foram correlacionadas diretamente à sobrecarga de ferro. Esses dados sugerem possível benefício da associação com agentes antioxidantes na terapia quelante.

**4-** A frequência da mutação do gene HFE foi maior nos pacientes que nos controles. Todos os indivíduos com a mutação do gene HFE apresentaram nível de ferritina significativamente superior aos outros indivíduos sem a mutação.

**5-** Comprovou-se aumento significativo do nível de TNF- $\alpha$  nos portadores de SMD e correlação direta com sobrecarga de ferro. Esses dados sugerem possível benefício da associação com agentes inibidores do TNF- $\alpha$  na terapia quelante

**6-** Tanto os marcadores do estresse oxidativo, como as enzimas antioxidantes foram superiores nos pacientes com sobrecarga de ferro, independente da presença da mutação do gene HFE, mostrando que o estresse oxidativo observado decorreu da dependência transfusional, não constituindo a mutação do gene HFE um fator adicional para evolução do quadro clínico.

# REFERÊNCIAS

## REFERÊNCIAS

- ADAMS, P. C.; REBOUSSIN, D. M.; BARTON, J. C.; MCLAREN, C. E.; ECKFELDT, J. H.; MCLAREN, G. D.; DAWKINS, F. W.; ACTON, R. T.; HARRIS, E. L.; GORDEUK, V. R.; LEIENDECKER-FOSTER, C.; SPEECHLEY, M.; SNIVELY, B. M.; HOLUP, J. L.; THOMSON, E.; SHOLINSKY, P. Hemochromatosis and iron-overload screening in a racially diverse population. **N. Engl. J. Med.**, v. 352, n. 17, p. 1769-1778, 2005.
- AEBI, H. Catalase in vitro. **Meth. Enzimol.**, v. 105, p. 121-126, 1984.
- AGOSTINHO, M. F.; ARRUDA, V. R.; BASSERES, D. S.; BORDIN, S.; SOARES, M. C.; MENEZES, R. C.; COSTA, F. F.; SAAD, S. T. Mutation analysis of the HFE gene in Brazilian populations. **Blood Cells Mol. Dis.**, v. 25, n. 5-6, p. 324-327, 1999.
- ALESSANDRINO, E. P.; AMADORI, S.; BAROSI, G.; CAZZOLA, M.; GROSSI, A.; LIBERATO, L. N.; LOCATELLI, F.; MARCHETTI, M.; MORRA, E.; REBULLA, P.; VISANI, G.; TURA, S. Evidence- and consensus-based practice guidelines for the therapy of primary myelodysplastic syndromes. A statement from the Italian Society of Hematology. **Haematologica**, v. 87, n. 12, p. 1286-1306, 2002.
- ALESSANDRINO, E. P.; DELLA PORTA, M. G.; BACIGALUPO, A.; VAN LINT, M. T.; FALDA, M.; ONIDA, F.; BERNARDI, M.; IORI, A. P.; RAMBALDI, A.; CERRETTI, R.; MARENCO, P.; PIOLTELLI, P.; MALCOVATI, L.; PASCUTTO, C.; ONETO, R.; FANIN, R.; BOSI, A. WHO classification and WPSS predict posttransplantation outcome in patients with myelodysplastic syndrome: a study from the Gruppo Italiano Trapiantodi Midollo Osseo (GITMO). **Blood**, v. 112, n. 3, p. 895-902, 2008.
- ALLAMPALLAM, K.; SHETTY, V.; MUNDLE, S.; DUTT, D.; KRAVITZ, H.; REDDY, P. L.; ALVI, S.; GALILI, N.; SABERWAL, G. S.; ANTHWAL, S.; SHAIKH, M. W.; YORK, A.; RAZA, A. Biological significance of proliferation, apoptosis, cytokines, and monocyte/macrophage cell in bone marrow biopsies of 145 patients with myelodysplastic syndrome. **Int. J. Hematol.**, v. 75, n. 3, p. 289-297, 2002.
- ALTES, A.; REMACHA, A. F.; SUREDA, A.; MARTINO, R.; BRIONES, J.; BRUNET, S.; BAIGET, M.; SIERRA, J. Patients with biochemical iron overload: causes and characteristics of a cohort of 150 cases. **Ann. Hematol.**, v. 82, n. 2, p. 127-130, 2003.
- ANDERSON, G. J.; POWEL, L. W. *HFE* and non-*HFE* hemochromatosis. **Int. J. Hematol.**, v. 76, n. 3, p. 203-207, 2002.
- ANDREWS, N. C. Disorders of iron metabolism. **N. Engl. J. Med.**, v. 341, n. 26, p. 1986-1995, 1999.
- ARMAND, P.; KIM, H. T.; CUTLER, C. S.; HO, V. T.; KORETH, J.; ALYEA, E. P.; SOIFFER, R. J.; ANTIN, J. H. Prognostic impact of elevated pre transplantation serum ferritin in patient undergoing myeloablative stem cell transplantation. **Blood**, v. 109, n. 10, p. 4586-4588, 2007.

ARMSTRONG, D. (Ed.). **Free radical and antioxidant protocols**: methods in molecular biology. New Jersey: Humana Press; 1998.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE SAÚDE COLETIVA (ABRASCO). Dossiê da ABRASCO. **Um alerta sobre os impactos dos agrotóxicos na saúde**. Parte 1. Agrotóxicos, segurança alimentar e nutricional e saúde. Rio de Janeiro: ABRASCO, 2012.

BACON, B. R. Hemochromatosis: diagnosis and management. **Gastroenterology**, v. 120, p. 718-725, 2001.

BACON, B. R.; OLYNYK, J. K.; BRUNT, E. M.; BRITTON, R. S.; WOLFF, R. K. HFE genotype in patients with hemochromatosis and other liver diseases. **Ann. Intern. Med.**, v. 130, n. 12, p. 953-962, 1999a.

BACON, B. R.; POWELL, L. W.; ADAMS, P. C.; KRESINA, T. F.; HOOFNAGLE, J. H. Molecular medicine and hemochromatosis: at the crossroads. **Gastroenterology**, v. 116, n. 1, p. 193-207, 1999b.

BARBOSA, M. C.; SANTOS, T. E. J.; SOUZA, G. F.; ASSIS, L. C.; FREITAS, M. V. C.; GONÇALVES, R. P. Impact of iron overload on interleukin-10 levels, biochemical parameters and oxidative stress in patients with sickle cell anemia. **Rev. Bras. Hematol. Hemoter.**, v. 35, n. 1, p. 29-34, 2013.

BARZI, A.; SEKERES, M. A. Myelodysplastic syndromes: a practical approach to diagnosis and treatment. **Cleve Clin. J. Med.**, v. 77, n. 1, p. 37-44, 2010.

BEAUMONT, C.; VAILONT, S. Iron homeostasis. In: BEAUMONT, C.; BERIS, B. P.; BEUZARD, Y.; BRUGNARA, C. (Eds.). **Disorders of iron homeostasis, erythrocytes, erythropoiesis**. Genova: Forum Service Editore, 2006. p. 393-406.

BEJAR, R.; LEVINE, R.; EBERT, B. L. Unraveling the molecular pathophysiology of myelodysplastic syndromes. **J. Clin. Oncol.**, v. 29, p. 504-515, 2011.

BELINI JUNIOR, E. B.; SILVA, D. G. H.; TORRES, L. S.; ALMEIDA, E. A.; CANÇADO, R. D.; CHIATTONE, C.; BONINI-DOMINGOS, C. R. Oxidative stress and antioxidant capacity in sickle cell anaemia patients receiving different treatments and medications for different periods of time. **Ann. Hematol.**, v. 91, n. 4, p. 479-489, 2012.

BENNETT, J. M. The myelodysplastic syndromes: a personal recollection of four decades of classification and prognostic scoring systems. **Leuk. Lymphoma**, v. 54, n. 12, p. 2588-2591, 2013.

BENNETT, J. M.; CATOVSKY, D.; DANIEL, M. T.; FLANDRIN, G.; GALTON, D. A.; GRALNICK, H. R.; SULTAN, C. Proposals for the classification of the acute leukaemia. French-American\_British (FAB) co-operative group. **Br. J. Haematol.**, v. 33, n. 4, p. 451-458, 1976.



\_\_\_\_\_. Proposals for the classification of the Myelodysplastic syndrome. **Br. J. Haematol.**, v. 51, p. 189-199, 1982.

BENZIE, I. F. F. Lipid peroxidation: a review of causes, consequences, measurements and dietary influences. **Int. J. Food Sci. Nut.**, v. 47, p. 233-261, 1996.

BERNASCONI, P. Molecular pathways in myelodysplastic syndromes and acute myeloid leukemia: relationships and distinctions – a review. **Br. J. Haematol.**, v. 142, n. 5, p. 695-708, 2008.

BEUTLER, E. Hemochromatosis: genetics and pathophysiology. **Annu. Rev. Med.**, v. 57, p. 331-347, 2006.

\_\_\_\_\_. Iron absorption in carriers of the C282Y hemochromatosis mutation. **Am. J. Clin. Nutr.**, v. 80, p. 799-800, 2004.

\_\_\_\_\_. The HFE Cys282Tyr mutation as a necessary but not sufficient cause of clinical hereditary hemochromatosis. **Blood**, v. 101, n. 9, p. 3347-3350, 2003.

BEUTLER, E.; FELITTI, V. J.; KOZIOL, J. A.; HO, N. J.; GELBART, T. Penetrance of 845G--> A (C282Y) HFE hereditary haemochromatosis mutation in the USA. **Lancet**, v. 359, n. 9302, p. 211-218, 2002.

BEUTLER, E.; HOFFBRAND, A. V.; COOK, J. Iron deficiency and overload. **Hematology Am Soc Hematol Educ Program**, 2003. p. 40-61.

BIANCHI, M. L. P.; ANTUNES, L. M. G. Radicais livres e os principais antioxidantes da dieta. **Rev. Nutr.**, v. 12, n. 2, p. 123-130, 1999.

BILATE, A. M. B. Inflamação, citocinas, proteínas de fase aguda e implicações Terapêuticas. **Temas de Reumatologia Clínica**, v. 8, n. 2, p. 47-51, 2007.

BITTENCOURT, P. L.; PALACIOS, S. A.; COUTO, C. A.; CANÇADO, E. L.; CARRILHO, F. J.; LAUDANNA, A. A.; KALIL, J.; GAYOTTO, L. C.; GOLDBERG, A. C. Analysis of HLA-A antigens and C282Y and H63D mutations of the HFE gene in Brazilian patients with hemochromatosis. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 35, n. 3, p. 329-335, 2002.

BJORK, J.; JOHANSSON, B.; BROBERG, K.; ALBIN, M. Smoking as a risk factor for myelodysplastic syndromes and acute myeloid leukemia and its relation to cytogenetic findings: a case-control study. **Leuk. Res.**, v. 33, p. 788-791, 2009.

BONINI-DOMINGOS, C. R. Aumento de ferro, hemocromatose hereditária e defeitos no gene *HFE*. O que conhecemos na população brasileira? **Rev. Bras. Hematol. Hemoter.**, v. 29, n. 4, p. 341-342, 2007.

\_\_\_\_\_. Hemocromatose hereditária e as mutações no gene HFE. **Rev. Bras. Hematol. Hemoter.**, v. 28, n. 4, p. 239-245, 2006.

