



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
DEPARTAMENTO DE PATOLOGIA
MESTRADO EM PATOLOGIA

**ALTERAÇÕES NA MEDULA ÓSSEA DE PACIENTES COM DOENÇAS
AUTOIMUNES SOB TRATAMENTO COM IMUNOSSUPRESSORES**

Mestrando: José Djandir Costa Filho
Orientador: Max Victor Carioca Freitas
Co-orientador: Ronald Feitosa Pinheiro

Fortaleza

2014

JOSÉ DJANDIR COSTA FILHO

**ALTERAÇÕES DE MEDULA ÓSSEA DE PACIENTES COM DOENÇAS
AUTOIMUNES SOB TRATAMENTO COM IMUNOSSUPRESSORES**

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

Orientador: Prof. Dr. Max Victor Carioca Freitas

Fortaleza

2014

JOSÉ DJANDIR COSTA FILHO

**ALTERAÇÕES DE MEDULA ÓSSEA DE PACIENTES COM DOENÇAS
AUTOIMUNES SOB TRATAMENTO COM IMUNOSSUPRESSORES**

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

Defesa em: 22/07/2014

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Max Victor Carioca Freitas (orientador)
(Universidade Federal do Ceará)

Prof. Dr. José Ajax Nogueira Queiroz
Membro da banca examinadora
Universidade Federal do Ceará

Prof. Dr. Francisco Saraiva da Silva Júnior
Membro da banca examinadora
Universidade Federal do Ceará

Carlos Nobre Rabelo Júnior
Membro da banca examinadora
UNICHRISTUS

À minha incomparável esposa, principal incentivadora deste trabalho. Pois quantas não foram as vezes que pensei em desistir frente a desafios e contingências que a vida apresentava. Mas sabiamente me convencia do contrário com palavras certas, ditas a seu tempo; como quem serve maçãs de ouro em bandejas de prata. E pela atitude de auxiliadora idônea, que expressa superlativamente mais do que incontáveis palavras.

Aos meus pais e irmãos e familiares.

Ao meu primo Tércio (*in memoriam*) e família.

AGRADECIMENTOS

A minha esposa **Janaína Maria Brito Teixeira Costa** e meu filho **Samuel Pedro Teixeira Costa**, que aceitaram abrir mão do tempo de convivência, e tudo que isso pode implicar, para conclusão desse desafio, o qual enfrenatamos juntos em meio a tantos outros que a vida nos impôs nesses dois anos. Amadurecemos juntos. E ao olhar para trás, mesmo em meio a tantas lutas, meus olhos enxergam principalmente a felicidade incondicional de vivermos O Propósito Eterno dentro do nosso pequeno mundo, que chamamos carinhosamente de lar.

Aos meus pais **José Djandir Costa** e **Maria Helda Garcia Costa**, que tanto se esmeraram para me dar um base educacional sólida e, acima de tudo, amor e temor a Deus. À minha querida irmã **Aline Maria Garcia Costa e Melo**, pelo apoio, carinho e cuidado; não apenas pessoal, mas também profissional. Ao meu irmão **Paulo Ewerton Garcia Costa**, que cursou concomitantemente mestrado no departamento de cirurgia, com quem dividi as angústias de desbravar o universo da pesquisa acadêmica em meio a uma vida profissional já tão atribulada pelos compromissos com a assistência a pacientes. Obrigado também pelos muitos conselhos.

Ao meu cunhado e amigo **Antônio Aldo Melo Filho** cuja participação foi de intangível importância na minha dissertação e na do meu irmão. Sua amizade e o cuidado com a estatística desse trabalho é algo que expressa não apenas sua cooperação como familiar, mas também seu compromisso com a pesquisa dessa região tão menosprezada de um país onde o pouco investido é sublocado nas mesmas regiões, muitas vezes mais por influência política do que por mérito.