BOWEN, D.; CULLIGAN, D.; JOWITT, S.; KELSEY, S.; MUFTI, G.; OSCIER, D.; PARKER, J. Guidelines for the diagnosis and therapy of adult myelodysplastic syndromes. **Br. J. Haematol.**, v. 120, n. 2, p. 187-200, 2003.

BRADLEY, L. A.; HADDOW, J. E.; PALOMAKI, G. E. Population screening for haemochromatosis: expectations based on a study of relatives of symptomatic probands. **J. Med. Screen**, v. 3, p. 171-177, 1996.

BRADLEY, S. J.; GOSRIWITANA, I.; SRICHAIRATANAKOOL, S.; HIDER, R. C.; PORTER, J. B. Non-transferrin-bound iron induced by myeloablative chemotherapy. **Br. J. Hematol.**, v. 99, p. 337-343, 1997.

BRANDHAGEN, D. J.; FAIRBANKS, V. F.; BALDUS, W. P.; SMITH, C. I.; KRUCKEBERG, K. E.; SCHAID, D. J.; THIBODEAU, S. N. Prevalence and clinical significance of HFE gene mutations in patients with iron overload. **Am. J. Gastroenterol.**, v. 95, n. 10, p. 2910-2914, 2000.

CAMASCHELLA, C.; FARGION, S.; SAMPIETRO, M.; ROETTO, A.; BOSIO, S.; GAROZZO, G.; AROSIO, C.; PIPERNO, A. Inherited *HFE* unrelated hemochromatosis in Italian families. **Hepatology**, v. 29, p. 1563-1564, 1999.

CANÇADO, R. D.; GUGLIELMI, A. C. O.; VERGUEIRO, C. S. V.; ROLIM, E. G.; FIGUEIREDO, M. S.; CHIATTONE, C. S. Estudo das mutações C282Y, H63D e S65C do gene HFE em doentes brasileiros com sobrecarga de ferro. **Rev. Bras. Hematol. Hemoter.**, v. 29, n. 4, p. 1-14, 2007.

\_\_\_\_\_. Analysis of HFE gene mutations and HLA-A alleles in Brazilian patients with iron overload. **São Paulo Med. J.**, v. 124, n. 2, p. 55-60, 2006.

CARELLA, M.; D'AMBROSIO, L.; TOTARO, A.; GRIFA, A.; VALENTINO, M. A.; PIPERNO, A.; GIRELLI, D.; ROETTO, A.; FRANCO, B.; GASPARINI, P.; CAMASCHELLA, C. Mutation analysis of the HLA-H gene in Italian hemochromatosis. **Am. J. Hum. Genet.**, v. 60, n. 4, p. 828-832, 1997.

CARMINE, T. C.; EVANS, P.; BRUCHELT, G.; EVANS, R.; HANDGRETINGER, R.; NIETHAMMER, D.; HALLIWELL, B. Presence of iron catalytic for free radical reactions in patients undergoing chemotherapy: implications for therapeutic management. **Cancer Lett.**, v. 194, n. 2, p. 219-226, 1995.

CASTRO, C. C. M.; GOMES, C. B. G.; MARTINS, M. R. A.; SOUSA, J. C.; MAGALHÃES, S. M. M.; PINHEIRO, R. F. Tissue doppler echocardiography detects preclinical markers of cardiac lesion in MDS patients. **J. Hematol. Oncol.**, v. 5, p. 12-14, 2012.

CATENACCI, D. V.; SCHILLER, G. J. Myelodysplastic syndromes: a comprehensive review. **Blood Rev.**, v. 19, p. 301-319, 2005.

CAZZOLA, M.; DELLA PORTA, M. G.; MALCOVATI, L. Clinical relevance of anemia and transfusion iron overload in myelodysplastic syndromes. **Hematology Am. Soc. Hematol. Educ. Program.**, p. 166-175, 2008.

CERQUEIRA, B. A.; BOAS, W. V.; ZANETTE, A. D.; REIS, M. G.; GONCALVES, M. S. Increased concentrations of IL-18 and uric acid in sickle cell anemia: contribution of hemolysis, endothelial activation and the inflammasome. **Cytokine**, v. 56, n. 2, p. 471-475, 2011.

CETIN, T.; ARPACI, F.; YILMAZ, M. I.; SAGLAM, K.; OZTURK, B.; KOMURCU, S.; GUNAY, M.; OZET, A.; AKAY, C.; KILIC, S.; ULUTIN, C. Oxidative stress in patients undergoing high-dose chemotherapy plus peripheral blood stem cell transplantation. **Biol. Trace Elem. Res.**, v. 97, n. 3, p. 237-247, 2004.

CHAUFFAILLE, M. L. L. F.; YAMAMOTO, M.; MONCAU, J. E.; BRAGA, G. W.; SOUTO, E. X.; KERBAUY, J. Alterações citogenética como fatores prognósticos em leucemias mielóides agudas. **Rev. Assoc. Med. Bras.**, v. 42, n. 4, p. 200-204, 1996.

CHEN, B.; ZHAO, W. L.; JIN, J.; XUE, Y. Q.; CHENG, X.; CHEN, X. T.; CUI, J.; CHEN, Z. M.; CAO, Q.; YANG, G.; YAO, Y.; XIA, H. L.; TONG, J. H.; LI, J. M.; CHEN, J.; XIONG, S. M.; SHEN, Z. X.; WAXMAN, S.; CHEN, Z.; CHEN, S. J. Clinical and cytogenetic features of 508 Chinese patients with myelodysplastic syndrome and comparison with those in Western countries. **Leukemia**, v. 19, n. 5, p. 767-775, 2005.

CHESON, B. D.; BENNETT, J. M.; KANTARJIAN, H.; PINTO, A.; SCHIFFER, C. A.; NIMER, S. D.; LÖWENBERG, B.; BERAN, M.; DE WITTE, T. M.; STONE, R. M.; MITTELMAN, M.; SANZ, G. F.; WIJERMANS, P. W.; GORE, S.; GREENBERG, P. L. **Blood**, v. 96, n. 12, p. 3671-3674, 2000.

CHESON, B. D.; GREENBERG, P. L.; BENNETT, J. M.; LOWENBERG, B.; WIJERMANS, P. W.; NIMER, S. D.; PINTO, A.; BERAN, M.; DE WITTE, T. M.; STONE, R. M.; MITTELMAN, M.; SANZ, G. F.; GORE, S. D.; SCHIFFER, C. A.; KANTARJIAN, H. Clinical application and proposal for modification of the International Working Group (IWG) response criteria in myelodysplasia. **Blood**, v. 108, n. 2, p. 419-425, 2006.

CHOI, S-O, CHO, Y-S, KIM, H-L, PARK, J-W. ROS mediate the hypoxic repression of the hepcidin gene by inhibiting C/EBP $\alpha$  and STAT-3. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 356, n. 1, p. 312-317, 2007.

CIMBUROVÁ, M.; PUTOVÁ, I.; PROVAZNÍKOVÁ, H.; PINTÉROVÁ, D.; HORÁK, J. S65C and other mutations in the haemochromatosis gene in the Czech population. **Folia Biol. (Praha)**, v. 51, n. 6, p. 172-176, 2005.

CIMEN, M. Y. B. Free radical metabolism in human erythrocytes. **Clin. Chim. Acta.**, v. 390, p.1-11, 2008.

CORDOBA, I.; GONZALEZ-PORRAS, J. R.; SUCH, E.; NOMDEDEU, B.; LUÑO, E.; DE PAZ, R.; CARBONELL, F.; VALLESPI, T.; ARDANAZ, M.; RAMOS, F.; MARCO, V.; BONANAD, S.; SANCHEZ-BARBA, M.; COSTA, D.; BERNAL, T.; SANZ, G. F.; CAÑIZO, M. C. The degree of neutropenia has a prognostic impact in low risk myelodysplastic syndromes. **Leuk. Res.**, v. 36, n. 3, p. 287-292, 2012.

COREY, S. J.; MINDEN, M. D.; BARBER, D. L.; KANTARJIAN, H.; WANG, J. C.; SCHIMMER, A. D. Myelodysplastic syndromes: The complexity of stem-cell diseases. **Nat. Rev. Cancer**, v. 7, n. 2, p. 118-129, 2007.

COSTA-MATOS, L.; BATISTA, P.; MONTEIRO, N.; HENRIQUES, P.; GIRÃO, F.; CARVALHO, A. Hfe mutations and iron overload in patients with alcoholic liver disease. **Arq. Gastroenterol.**, v. 50, n. 1, p. 35-41, 2013.

CUTLER, C. S.; LEE, S. J.; GREENBERG, P.; DEEG, H. J.; PÉREZ, W. S.; ANASETTI, C.; BOLWELL, B. J. *et al.* A decision analysis of allogeneic bone marrow transplantation for the myelodysplastic syndromes: delayed transplantation for low risk myelodysplasia is associated with improved outcome. **Blood**, v. 104, n. 2, p. 579-585, 2004.

DAKSHINAMURTHY, A. G.; NOVITZKY, N.; BHARADWAJ, R.; PRAKHYA, B. M. Cytogenetic analysis of 52 Indian patients with de novo myelodysplastic syndromes-a comparative analysis of results with reports from Asia. **Ann. Hematol.**, v. 84, p. 298-303, 2005.

DARLEY-USMAN, V.; HALLIWELL, B. Blood radicals: reactive nitrogen species, reactive oxygen species, transition metal ions, and the vascular system. **Pharm. Res.**, v. 13, n. 5, p. 649-662, 1996.

DAYYANI, F.; CONLEY, A. P.; STROM, S. S.; STEVENSON, W.; CORTES, J. E.; BORTHAKUR, G.; FADERL, S.; O'BRIEN, S.; PIERCE, S.; KANTARJIAN, H.; GARCIA-MANERO, G. Cause of death in patients with lower-risk myelodysplastic syndrome. **Cancer**, v. 116, n. 9, p. 2174-2179, 2012.

DELFORGE, M.; SELLESLAG, D.; TRIFFET, A.; MINEUR, P.; BRIES, G.; GRAUX, C.; TRULLEMANS, F.; MACDONALD, K.; ABRAHAM, I.; PLUYMERS, W.; RAVOET, C. Iron status and treatment modalities in transfusion-dependent patients with myelodysplastic syndromes. **Ann. Hematol.**, v. 90, n. 6, p. 655-666, 2011.

DELLA PORTA, M. G.; MALCOVATI, L.; BOVERI, E.; TRAVAGLINO, E.; PIETRA, D.; PASCUTTO, C.; PASSAMONTI, F.; INVERNIZZI, R.; CASTELLO, A.; MAGRINI, U.; LAZZARINO, M.; CAZZOLA, M. Clinical relevance of bone marrow fibrosis and CD34-positive cell clusters in primary myelodysplastic syndromes. **J. Clin. Oncol.**, v. 27, n. 5, p. 754-762, 2009.

DELLA PORTA, M. G.; MALCOVATI, L.; STRUPP, C.; AMBAGLIO, I.; KUENDGEN, A.; ZIPPERER, E.; TRAVAGLINO, E.; INVERNIZZI, R.; PASCUTTO, C.; LAZZARINO, M.; GERMING, U.; CAZZOLA, M. Risk stratification based on both disease status and extra-hematologic comorbidities in patients with myelodysplastic syndrome. **Haematologica**, v. 96, p. 441-449, 2011.

DE SOUZA, G. F.; BARBOSA, M. C.; SANTOS, T. E.; CARVALHO, TM, DE FREITAS, RM, MARTINS, MR, GONÇALVES, RP, PINHEIRO, RF, MAGALHÃES, SM. Increased parameters of oxidative stress and its relation to transfusion iron overload in patients with myelodysplastic syndromes. **J. Clin. Pathol.**, v. 66, n. 11, p. 996-998, 2013.

DEVLIN, T. M. (Coord.). **Manual de bioquímica com correlações clínicas**. 5ª. ed. São Paulo: Edgard Blucher, 2003. p. 837-856.

DRAPER, H. H.; HADLEY, M. Malonaldehyde determination as index of lipid peroxidation. **Methods Enzymol.**, v. 186, p. 421-431, 1990.

EMERIT, J.; BEAUMONT, C.; TRIVIN, F. Iron metabolism, free radicals, and oxidative injury. **Biomed. Pharmacothe.**, v. 55, n. 3, p. 333-339, 2001.

FARQUHAR, M. J.; BOWEN, D.T. Oxidative stress and the Myelodysplastic Syndromes. **Int. J. Hematol.**, v. 77, p. 342-350, 2003.

FEDER, J. N.; GNIRKE, A.; THOMAS, W.; TSUCHIHASHI, Z.; RUDDY, D. A.; BASAVA, A.; DORMISHIAN, F. et al. A novel MHC class I-like gene is mutated in patients with hereditary haemochromatosis. **Nat. Genet.**, v. 13, n. 4, p. 399-408, 1996.

FEDER, J. N.; PENNY, D. M.; IRRINKI, A.; LEE, V. K.; LEBRÓN, J. A.; WATSON, N.; TSUCHIHASHI, Z.; SIGAL, E.; BJORKMAN, P. J.; SCHATZMAN, R. C. The hemochromatosis gene product complexes with the transferrin receptor and lowers its affinity for ligand binding. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 95, n. 4, p. 1472-1477, 1998.

FENAUX, P. Chromosome and molecular abnormalities in myelodysplastic syndromes. **Int. J. Hematol.**, v. 73, p. 429-437, 2001.

FENAUX, P.; MUFTI, G. J.; HELLSTRONG-LINDENBERG, E.; SANTINI, V.; FINELLI, C.; GIAGOUNIDIS, A.; SCHOCH, R.; GATTERMANN, N.; SANZ, G.; LIST, A.; GORE, S. D.; SEYMOUR, J. F.; BENNETT, J. M.; BYRD, J.; BACKSTROM, J.; ZIMMERMAN, L.; MCKENZIE, D.; BEACH, C.; SILVERMAN, L. R. Efficacy of azacitidine compared with that of conventional care regimens in the treatment of higher-risk myelodysplastic syndromes: a randomised, open-label, phase III study. **Lancet Oncol.**, v. 10, n. 3, p. 223-232, 2009.

FERREIRA, A. C. S.; OLIVEIRA, V. C.; CAXITO, F. A.; GOMES, K. B. Prevalence of C282Y and H63D mutations in the gene of Brazilian individuals with clinical suspicion of hereditary hemochromatosis. **Rev. Bras. Hematol. Hemoter.**, v. 30, p. 379-383, 2008.

FERREIRA, A. L. A.; MATSUBARA, L. S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Rev. Assoc. Med. Bras.**, v. 43, n. 1, p. 61-68, 1997.

FILLET, G.; BEGUIN, Y.; BALDELLI, L. Model of reticuloendothelial iron metabolism in humans: abnormal behavior in idiopathic hemochromatosis and in inflammation. **Blood**, v. 74, n. 2, p. 844-851, 1989.

FINCH, C. A.; BELLOTI, V.; STRAY, S.; LIPSCHITZ, D. A.; COOK, J. D.; PIPPARD, M. J.; HUEBERS, H. A. Plasma ferritin determination as a diagnostic tool. **West. J. Med.**, v. 145, n. 5, p. 657-63, 1986.

FINKEL, T.; HOLBROOK, N. J. Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. **Nature**, v. 408, n. 6809, p. 239-247, 2000.

FLOYD, R. A. Role of oxygen free radicals in carcinogenesis and brain ischemia. **FASEB J.**, v. 4, n. 9, p. 2587-2597, 1990.

GADJEVA, V.; KUCHUKOVA, D.; GEORGIEVA, R. Vitamin combinations reduce oxidative stress and improve antioxidant status in patients with iron deficiency anemia. **Comp. Clin. Pathol.**, v. 14, p. 99-104, 2005.

GALLEANO, M.; PUNTARULO, S. Role of antioxidants on the erythrocytes resistance to lipid peroxidation after acute iron overload in rats. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1271, n. 2-3, p. 321-326, 1995.

GARCIA-MANERO, G. Prognosis of myelodysplastic syndromes. **Hematology Am. Soc. Hematol. Educ. Program.**, p. 330-337, 2010.

GATTERMANN, N. Pathophysiological and clinical aspects of iron chelation therapy in MDS. **Curr. Pharm. Des.**, v. 18, n. 22, p. 3222-3234, 2012.

GATTERMANN, N.; FINELLI, C.; DELLA PORTA, M.; STADLER, M.; GUERCI-BRESLER, A.; SCHMID, M.; TAYLOR, K.; VASSILIEFF, D.; HABR, D.; MARCELLARI, A.; ROUBERT, B.; ROSE, C. Hematologic responses to deferasirox therapy in transfusion-dependent patients with myelodysplastic syndromes. **Haematologica**, v. 97, n. 9, p. 1364-1371, 2012.

GATTERMANN, N.; RACHMILEWITZ, E. A. Iron overload in MDS-pathophysiology, diagnosis, and complications. **Ann. Hematol.**, v. 90, n. 1, p. 1-10, 2011.

GERMING, U.; AUL, C.; NIEMEYER, C. M.; HAAS, R.; BENNETT, J. M. Epidemiology, classification and prognosis of adults and children with myelodysplastic syndromes. **Ann. Hematol.**, v. 87, n. 9, p. 9691-699, 2008.

GERMING, U.; STRUPP, C.; KUNDGEN, A.; BOWEN, D.; AUL, C.; HAAS, R.; GATTERMANN, N. No increase in age-specific incidence of myelodysplastic syndromes. **Haematologica**, v. 89, n. 8, p. 905-10, 2004.

GHOTI, H.; AMER, J.; WINDER, A.; RACHMILEWITZ, E.; FIBACH, E. Oxidative stress in red blood cells, platelets, and polymorphonuclear leukocytes from patients with myelodysplastic syndromes. **Eur. J. Haematol.**, v. 79, p. 463-467, 2007.

GHOTI, H.; FIBACH, E.; MERKEL, D.; PEREZ-AVRAHAM, G.; GRISARIU, S.; RACHMILEWITZ, E. A. Changes in parameters of oxidative stress and free iron biomarkers during treatment with deferasirox in iron-overloaded patients with myelodysplastic syndromes. **Haematologica**, v. 95, p. 1433-1434, 2010.

GHOTI, H.; FIBACH, E.; WESTERMAN, M.; GANZ, T.; RACHMILEWITZ, E. A. Increased serum hepcidin levels during treatment with deferasirox in iron-overload patients with myelodysplastic syndrome. **Br. J. Haematol.**, v. 153, n. 1, p. 118-120, 2011.

GOGVADZE, V.; WALTER, P. B.; AMES, B. N. The role of Fe<sup>2+</sup> induced lipid peroxidation in the initiation of the mitochondrial permeability transition. **Arch. Biochem. Biophys.**, v. 414, p. 255-260, 2003.

GOLDBERG, S. L.; CHEN, E.; CORRAL, M.; GUO, A.; MODY-PATEL, N.; PECORA, A. L.; LAOURI, M. Incidence and clinical complications of myelodysplastic syndromes among United States medicare beneficiaries. **J. Clin. Oncol.**, v. 28, n. 17, p. 2847-2852, 2010.

GREENBERG, P.; COX, C.; LEBEAU, M. M.; FENAUX, P.; MOREL, P.; SANZ, G.; 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. 2079-2088, 1997.

GREENBERG, P. L. Panel National Comprehensive Cancer Network (NCCN) **Clinical practice guidelines in oncology**: myelodysplastic syndromes. Chicago IL, 2005. v. 1.

GROTTO, H. Z. W. Metabolismo do ferro: uma revisão sobre os principais mecanismos envolvidos em sua homeostase. **Rev. Bras. Hematol. Hemoter.**, v. 30, n. 5, p. 390-397, 2008.

GUO, Z.; HEYDARI, A.; RICHARDSON, A. Nucleotide excision repair of actively transcribed versus nontranscribed DNA in rat hepatocytes: effect of age and dietary restriction. **Exp. Cell. Res.**, v. 245, p. 228-238, 1998.

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

HAASE, D.; GERMING, U.; SCHANZ, J.; PFEILSTÖCKER, M.; NÖSSLINGER, T.; HILDEBRANDT, B.; KUNDGEN, A.; LÜBBERT, M.; KUNZMANN, R.; GIAGOUNIDIS, A. A.; AUL, C.; TRÜMPER, L.; KRIEGER, O.; STAUDER, R.; MÜLLER, T. H.; WIMAZAL, F.; VALENT, P.; FONATSCH, C.; STEIDL, C. New insights into the prognostic impact of the karyotype in MDS and correlation with subtypes: evidence from a core dataset of 2124 patients. **Blood**, v. 110, n. 13, p. 4385-4395, 2007.

HALLIWELL, B. Reactive oxygen species and the central nervous system. **J. Neurochem.**, v. 59, n. 1, p. 609-623, 1992.

\_\_\_\_\_. The role of oxygen radicals in human disease, with particular reference to the vascular system. **Haemostasis**, v. 23, suppl 1, p. 118-126, 1993.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. **Free radicals in biology and medicine**. Oxford: Oxford Univ Press, 2007. v. 1, p. 851.

\_\_\_\_\_. Oxygen free radicals and iron in relation to biology and medicine: some problems and concepts. **Arch. Biochem. Biophys.**, v. 246, p. 501-514, 1986.

\_\_\_\_\_. Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview. **Methods Enzimol.**, v. 186, p. 1-85, 1990.

HAMILTON, M. L.; VAN REMMEN, H.; DRAKE, J. A.; YANG, H.; GUO, Z. M.; KEWITT, K.; WALTER, C. A.; RICHARDSON, A. Does oxidative damage to DNA increase with age? **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 98, n. 18, p. 10469-10474, 2001.

HARVEY, R. D. Myelodysplastic syndromes and the role of iron overload. **Am. J. Health-Syst. Pharm.**, v. 67, p. 53-59, 2010.

HEBBEL, R. P. Erythrocyte antioxidants and membrane vulnerability. **J. Lab. Clin. Med.**, v. 107, p. 401-404, 1986.

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

HIRAI, H. Molecular mechanisms of myelodysplastic syndrome. **Jpn. J. Clin. Oncol.**, v. 33, p. 153-160, 2003.

HUSSAIN, S. P.; HOFSETH, L. J.; HARRIS, C. C. Radical causes of cancer. **Nat. Rev. Cancer**, v. 3, p. 276-285, 2003.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA (IBGE). **Pesquisa nacional por amostra de domicílio – síntese dos indicadores sociais 2009**. Disponível em: <[http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/populacao/condicaodevida/indicadoresminimos/sinteseindicais2009/indic\\_sociais2009.pdf](http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/populacao/condicaodevida/indicadoresminimos/sinteseindicais2009/indic_sociais2009.pdf)>. Acesso em: 1 jan. 2012

INTRAGUMTORNCHAI, T.; PRAYOONWIWAT, W.; SWASDIKUL, D.; SUWANWELA, N.; CHAIMONGKOL, B.; JOOTAR, S.; CHANSUNG, K.; CHANCHARUNEE, S.; LEELASIRI, A.; YOSHIDA, Y. Myelodysplastic syndromes in Thailand: a retrospective pathologic and clinical analysis of 117 cases. **Leuk. Res.**, v. 22, n. 5, p. 453-460, 1998.

INVERNIZZI, R.; TRAVAGLINO, E.; DE AMICI, M.; BRUGNATELLI, S.; RAMAJOLI, I.; ROVATI, B.; BENATTI, C.; ASCARI, E. thalidomide treatment reduces apoptosis levels in bone marrow cells from patients with myelodysplastic syndromes. **Leuk. Res.**, v. 29, n. 6, p. 641-647, 2005.

JÄDERSTEN, M.; HELLSTRÖM-LINDBERG, E. Myelodysplastic syndromes: biology and treatment. **J. Intern. Med.**, v. 265, p. 307-328, 2009.

JAFFE, E. S.; HARRIS, N. L.; STEIN, H.; VARDIMAN, J. W. (Eds.). **World Health Organization classification of tumours: pathology and genetics of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues**. Lyon: IARC Press, 2001.



JANERO, D. R. Malondialdehyde and thiobarbituric acid-reactivity as diagnostic indices of lipid peroxidation and peroxidative tissue injury. **Free Radical Biol. Med.**, v. 9, p. 515-540, 1990.

JANSSEN, J. W. G.; BUSCHLE, M.; LAYTON, M.; DREXLER, H. G.; LYONS, J.; VAN DEN BERGHE, H.; HEIMPEL, H.; KUBANEK, B.; KLEIHAUER, E.; MUFTI, G. J, et al. Clonal analysis of myelodysplastic syndromes: Evidence of multipotent stem cell origin. **Blood**, v. 73, n. 1, p. 248-254, 1989.

KALE, V.; LIST, A. F. Immunomodulatory drugs (IMiDs): a new treatment option for myelodysplastic syndromes. **Curr. Pharm. Biotechnol.**, v. 7, p. 339-342, 2006.

KANTARJIAN, H.; O'BRIEN, S.; RAVANDI, F.; CORTES, J.; SHAN, J.; BENNETT, J. M.; LIST, A.; FENAUX, P.; SANZ, G.; ISSA, J. P.; FREIREICH, E. J.; GARCIA-MANERO, G. Proposal for a new risk model in myelodysplastic syndrome that accounts for events not considered in the original International Prognostic Scoring System. **Cancer**, v. 113, n. 6, p. 1351-1361, 2008.

KIKUCHI, S.; KOBUNE, M.; IYAMA, S.; SATO, T.; MURASE, K.; KAWANO, Y.; TAKADA, K.; ONO, K.; KANEKO, Y.; MIYANISHI, K.; SATO, Y.; HAYASHI, T.; TAKIMOTO, R.; KATO, J. Improvement of iron-mediated oxidative DNA damage in patients with transfusion-dependent myelodysplastic syndrome by treatment with deferasirox. **Free Rad. Biol. Med.**, v. 53, n. 4, p. 643-648, 2012.

KOHEN, R.; NYSKA, A. Oxidation of biological systems: oxidative stress phenomena, antioxidants, redox reactions and methods for their quantification. **Toxicol. Pathol.**, v. 30, n. 6, p. 620-650, 2002.

KOMROKJI, R. S.; ZHANG, L.; BENNETT, J. M. Myelodysplastic syndromes classification and risk stratification. **Hematol. Oncol. Clin. North Am.**, v. 24, p. 443-457, 2010.

KOUIDES, P. A.; BENNETT, J. M. Understanding the myelodysplastic syndromes. **Oncologist**, v. 2, p. 389-401, 1997.

KUENDGEN, A.; STRUPP, C.; AIVADO, M.; HILDEBRANDT, B.; HAAS, R.; GATTERMANN, N.; HILDEBRANDT, B.; HAAS, R.; GATTERMANN, N.; GERMING, U. Myelodysplastic syndromes in patients younger than age 50. **J. Clin. Oncol.**, v. 24, n. 34, p. 5358-5365, 2006.

KUSHNER, J. P.; PORTER, J. P.; OLIVIERI, N. F. Secondary iron overload. **Hematology Am. Soc. Hematol. Educ. Program**, p. 47-61, 2001.

LEE, J. J.; KIM, H. J.; CHUNG, I. J.; KIM, J. S.; SOHN, S. K.; KIM, B. S.; LEE, K. H.; KWAK, J. Y.; PARK, Y. H.; AHN, J. S.; PARK, Y. S. Comparisons of prognostic scoring systems for myelodysplastic syndromes: a Korean multicenter study. **Leuk. Res.**, v. 23, n. 5, p. 425-432, 1999.

LI, M.; FANG, X.; WEI, Z.; YORK, J. P.; ZHANG, P. Loss of spindle assembly checkpoint-mediated inhibition of Cdc20 promotes tumorigenesis in mice. **J. Cell. Biol.**, v. 185, n. 6, p. 983-994, 2009.

LICHTMAN, M. A.; ROWE, J. M. The relationship of patient age to the pathobiology of the clonal myeloid diseases. **Semin. Oncol.**, v. 31, p. 185-197, 2004.

LIMA, E. S.; ABDALLA, D, S, P. Peroxidação lipídica: mecanismos e avaliação em amostras biológicas. **RBCF Rev. Bras. Ciênc. Farm.**, v. 37, n. 3, p. 293-303, 2001.

LIST, A.; DEWALD, G.; BENNETT, J.; GIAGOUNIDIS, A.; RAZA, A.; FELDMAN, E.; POWELL, B.; GREENBERG, P.; THOMAS, D.; STONE, R.; REEDER, C.; WRIDE, K.; PATIN, J.; SCHMIDT, M.; ZELDIS, J.; KNIGHT, R. Lenalidomide in the myelodysplastic syndrome with chromosome 5q deletion. **N. Engl. J. Med.**, v. 355, n. 14, p. 1456-1465, 2006.

LIST, A. F. Iron overload in myelodysplastic syndromes: diagnosis and management. **Cancer Control**, v. 17 suppl., p. 2-8, 2010.

LIST, A. F.; BAER, M. R.; STEENSMA, D. P.; RAZA, A.; ESPOSITO, J.; MARTINEZ-LOPEZ, N.; PALEY, C.; FEIGERT, J.; BESA, E. Deferasirox reduces serum ferritin and labile plasma iron in RBC transfusion-dependent patients with myelodysplastic syndrome. **J. Clin. Oncol.**, v. 30, n. 17, p. 2134-2139, 2012.

LOOK, A. T. Molecular pathogenesis of MDS. **Hematology Am. Soc. Hematol. Educ. Program.**, p. 156-160, 2005.

LORAND-METZE, I.; PINHEIRO, M. P.; RIBEIRO, E.; DE PAULA, E. V.; METZE, K. Factors influencing survival in myelodysplastic syndromes in a Brazilian population: comparison of FAB and WHO classifications. **Leuk. Res.**, v. 28, p. 587-594, 2004.

LUO, J. L.; MAEDA, S.; HSU, L. C.; YAGITA, H.; KARIN, M. Inhibition of NF- $\kappa$ B in cancer cells converts inflammation-induced tumor growth mediated by TNF- $\alpha$  to TRAIL-mediated tumor regression. **Cancer Cell.**, v. 6, p. 297-305, 2004.

MA, X.; DOES, M.; RAZA, A.; MAYNE, S. T. Myelodysplastic syndromes: incidence and survival in the United States. **Cancer**, v. 109, p. 1536-1542, 2007.

MAGALHÃES, S. M. M.; LORAND-METZE, I. Síndromes mielodisplásicas – protocolo de exclusão. **Rev. Bras. Hematol. Hemoter.**, v. 26, p. 263-267, 2004.

MAGALHÃES, S. M. M.; HEREDIA, F. F.; FERNANDES, L. C. M.; ALMEIDA, P. J. P.; SOUSA, J. C.; SOUZA, G. F.; PINHEIRO, R. F. Beyond race-related disparities: is myelodysplastic syndrome the same everywhere. **Leuk. Lymphoma**, v. 54, n. 7, p. 1564-1566, 2013.

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. N.; 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, n. 21, p. 785-786, 2010.

MAHESH, S.; GINZBURG, Y.; VERMA, A. Iron overload in myelodysplastic syndromes. **Leuk. Lymph.**, v. 49, n. 3, p. 427-438, 2008.

MALAVE, I.; PERDOMO, Y.; ESCALONA, E.; RODRIGUEZ, E.; ANCHUSTEGUI, M.; MALAVÉ, H.; ARENDS, T. Level of tumor necrosis factor alpha/cachectin (TNF alpha) in sera from patients with sickle cell disease. **Acta Haematol.**, v. 90, n. 4, p. 172-176, 1993.

MALCOVATI, L. Impact of transfusion dependency and secondary iron overload on the survival of patients with myelodysplastic syndromes. **Leuk. Res.**, v. 31, suppl. 3, p. S2-S6, 2007.

MALCOVATI, L.; DELLA PORTA, M. G.; CAZZOLA, M. Predicting survival and leukemic evolution in patients with myelodysplastic syndrome. **Haematologica**, 91: 1588–1590, 2006.

MALCOVATI, L.; DELLA PORTA, M.; PASCUTTO, C.; INVERNIZZI, R.; BONI, M.; TRAVAGLINO, E.; PASSAMONTI, F.; ARCAINI, L.; MAFFIOLI, M.; BERNASCONI, P.; LAZZARINO, M.; CAZZOLA, M. Prognostic factors and life expectancy in myelodysplastic syndromes classified according to WHO criteria. A basis for clinical decision-making. **J. Clin. Oncol.**, v. 23, n. 30, p. 7594-7603, 2005.

MALCOVATI, L.; DELLA PORTA, M. G.; STRUPP, C.; AMBAGLIO, I.; KUENDGEN, A.; NACHTKAMP, K.; TRAVAGLINO, E.; INVERNIZZI, R.; PASCUTTO, C.; LAZZARINO, M.; GERMING, U.; CAZZOLA, M. Impact of the degree of anemia on the outcome of patients with myelodysplastic syndrome and its integration into the WHO classification-based Prognostic Scoring System (WPSS). **Haematologica**, v. 96, n. 10, p. 1433-1440, 2011.

MALCOVATI, L.; GERMING, U.; KUENDGEN, A.; DELLA PORTA, M. G.; PASCUTTO, C.; INVERNIZZI, R.; GIAGOUNIDIS, A.; HILDEBRANDT, B.; BERNASCONI, P.; KNIPP, S.; STRUPP, C.; LAZZARINO, M.; AUL, C.; CAZZOLA, M. Time-dependent prognostic scoring system for predicting survival and leukemic evolution in myelodysplastic syndromes. **J. Clin. Oncol.**, v. 25, n. 23, p. 3503-3510, 2007.

MALCOVATI, L.; NIMER, S. D. Myelodysplastic syndromes: diagnosis and staging. **Cancer Control**, v. 15, p. 4-13, 2008.

MANTOVANI, G.; MACCIÒ, A.; MADEDDU, C.; MURA, L.; MURA, L.; MASSA, E.; GRAMIGNANO, G.; LUSSO, M. R.; MURGIA, V.; CAMBONI, P.; FERRELI, L. Reactive oxygen species, antioxidant mechanisms and serum cytokine levels in cancer patients: impact of an antioxidant treatment. **J. Cell. Mol. Med.**, v. 6, n. 4, p. 570-582, 2002.

MARTINELLI, A. L.; FILHO, R.; CRUZ, S.; FRANCO, R.; TAVELLA, M.; SECAF, M.; RAMALHO, L.; ZUCOLOTO, S.; RODRIGUES, S.; ZAGO, M. Hereditary

hemochromatosis in a Brazilian university hospital in São Paulo State (1990-2000). **Genet. Mol. Res.**, v. 4, n. 1, p. 31-38, 2005.

MAURITZSON, N.; ALBIN, M.; RYLANDER, L.; BILLSTRÖM, R.; AHLGREN, T.; MIKOCZY, Z.; BJÖRK, J.; STRÖMBERG, U.; NILSSON, P. G.; MITELMAN, F.; HAGMAR, L.; JOHANSSON, B. Pooled analysis of clinical and cytogenetic features in treatment-related and de novo adult acute myeloid leukemia and myelodysplastic syndromes based on a consecutive series of 761 patients analyzed 1976-1993 and on 5098 unselected cases reported in the literature 1974-2001. **Leukemia**, v. 16, n. 12, p. 2366-2378, 2002.

MELLO-FILHO, A. C.; HOFFMANN, E.; MENEGHINI, R. Cell Killing and DNA damage by hydrogen peroxide are mediated by intracellular iron. **Biochem. J.**, v. 218, n. 1, p. 273-275, 1984.

MUFTI, G. J. Pathobiology, classification, and diagnosis of myelodysplastic syndrome. **Best Pract. Res. Clin. Haematol.**, v. 17, n. 4, p. 543-557, 2004.

MUFTI, G. J.; BENNETT, J. M.; GOASGUEN, J.; BAIN, B. J.; BAUMANN, I. M.; BRUNNING, R.; CAZZOLA, M.; FENAUX, P.; GERMING, U.; HELLSTRÖM-LINDBERG, E.; JINNAI, I.; MANABE, A.; MATSUDA, A.; NIEMEYER, C. M.; SANZ, G.; TOMONAGA, M.; VALLESPI, T.; YOSHIMI, A. Diagnosis and classification of myelodysplastic syndrome: International Working Group on Morphology of myelodysplastic syndrome (IWGM-MDS) consensus proposal for the definitions and enumeration of myeloblasts and ring sideroblasts. **Haematologica**, v. 93, n. 11, p. 1712-1717, 2008.

NAEIM, F.; RAO, P. N.; GRODY, W. W. **Hematopathology: morphology, immunophenotype, cytogenetics and molecular approaches**. New York: Academic Press, 2008.

NAOUM, F. A. **Sobrecarga de ferro e estresse oxidativo em pacientes submetidos a transplante de células precursoras hematopoiéticas**. 2006. 84f. Tese (Doutorado) - Faculdade de Medicina, São José do Rio Preto, 2006.

NEMETH, E.; GANZ, T. Heparin and iron-loading anemias. **Haematologica**, v. 91, p. 727-732, 2006.

NEUKIRCHEN, J.; SCHOONEN, W. M.; STRUPP, C.; GATTERMANN, N.; AUL, C.; HAAS, R.; GERMING, U. Incidence and prevalence of myelodysplastic syndromes: data from the Düsseldorf MDS-registry. **Leuk. Res.**, v. 35, n. 12, p. 1591-1596, 2011.

NG, F.; BERK, M.; DEAN, O.; BUSH, A. I. Oxidative stress in psychiatric disorders: evidence base therapeutic implications. **Int. J. Neuropsychopharmacol.**, v. 11, n. 6, p. 851-876, 2008.

NICOLAS, G.; VIATTE, L.; LOU, D. Q.; BENNOUN, M.; BEAUMONT, C.; KAHN, A.; ANDREWS, N. C.; VAULONT, S. Constitutive hepcidin expression prevents iron overload in a mouse model of hemochromatosis. **Nat. Genet.**, v. 34, n. 1, p. 97-101, 2003.

NIMER, S. D. Myelodysplastic syndromes. **Blood**, v. 111, p. 4841-4851, 2008.

NISSE, C.; HAGUENOER, J. M.; GRANDBASTIEN, B.; PREUDHOMME, C.; FONTAINE, B.; BRILLET, J. M.; LEJEUNE, R.; FENAUX, P. Occupational and environmental risk factors of the myelodysplastic syndromes in the North of France. **Br. J. Haematol.**, v. 112, n. 4, p. 927-935, 2001.

NOHL, H. Involvement of free radicals in ageing: a consequence senescence. **Br. Med. Bull.**, v. 49, n. 3, p. 653-667, 1993.

NÖSSLINGER, T.; REISNER, R.; KOLLER, E.; GRÜNER, H.; TÜCHLER, H.; NOWOTNY, H.; PITTERMANN, E.; PFEILSTÖCKER, M. Myelodysplastic syndromes, from French-American-British to World Health Organization: comparison of classifications on 431 unselected patients from a single institution. **Blood.**, v. 98, N. 10, p. 2935-2941, 2001.

OGUMA, S.; YOSHIDA, Y.; UCHINO, H.; MAEKAWA, T.; NOMURA, T.; MIZOGUCHI, H. Clinical characteristics of Japanese patients with primary myelodysplastic syndromes: a cooperative study based on 838 cases. Anemia Study Group of the Ministry of Health and Welfare. **Leuk. Res.**, v. 19, p. 219-225, 1995.

OLIVEIRA, T. M.; SOUZA, F. P.; JARDIM, A. C.; CORDEIRO, J. A.; PINHO, J. R. R.; SITNIK, R.; ESTEVÃO, I. F.; BONINI-DOMINGOS, C. R.; RAHAL, P. HFE gene mutations in Brazilian thalassemic patients. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 39, n. 12, p. 1575-1580, 2006.

OLIVIERI, N. F. The beta-thalasseмии. **N. Eng. J. Med.**, v. 341, p. 99-109, 1999.

ORIANI, A.; ANNALORO, C.; SOLIGO, D.; POZZOLI, E.; CORTELEZZI, A.; LAMBERTENGI DELILIERI, G. Bone marrow histology and CD34 immunostaining in the prognostic evaluation of primary myelodysplastic syndromes. **Br. J. Haematol.**, v. 92, n. 2, p. 360-364, 1996.

PAGLIA, D. E.; VALENTINE, W. N. Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. **J. Lab. Clin. Med.**, v. 70, n. 1, p. 158-169, 1967.

PARNES, A.; NIKIFOROW, S.; BERLINER, N.; VANASSE, G. J. Single nucleotide polymorphisms in the human TNF gene are associated with anaemia and neutropenia in a cohort of patients with de novo myelodysplastic syndrome. **Br. J. Haematol.**, v. 150, p. 700-730, 2010.

PATHARE, A.; KINDI, S. A.; ALNAQDY, A. A.; DAAR, S.; KNOX-MACAULAY, H.; DENNISON, D. Cytokine profile of sickle cell disease in Oman. **Am. J. Hematol.**, v. 77, n. 4, p. 323-328, 2004.

PEDERSEN-BJERGAARD, J.; ANDERSEN, M. T.; ANDERSEN, M. K. Genetic pathways in the pathogenesis of therapy-related myelodysplasia and acute myeloid leukemia. **Hematology Am. Soc. Hematol. Educ. Program.**, p. 3927, 2007.

PIETRANGELO, A. Hereditary hemochromatosis--a new look at an old disease. **N. Engl. J. Med.**, v. 23, p. 2383-2397, 2004.

\_\_\_\_\_. Hereditary hemochromatosis. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1763, p. 700-710, 2006.

\_\_\_\_\_. Hereditary hemochromatosis: pathogenesis, diagnosis, and treatment. **Gastroenterology**, v. 139, p. e1-e2, 2010.

\_\_\_\_\_. Inherited metabolic disease of the liver. **Curr. Opin. Gastroenterol.**, v. 25, n. 3, p. 209-214, 2009.

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, p. 1110-1112, 2009.

PIPERNO, A. Classification and diagnosis of iron overload. **Haematologica**, v. 83, p. 447-455, 1998.

PORTER, J. B. Practical management of iron overload. **Br. J. Haematol.**, v. 115, p. 239-252, 2001.

\_\_\_\_\_. Monitoring and treatment of iron overload: state of the art and new approaches. **Semin. Hematol.**, v. 42, suppl. 1, p. 14-18, 2005.

PUNTAROLO, S. Iron, oxidative stress and human health. **Mol. Aspects Med.**, v. 26, n. 4-5, p. 299-312, 2005.

RANJEKAR, P. K.; HINGE, A.; HEGDE, M. V.; GHATE, M.; KALE, A.; SITASAWAD, S.; WAGH, U. V.; DEBSIKDAR, V. B.; MAHADIK, S. P. Decreased antioxidant enzymes and membrane essential polyunsaturated fatty acids in schizophrenic and bipolar mood disorder patients. **Psychiatry Res.**, v. 121, n. 2, p. 109-122, 2003.

RAZA, A.; MEYER, P.; DUTT, D.; ZORAT, F.; LISAK, L.; NASCIMBEN, F.; DU RANDT, M.; KASPAR, C.; GOLDBERG, C.; LOEW, J.; DAR, S.; GEZER, S.; VENUGOPAL, P.; ZELDIS, J. Thalidomide produces transfusion independence in long-standing refractory anemias of patients with myelodysplastic syndromes. **Blood**, v. 98, n. 4, p. 958-965, 2001.

REES, D. C.; GIBSON, J. S. Biomarkers in sickle cell disease. **Br. J. Haematol.**, v. 156:, p. 433-445, 2011.

REES, D. C.; WILLIAMS, T. N.; GLADWIN, N. T. Sickle-cell disease. **Lancet**, v. 376, n. 9757, p. 2018-2831, 2010.

REPETTO, L.; FRATINO, L.; AUDISIO, R. A.; VENTURINO, A.; GIANNI, W.; VERCELLI, M.; PARODI, S.; DAL LAGO, D.; GIOIA, F.; MONFARDINI, S.; AAPRO, M. S.; SERRAINO, D.; ZAGONEL, V. Comprehensive geriatric assessment Adds information to Eastern Cooperative Oncology Group performance status in elderly

cancer patients: an Italian Group for Geriatric Oncology Study. **J. Clin. Oncol.**, v. 20, n. 2, p. 494-502, 2002.

RHODES, D. A.; TROWSDALE, J. Alternate splice variants of the hemochromatosis gene *HFE*. **Immunogenetics**, v. 49, p. 357-359, 1999.

RIBEIRO JUNIOR, H. L. **Estudos de genes relacionados a mecanismos de reparo em danos de DNA em pacientes portadores de síndrome mielodisplásica**. 2013. 112f. Dissertação (Mestrado em Ciências Médicas) – Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas, Departamento de Medicina Clínica, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2013.

RIZZO, J. D.; SOMERFIELD, M. R.; HAGERTY, K. L.; SEIDENFELD, J.; BOHLIUS, J.; BENNETT, C. L.; CELLA, D. F.; DJULBEGOVIC, B.; GOODE, M. J.; JAKUBOWSKI, A. A.; RARICK, M. U.; REGAN, D. H.; LICHTIN, A. E. Use of epoetin and darbepoetin in patients with cancer: 2007 American Society of Clinical Oncology/American Society of Hematology clinical practice guideline update. **J. Clin. Oncol.**, v. 26, n. 1, p. 132-149, 2008.

ROLLISON, D. E.; HOWLADER, N.; SMITH, M. T.; STROM, S. S.; MERRITT, W. D.; RIES, L. A.; EDWARDS, B. K.; LIST, A. F. Epidemiology of myelodysplastic syndromes and chronic myeloproliferative disorders in the United States, 2001-2004, using data from the NAACCR and SEER programs. **Blood**, v. 112, n. 1, p. 45-52, 2008.

ROMEO, M.; CHAUFFAILLE, M. D. E. L.; SILVA, M. R.; BAHIA, D. M.; KERBAUY, J. Comparison of cytogenetics with FISH in 40 myelodysplastic syndrome patients. **Leuk. Res.**, v. 26, p. 993-996, 2002.

ROSENFELD, C.; LIST, A. A hypothesis for the pathogenesis of myelodysplastic syndromes: implications for new therapies. **Leuk. Res.**, v. 14, p. 2-8, 2000.

SAIGO, K.; KONO, M.; TAKAGI, Y.; TAKENOKUCHI, M.; HIRAMATSU, Y.; TADA, H.; HISHITA, T.; MISAWA, M.; IMOTO, S.; IMASHUKU, S. Deferasirox reduces oxidative stress in patients with transfusion dependency. **J. Clin. Med. Res.**, v. 5, n. 1, p. 57- 60, 2013.

SAIGO, K.; TAKENOKUCHI, M.; HIRAMATSU, Y.; TADA, H.; HISHITA, T.; TAKATA, M.; MISAWA, M.; IMOTO, S.; IMASHUKU, S. Oxidative stress levels in Myelodysplastic Syndrome Patients: their relationship to serum ferritin and haemoglobin values. **J. Int. Med. Res.**, v. 39, p. 1941-1945, 2011.

SALLMYR, A.; FAN, J.; RASSOUL, F. V. Genomic instability in myeloid malignancies: increased reactive oxygen species (ROS), DNA double strand breaks (DSBs) and error-prone repair. **Cancer Lett.**, v. 207, p. 1-9, 2008.

SALVIONI, A.; MARIANI, R.; OBERKANINS, C.; MORITZ, A.; MAURI, V.; PELUCCHI, S.; RIVA, A.; AROSIO, C.; CERUTTI, P.; PIPERNO, A. Prevalence of C282Y and E168X *HFE* mutations in an Italian population of northern European ancestry. **Haematologic**, v. 88, n. 3, p. 250-255, 2003.

SANTINI, V.; GIRELLI, D.; SANNA, A.; MARTINELLI, N.; DUCA, L.; CAMPOSTRINI, N.; CORTELEZZI, A.; CORBELLA, M.; BOSI, A.; REDA, G.; OLIVIERI, O.; CAPPELLINI, M. D. Hpcidin levels and their determinants in different types of Myelodysplastic Syndromes. **PLoS One**, v. 6, n. 8, p. e23109, 2011.

SANTOS, P. C. J. L.; CANÇADO, R. D.; TERADA, C. T. et al. Relação entre mutações no gene HFE e TFR2 e alterações nos parâmetros de ferro segundo a frequência de doação em doadores de sangue. **Rev. Bras. Hematol. Hemoter.** v. 30, n. 4, p. 21, 2008.

SANTOS, P. C. J. L.; KRIEGER, J. E.; PEREIRA, A. C. Molecular diagnostic and pathogenesis of Hereditary Hemochromatosis. **Int. J. Mol. Sci.**, v. 13, p. 1497-1511, 2012. COLOCAR OS 3 AUTORES

SANTOS, T. E. J.; SOUZA, G. F.; BARBOSA, M. C.; GONÇALVES, R. P. The role of iron overload on oxidative stress in sickle cell anemia Summary. **Biomarkers Med.**, v. 6, n. 6, p. 813-819, 2012.

SANZ, G.; NOMDEDEU, B.; SUCH, E.; et al. Independent impact of iron overload and transfusion dependency on survival and leukemic evolution in patients with myelodysplastic syndrome. **Blood**, v. 112, 2008. Abstract 640.

SASSI, R.; HMIDA, S.; KAABI, H.; HAJJEJ, A.; ABID, A.; ABDELKEFI, S.; YACOUB, S.; MAAMAR, M.; MOJAAT, N.; BEN HAMED, L.; BELLALI, H.; DRIDI, A.; JRIDI, A.; MIDOUNI, B.; BOUKEF, M. K. Prevalence of C282Y and H63D mutations in the haemochromatosis (*HFE*) gene in Tunisian population. **Ann. Génét.**, v. 47, n. 4, p. 325-330, 2004.

SCHAFER, F. Q.; BUETTNER, G. R. Redox state of the cell as viewed through the glutathione disulfide/glutathione couple. **Free Radic. Biol. Med.**, v. 30, n. 11, p. 1191-1212, 2001.

SCHANZ, J.; TUCHLER, H.; SOLÉ, F.; MALLO, M.; LUÑO, E.; CERVERA, J.; GRANADA, I. et al. New comprehensive cytogenetic scoring system for primary myelodysplastic syndromes (MDS) and oligoblastic acute myeloid leukemia after MDS derived from an international database merge. **J. Clin. Oncol.**, v. 30, n. 8, p. 820-829, 2012.

SCOLET, V.; LE GAC, G.; MÉROUR, M. C.; MERCIER, A. Y.; CHANU, B.; KA, C.; MURA, C.; NOUSBAUM, J. B.; FÉREC, C. Impact of HFE genetic testing on clinical presentation of hereditary hemochromatosis: new epidemiological data. **BMC Med. Genet.**, v. 6, p. 24, 2005.

SEKERES, M.; COSGROVE, D.; FALCO, A. Managing patients with low-risk MDS. **Clin. Adv. Hematol. Oncol.**, v. 4, p. 1-10, 2006.

SEKERES, M. A. The epidemiology of Myelodysplastic Syndrome. **Hematol. Oncol. Clin. North Am.**, v. 24, p. 287-294, 2010.



SEKERES, M. A.; SCHOONEN, W. M.; KANTARJIAN, H.; LIST, A.; FRYZEK, J.; PAQUETTE, R.; MACIEJEWSK, J. P. Characteristics of US patients with myelodysplastic syndromes: results of six cross-sectional physician surveys. **J. Natl. Cancer Inst.**, v. 100, n. 21, p. 1542-1551, 2008.

SHAFFER, L. G.; TOMMERUP, N. (Eds.). **ISCN 2005: An International System for Human Cytogenetic Nomenclature**. Basel: Karger, 2005.

SHANDER, A.; CAPPELLINI, M. D.; GOODNOUGH, L.T. Iron overload and toxicity: the hidden risk of multiple blood transfusions. **Vox Sang.**, v. 97, p. 185-197, 2009.

SHETTY, V.; HUSSAINI, S.; BROADY-ROBINSON, L.; ALLAMPALLAM, K. Intramedullary apoptosis of hematopoietic cells in myelodysplastic syndrome patients can be massive: apoptotic cells recovered from high density fraction of bone marrow aspirates. **Blood**, v. 96, p.1388-1392, 2000.

SIAH, C. W.; OMBIGA, J.; ADAMS, L. A.; TRINDER, D.; OLYNYK, J. K. Normal iron metabolism and the pathophysiology of iron overload disorders. **Clin. Biochem. Rev.**, v. 27, n. 1, p. 5-16, 2006.

SIMONSEN, K.; DISSING, J.; RUDBECK, L.; SCHWARTZ, M. Rapid and simple determination Hereditary Haemochromatosis mutation by multiplex PCR-SSCP: detection of a new polymorphic mutation. **Ann. Hum. Genet.**, v. 63, p. 3, p. 193-197, 1999.

SIQUEIRA, E. M. A.; ALMEIDA, S. G.; ARRUDA, S. Papel adverso do ferro no organismo. **Comum. Ciênc. Saúde**, v. 17, n. 3, p. 229-236, 2006.

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 968 patients with primary myelodysplastic syndromes. **Haematologica**, v. 90, n. 9, p. 1168-1178, 2005.

SPERR, W. R.; WIMAZAL, F.; KUNDI, M.; BAUMGARTNER, C.; NOSSLINGER, T.; MAKRAI, A.; STAUDER, R.; KRIEGER, O.; PFEILSTÖCKER, M.; VALENT, P. Comorbidity as prognostic variable in MDS: comparative evaluation of the HCTCI and CCI in a core dataset of 419 patients of the Austrian MDS Study Group. **Ann. Oncol.**, v. 21, n. 1, p. 114-119, 2010.

STEENSMA, D.P. The changing classification of myelodysplastic syndromes: what's in a name? **Hematol. Am. Soc. Hematol. Educ. Program**. p. 645-655, 2009.

STEENSMA, D.P. The spectrum of molecular aberrations in myelodysplastic syndromes: in the shadow of acute myeloid leukemia. **Haematologica**; v. 92, p. 723-727, 2007.

STEENSMA, D.P.; BENNETT, J.M.; The myelodysplastic syndromes: diagnosis and treatment. **Mayo Clin Proc**, v. 81: p. 104–130, 2006.

STRYER, L. **Biochemistry**. 4. ed. New York: W.H.Freeman, 1995. p.131-135.

SURVEILLANCE, EPIDEMIOLOGY, AND END RESULTS (SEER). **Cancer statistics**. Disponível em:<URL:http://seer.cancer.gov/statistics/>. Acesso em: 7 nov. 2011.

SWERDLOW, S.H.; CAMPO, E.; HARRIS, N. L. *et al.* **WHO classification of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues**. Lyon: IARC Press; 2008. (IARC WHO Classification of Tumours, n.2).

TAKAHASHI, K. Glutathione peroxidase; coupled enzyme assay. In: TANIGUCHI, N.; GUTTERIDGE, J. M. C. (Eds.). **Experimental protocols for reactive oxygen and nitrogen species**. New York: Oxford University Press, 2008. p. 79-82.

TAKATOKU, M.; UCHIYAMA, T.; OKAMOTO, S.; KANAKURA, Y.; SAWADA, K.; TOMONAGA, M.; NAKAO, S.; NAKAHATA, T.; HARADA, M.; MURATE, T.; OZAWA, K. Retrospective nationwide survey of Japanese patients with transfusion-dependent MDS and aplastic anemia highlights the negative impact of iron overload in morbidity/mortality. **Eur. J. Haematol.**, v. 78, p. 487-494, 2007.

TEFFERI, A.; VARDIMAN, J. W. Mechanisms of disease: myelodysplastic syndromes. **N. Engl. J. Med.**, v. 361, p. 1872-1885, 2009.

TELEN, M. J.; KAUFMAN, R. The mature erythrocyte. In: LEE, G.R. *et al.* **Wintrobe's clinical hematology**. Baltimore: Williams & Wilkins, 1999. cap. 10, p.193-227.

TERADA, C. T.; SANTOS, P, C.; CANÇADO, R. D.; ROSTELATO, S.; LOPREATO, F. R.; CHIATTONI, C. S.; GUERRA-SHINOHARA, E. M. Iron deficiency and frequency of HFE C282Y gene mutation in Brazilian blood donors. **Transfus. Med.**, v. 19, n. 5, p. 245-251, 2009.

TIEN, H. F.; WANG, C. H.; CHUANG, S. M.; CHOW, J. M.; LEE, F. Y.; LIU, M. C.; CHEN, Y. C.; SHEN, M. C.; LIN, D. T.; LIN, K. H. Cytogenetic studies, ras mutation, and clinical characteristics in primary myelodysplastic syndromes: a study on 68 Chinese patients in Taiwan. **Cancer Genet. Cytogenet.**, v. 74, n. 1, p. 40-49, 1994.

TORRES, F. R.; SOUZA-NEIRAS, W. C.; D'ALMEIDA COUTO, A. A.; D'ALMEIDA COUTO, V. S. C.; CAVASINI, C. E.; ROSSIT, A. R. B.; MACHADO, R. L. D.; BONINI-DOMINGOS, C. R. Frequency of the HFE C282Y and H63D polymorphisms in Brazilian malaria patients and blood donors from the Amazon region. **Genet. Mol. Res.**, v. 7, n. 1, p. 60-64, 2008.

TRINDER, D.; FOX, C.; VAUTIER, G.; OLYNYK, J. K. Molecular pathogenesis of iron overload. **Gut**, v. 51, p. 290-295, 2002.

VALENT, P.; BAIN, B. J.; BENNETT, J. M.; Idiopathic cytopenia of undetermined significance (ICUS) and idiopathic dysplasia of uncertain significance (IDUS), and their distinction from low risk MDS. **Leuk. Res.**, v. 36, p. 1-5, 2012.

VALENT, P.; HORNY, H. P.; BENNETT, J. M.; FONATSCH, C.; GERMING, U.; GREENBERG, P.; HAFERLACH, T. *et al.* Definitions and standards in the diagnosis and treatment of the myelodysplastic syndromes: consensus statements and report from a working conference. **Leuk. Res.**, v. 31, p. 727-736, 2007.

VASCONCELOS, S. M. L.; GOULART, M. O. F.; MOURA, J. B. F.; BENFATO, V. M. M. S.; KUBOTA, L. T. Espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio, antioxidantes e marcadores de dano oxidativo em sangue humano: principais métodos analíticos para sua determinação. **Quim. Nova**, v. 30, n. 5, p. 1323-1338, 2007.

VASSALLO, J.; MAGALHÃES, S. M. M. Síndromes mielodisplásicas e mielodisplásicas/mieloproliferativas. **Rev. Bras. Hematol. Hemoter.**, v. 31, p. 267-272, 2009.

VENTURINI, D.; SIMÃO, A. N. C.; BARBOSA, D. S.; LAVADO, E. L.; NARCISO, V. E.; DICHI, I.; DICHI, J. B. Increased oxidative stress, decreased total antioxidant capacity, and iron overload in untreated patients with chronic hepatitis C. **Dig. Dis. Sci.**, v. 55, n. 4, p. 1120-1127, 2010.

VERHOEF, G. E. G.; DE SCHOUWER, P.; CEUPPENS, J. L.; VAN DAMME, J.; GOOSEENS, W.; BOOGAERTS, M. A. Measurement of serum cytokine levels in patients with myelodysplastic syndromes. **Leukemia**, v. 6, n. 12, p. 1268-1272, 1992.

VIANA-BARACIOLI, L. M. S.; TUKAMOTO JÚNIOR, N. C.; RICCI JUNIOR, O.; MATTOS, L. C.; ÂNGULO, I. L.; BONINI-DOMINGOS, C. R. Comparison of oxidative stress and the frequency of polymorphisms in the HFE gene between hemoglobin S trait blood donors and sickle cell disease patients. **Genet. Mol. Res.**, v. 10, n. 4, p. 3446-3454, 2011.

WAHEED, A.; PARKKILA, S.; ZHOU, X. Y.; TOMATSU, S.; TSUCHIHASHI, Z.; FEDER, J. N.; SCHATZMAN, R. C.; BRITTON, R. S.; BACON, B. R.; SLY, W. S. Hereditary hemochromatosis: effects of C282Y and H63D mutations on association with b2-microglobulin, intracellular processing, and cell surface expression of the *HFE* protein in COS-cells. **Proc. Natl. Acad. Sci.** v. 94, n. 23, p. 12384-12389, 1997.

WIJAYANTI, N.; KATZ, N.; IMMENSCHUH, S. Biology of heme in health and disease. **Curr. Med. Chem.**, v. 11, n. 8, p. 981-986, 2004.

YANG, H. TNF- $\alpha$  inhibits asbestosinduced cytotoxicity via a NF- $\kappa$ B-dependent pathway, a possible mechanism for asbestosinduced oncogenesis. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, v. 103, p.10397-10402, 2006.

YOO, J. H.; MAENG, H. Y.; SUN, Y. K.; KIM, Y. A.; PARK, D. W.; PARK, T. S.; LEE, S. T.; CHOI, J. R. Oxidative status in iron-deficiency anemia. **J. Clin. Lab. Anal.**, v. 23, n. 5, p. 319-323, 2009.

YUATAKA, K.; KATSUYA, I.; TAKAOKI, O.; YOSHIHIRO, T.; JUNJI, K. Body iron metabolism and pathophysiology of iron overload. **Int. J. Haematol.**, v. 88, n. 1, p. 7-15, 2008.

ZHANG, Z.; LI, X.; GUO, J.; XU, F.; HE, Q.; ZHAO, Y.; YANG, Y.; GU, S.; ZHANG, Y.; WU, L.; CHANG, C. Interleukin-17 enhances the production of interferon- $\gamma$  and tumour necrosis factor- $\alpha$  by bone marrow T lymphocytes from patients with lower risk myelodysplastic syndromes. **Eur. J. Haematol.**, v. 90, n. 5, p. 375-384, 2013.

ZHAO, W. L.; XU, L.; WU, W.; YAN, H.; TANG, W.; HU, J.; CHEN, Y.; LI, J. M.; ZENG, X. Y.; XIONG, S. M.; SHEN, Z. X.; CHEN, Z.; WANG, Z. Y.; CHEN, S. J. The myelodysplastic syndromes: analysis of prognostic factor and comparison of prognostic systems in 128 Chinese patients from a single institution. **Hematol. J.**, v. 3, n. 3, p. 137-144, 2002.

ZHENG, Z.; QIANQIAO, Z.; QI, H.; FENG, X.; CHUNKANG, C.; XIAO, L. In vitro deprivation of CD8 (+)CD57(+)T cells promotes the malignant growth of bone marrow colony cells in patients with lower-risk myelodysplastic syndrome. **Exp. Hematol.**, v. 38, p. 677-684, 2010.

ANEXOS E  
APÊNDICES

## APÊNDICE A

### TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO PARA PARTICIPAÇÃO EM PESQUISA

Você está sendo convidado (a) para participar da pesquisa: “**RELAÇÃO DO DANO OXIDATIVO, MUTAÇÃO DO GENE HFE E FATOR DE NECROSE TUMORAL (TNF - $\alpha$ ) COM A SOBRECARGA DE FERRO TRANSFUSIONAL EM PORTADORES DE SÍNDROMES MIELODISPLÁSTICAS**”, que tem como objetivo analisar o dano causado pelo excesso de ferro decorrente de múltiplas transfusões.

Em caso de dúvida, poderá comunicar-se com a pesquisadora Dra. Sílvia Maria Meira Magalhães, no Serviço de Hematologia do Hospital Universitário Walter Cantídio – UFC à Rua Capitão Francisco Pedro, 1290, Rodolfo Teófilo, Fortaleza, CE. Fone: (0xx85)-3366 8623. Para tanto, necessitamos que a Senhor (a) autorize a obtenção da coleta de sangue no Serviço de Hematologia, localizado na Rua Capitão Francisco Pedro, 1290, Rodolfo Teófilo.

A participação do (a) senhor (a) na pesquisa será plenamente voluntária e consciente, não havendo qualquer pagamento ou compensação material, sendo que, ao participar da pesquisa, não ficará exposto (a) a nenhum risco, podendo desistir a qualquer momento, sem prejuízo de sua assistência médica. Sua identidade será mantida em sigilo absoluto, sendo a divulgação dos resultados ficando restrita à discussão acadêmica sem qualquer identificação. Será, no entanto, permitido o acesso às informações sobre procedimentos relacionados à pesquisa. Esse documento será impresso em duas vias, ficando uma com o entrevistado e a outra com a pesquisadora. Certo e ciente dos detalhes acima descritos, e, por concordar na íntegra com todos os termos acima expostos, manifestos, por vontades próprias, livres e conscientes, o propósito de participar do presente estudo.

Fortaleza, \_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_.

---

Participante do Projeto de pesquisa

Responsável pelo preenchimento do termo

## APÊNDICE B

### TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO PARTICIPAÇÃO EM PESQUISA COMO GRUPO CONTROLE

Você está sendo convidado (a) a participar, voluntariamente, **como grupo controle**, de uma pesquisa “**RELAÇÃO DO DANO OXIDATIVO, MUTAÇÃO DO GENE HFE E FATOR DE NECROSE TUMORAL (TNF - $\alpha$ ) COM A SOBRECARGA DE FERRO TRANSFUSIONAL EM PORTADORES DE SÍNDROMES MIELODISPLÁSTICAS**”. Para isso, necessitamos que o Senhor (a) autorize a obtenção de uma amostra de sangue para analisarmos as condições do estresse oxidativo no intuito de monitorizar os tratamentos e tornar melhor a qualidade de vida dos pacientes submetidos à politransfusões sanguíneas.

A participação do (a) senhor (a) na pesquisa será consciente, não havendo qualquer forma de pagamento ou compensação material. Sua identidade será mantida em sigilo absoluto, sendo a divulgação dos resultados totalmente proibida a terceiros, ficando restrita à discussão acadêmica de âmbito científico e, ainda assim, sem qualquer identificação.

Em caso de dúvida, poderá comunicar-se com a pesquisadora Dra. Sílvia Maria Meira Magalhães, no Serviço de Hematologia do Hospital Universitário Walter Cantídio – UFC à Rua Capitão Francisco Pedro, 1290, Rodolfo Teófilo, Fortaleza-CE. Fone: (0xx85)-3366 8623. Esse documento será impresso em duas vias, ficando uma com o senhor (a) e outra com a pesquisadora.

Certo e ciente dos detalhes acima descritos, e, por concordar na íntegra com todos os termos acima expostos, manifestos, por vontades próprias, livres e conscientes, o propósito de participar do presente estudo.

Fortaleza, \_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_  
Assinatura do participante RG: \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_  
Assinatura do Pesquisador RG: \_\_\_\_\_

**APÊNDICE C**  
**PROTOCOLO - QUESTIONÁRIO**

<b>Data do Cadastro:</b>					<b>Nº.</b>		<b>Início da medicação:</b>		
<b>Nome:</b>					<b>Prontuário:</b>		<b>Telefone:</b>		
<b>Data de Nascimento:</b>					<b>Sexo:</b> ( ) M ( ) F				
<b>Profissão:</b>					<b>Doença Base:</b> ( ) SMD				
<b>Exame físico (aumento do fígado ou baço)</b> ( ) Sim ( ) Não ( ) Não registrado									
<b>Número de Transfusões</b>									
<b>Basal</b>	<b>3 meses</b>	<b>6 meses</b>	<b>12 meses</b>	<b>18 meses</b>	<b>24 meses</b>	<b>30 meses</b>	<b>36 meses</b>	<b>42 meses</b>	
<b>LDH/Ác. úrico</b>					<b>Ferritina</b>				
<b>Basal</b>	<b>3 meses</b>	<b>6 meses</b>	<b>9 meses</b>	<b>12 meses</b>	<b>Basal</b>	<b>3 meses</b>	<b>6 meses</b>	<b>12 meses</b>	
<b>Hemoglobina</b>					<b>Hematócrito</b>				
<b>Basal</b>	<b>3 meses</b>	<b>6 meses</b>	<b>9 meses</b>	<b>12 meses</b>	<b>Basal</b>	<b>3 meses</b>	<b>6 meses</b>	<b>12 meses</b>	
<b>Índice de Saturação da Transferrina (IST)/ CTLF</b>					<b>AST</b>				
<b>Basal</b>	<b>3 meses</b>	<b>6 meses</b>	<b>9 meses</b>	<b>12 meses</b>	<b>Basal</b>	<b>3 meses</b>	<b>6 meses</b>	<b>9 meses</b>	<b>12 meses</b>
<b>ALT</b>					<b>Creatinina/Ureia</b>				
<b>Basal</b>	<b>3 meses</b>	<b>6 meses</b>	<b>9 meses</b>	<b>12 meses</b>	<b>Basal</b>	<b>3 meses</b>	<b>6 meses</b>	<b>9 meses</b>	<b>12 meses</b>
<b>PCR</b>									
					<b>Mutação 1</b>	<b>Mutação 2</b>	<b>Mutação 3</b>		
<b>Leucograma - Basal</b>			<b>Leucograma - 6 meses</b>			<b>Leucograma - 12 meses</b>			
<b>*</b>	<b>Absoluto</b>	<b>%</b>	<b>*</b>	<b>Absoluto</b>	<b>%</b>	<b>*</b>	<b>Absoluto</b>	<b>%</b>	
<b>WBC</b>									
<b>NEU</b>									
<b>PLT</b>									
<b>Enzima</b>	<b>Basal</b>	<b>6 meses</b>	<b>12 meses</b>	<b>Observações:</b> _____ _____ _____ _____ _____					
<b>Catalase</b>									
<b>GPx</b>									
<b>SOD</b>									
<b>Nitrito</b>									
<b>MDA</b>									
<b>TNF<math>\alpha</math></b>									

## ANEXO A

**Características clínicas e demográficas de 124 portadores de SMD atendidos de maio de 2010 a setembro de 2011, no serviço de hematologia da Universidade Federal do Ceará.**

CARACTERÍSTICAS	DESCRIÇÃO
<b>Sexo</b>	
Masculino	53 (42,7%)
Feminino	71 (57,3%)
<b>Idade (anos)</b>	
Média/Intervalo	65,2 (16-95)
<60	44,1 (32,3%)
≥60	75,2 (67,7%)
<b>Procedência</b>	
Interior	29 (23,4%)
Capital	80 (64,5%)
Não Informado	15 (12,1%)
<b>Classificação</b>	
SMD primária	116 (93,5%)
SMD secundária	08 (6,5%)
<b>Classificação OMS (2008)</b>	
CRDM	63/116 (54,3%)
AR	22/116 (19,0%)
ARSA	15/116 (12,9%)
AREB I	08/116 (6,9%)
AREB II	08/116 (6,9%)
<b>Nº de citopenias</b>	
0/1	58 (46,8%)
2/3	66 (53,2%)
<b>Dependência transfusional (%)</b>	
SIM	53 (42,7%)
NÃO	71 (57,3%)
<b>Hemoglobina (g/dL)</b>	
≤ 10	67 (54%)
>10	57 (46%)
<b>Plaquetas (mm<sup>3</sup>)</b>	
≤ 100.000	49 (39,5%)
>100.000	75 (60,5%)
<b>Neutrófilos (mm<sup>3</sup>)</b>	
≤ 1.800	71 (57,3%)



> 1.800 53 (42,7%)

**Variáveis laboratoriais (média)**

Hemoglobina	9,5 g/dL
Hematócrito	29,5%
Leucócitos	5.398 mm <sup>3</sup>
Plaquetas	162.070 mm <sup>3</sup>
AST/TGO	28 U/L
ALT/TGP	28 U/L
Uréia	33,8 mg/dL
Creatinina	1,0 mg/dL
Ferritina	852,56 ng/mL
Ferro Sérico	127,5 µg/dL
STF	49%
CTLF	265,48 mg/dL

SMD: síndrome mielodisplástica; AR (anemia refratária); ARSA (AR com sideroblastos em anel);

CRDM (citopenia refratária com displasia multilineagem); AREB I e II (anemia refratária com excesso de blastos); ALT (alanina aminotransferase); AST (aspartato aminotransferase); STF (saturação da transferrina); CTLF (capacidade total de ligação do ferro)

## ANEXO B

### PROTOCOLOS

#### **CITOCINA (*TNF- $\alpha$* )**

A citocina TNF  $\alpha$  foi dosada por Elisa através do kit específico da e-Bioscience® da forma que se segue:

#### **Procedimento**

1. Colocar 100  $\mu$ L/poço de anticorpo de captura em tampão de revestimento. Selar a placa e incubar durante a noite a 4°C.
2. Aspirar cada poço e lavar 5 vezes com 250 $\mu$ L/poço. Esperar 1 minuto durante cada passo de lavagem. Bater a placa sobre papel absorvente para remover qualquer tampão residual.
3. Colocar 200  $\mu$ L/poço do diluente de ensaio 1x. Incubar a temperatura ambiente durante 1 hora.
4. Aspirar e lavar como no passo 2. Repetir para um total de 5 lavagens.
5. Adicionar 100  $\mu$ L/poço do padrão aos poços apropriados. Executar duas diluições para fazer a curva padrão.
6. Adicionar 100  $\mu$ L/poço das amostras aos poços apropriados. Cobrir ou selar a placa e incubar a temperatura ambiente durante 2 horas (ou durante a noite a 4°C para a sensibilidade máxima).
7. Aspirar e lavar como no passo 2. Repetir para um total de 5 lavagens.
8. Adicionar 100  $\mu$ L/poço de anticorpo de detecção. Selar a placa e incubar a temperatura ambiente durante 1 hora.
9. Aspirar e lavar como no passo 2. Repetir para um total de 5 lavagens.
10. Adicionar 100  $\mu$ L/poço de avidina-HRP. Selar a placa e incubar a temperatura ambiente durante 30 minutos.
11. Aspirar e lavar como no passo 2. Repetir um total de 7 lavagens.
12. Adicionar 100  $\mu$ L/poço de solução de substrato a cada poço. Incubar a placa a temperatura ambiente durante 15 minutos.
13. Adicionar 50  $\mu$ L de solução de parada em cada poço.
14. Realizar a leitura da placa em 450 nm.

## **CITOGENÉTICA CLÁSSICA**

### **Coleta de medula óssea**

Colher aproximadamente 2 a 3 mL de medula óssea em seringa 20cc contendo 1 a 2 mL de heparina. Obs.: Manter a agulha na seringa durante o transporte do material.

### **Procedimento**

#### **Cultura (1º dia)**

1. Transferir amostra para tubo Falcon de 15 mL (capela de fluxo laminar - ambiente estéril).
2. Acrescentar 1 mL de RPMI.
3. Homogeneizar lentamente por inversão.
4. Centrifugar 1200 rpm.
5. Remover o máximo possível do sobrenadante com auxílio de pipeta.
6. Aspirar camada de leucócitos com pipeta Pasteur, após centrifugação e adicionar 6 gotas do material em cada tubo T (contendo 3 mL de soro fetal e 7 mL de RPMI).
7. Incubar cultura em estufa de CO<sub>2</sub> a 37°C por 23h30min

#### **Bloqueio do fuso mitótico/ choque hipotônico/ fixação (2º dia)**

1. Adicionar 70 µL de Colcemid em cada tubo T.
2. Homogeneizar (desprendendo todo o material das paredes do tubo T) e incubar na geladeira por 30 minutos.
3. Transferir amostra de cada tubo T para um tubo Falcon 15 mL e centrifugar por 10 minutos (1200 rpm).
4. Remover o máximo possível do sobrenadante com auxílio de pipeta.
5. Ressuspender o precipitado com 10 mL de solução hipotônica de KCl 0,075 M lentamente (gota a gota) com o auxílio do agitador de tubos.
6. Deixar a amostra descansar por 20 minutos.
7. Centrifugar por 10 minutos (1200 rpm).
8. Remover o máximo possível o sobrenadante com auxílio de pipeta.
9. Ressuspender o precipitado com 10 mL de solução de Carnoy (ácido acético: metanol, proporção 3:1) lentamente (gota a gota) com o auxílio do agitador de tubos.
10. Deixar a amostra descansar por 20 minutos.

11. Centrifugar por 10 minutos (1200rpm).
12. Desprezar sobrenadante por inversão.
13. Repetir lavagem com solução Carnoy mais 3 vezes (com descanso de 20 minutos entre cada uma).
14. Guardar o material em solução de Carnoy na geladeira.

### **Preparo das lâminas e bandamento (dia 3)**

1. Deixar as lâminas embebidas em um recipiente com álcool comum. Antes de utilizar, limpar as lâminas com gazes.
2. Verificar concentração da amostra (a amostra deverá apresentar um aspecto levemente leitoso). Se necessário, adicionar mais solução Carnoy
3. Pingar 1 gota na lâmina (angulação 45°), deixar a gota percorrer a lâmina e em seguida soprar, para espalhar o material em toda sua extensão.
4. Aquecer as lâminas por 3 minutos na potência máxima (microondas).
5. Imergir a lâmina em tripsina. Contar rigorosamente o tempo de tripsina no cronômetro.
6. Mergulhar a lâmina na solução tampão Sorensen por 3x consecutivas, imediatamente após imersão em tripsina (bloquear a ação da tripsina).
7. Retirar o excesso de tampão em papel filtro.
8. Mergulhar a lâmina nas soluções 1, 2 e 3 do kit Panótico (3x consecutivas em cada solução);
9. Realizar contagem no cronômetro na última solução (Giemsa).
10. Lavar as lâminas em água corrente e enxugar cautelosamente em papel filtro.
11. Observar o resultado de cada tempo em pelo menos 3-4 mitoses por lâmina.
12. Repetir procedimento de bandamento com todas as demais lâminas no mesmo dia, após encontrar o “tempo de banda”.

ARTIGOS  
PUBLICADOS