Ao Prof. Dr. **Max Victor Carioca Freitas** pela aceitação em me orientar, mais uma vez, na formação acadêmica – algo que já o faz há 11 anos, desde o tempo do internato. Agradeço também pela amizade e cuidado com minha família, como profissional. E pela oportunidade de dividir a felicidade e as experiências da criação de filhos de maneira tão sublime, que muitos nem cogitam ter. Aquela conversa no ônibus, na volta do congresso ao hotel em Recife, foi algo marcante que guardo como uma lembrança especial de nossa amizade.

Ao Prof. Dr. **Ronald Feitosa Pinheiro** pela aceitação da co-orientação – que apesar do prefixo, foi não menos presente e fundamental para toda execução e análise dos dados do projeto. Obrigado pela paciência. Conselhos valorosos sobre a pesquisa clínica guardarei enquanto viver.

À Prof. Dra. **Marta Maria das Chagas Medeiros** pela amizade e colaboração na parte clínica do trabalho. Grande é admiração que tenho por sua tenacidade na atuação clínica, como reumatologista, e na perseverança na área da pesquisa clínica junto ao serviço de reumatologia do HUWC.

A todo o pessoal que faz o Laboratório de Citogenômica do Câncer, em especial à **Roberta Taiane Germano de Oliveira**, meu anjo da guarda (como diria Dr Ronald), à **Juliana Cordeiro de Sousa**, ao **Howard Lopes Ribeiro Júnior** e ao **Luiz Ivando Pires Ferreira Filho**. Eternamente grato pela amizade e dedicação ao presente trabalho, me orientando com afinco no escasso tempo que conseguia estar na bancada do laboratório e no entendimento da biologia molecular.

Aos prof. Dr. **José Ajax Nogueira**, **Francisco Saraiva da Silva Júnior** e **Carlos Nobre Rabelo Júnior** pela aceitação em fazer parte da banca avaliadora e pelas valorosas amizades de outrora.

A todos os pacientes que aceitaram fazer parte dessa pesquisa. Que ela possa ser útil em aumentar nosso entendimento para oferecer um cuidado cada vez melhor a vocês, enquanto médicos assistentes.

E por último, mas não menos importante (em verdade, o mais importante), sou grato pela oportunidade de viver esses 2 anos adquirindo sabedoria e conhecimento, como nunca antes, na escola dos homens e na escola da vida. Porque Dele e por Ele, para Ele são todas as coisas. Ao **EU SOU** quero expressar muito mais que palavras, mas atitude de gratidão.

RESUMO

Citopenias são achados relativamente comuns em pacientes com doenças autoimunes, particularmente anemia da doença crônica. Atividade inflamatória da doença, infecções, mielotoxicidade pelo tratamento e surgimento de doenças hematológicas estão entre as principais causas de citopenias. Lúpus Eritematoso Sistêmico (LES), Artrite Reumatóide (AR) e Síndrome de Sjögren (SS) são colagenoses que cursam com citopenias durante o curso crônico de suas evoluções. No entanto, o uso de imunossuppressores recomendados para seus tratamentos pode exercer efeito mielotóxico diretamente, contribuindo para o desenvolvimento de citopenias, ou indiretamente através do desenvolvimento de alterações dispásicas na medula óssea (MO). Azatioprina (AZA) e Metotrexate (MTX) são as principais drogas utilizadas no tratamento das colagenoses supracitadas. Mielotoxicidade é o efeito mais temido da AZA cuja incidência cumulativa é de 7% ao ano, podendo acontecer com variação de dias a anos de uso. Os parafeitos descritos para o MTX se dão pela inibição da enzima diidrofolato redutase, diminuindo a síntese do tetraidrofolato, metabólito essencial na hematopoese, levando a taxas de mielotoxicidade de 3 a 11%. O objetivo deste estudo foi avaliar alterações medulares de pacientes com DAI em tratamento com imunossuppressores. Para tanto foram consideradas alterações no hemograma (citopenias), mielograma (morfologia da medula óssea) e cariótipo (alterações citogenéticas). Foram selecionados 25 pacientes com diagnóstico de DAI segundo critérios do *American College of Rheumatology* e critérios revisados para neuromielite óptica (NMO). Os mesmos apresentavam ao menos uma citopenia no sangue periférico, estavam em uso de imunossuppressores, e eram acompanhados nos serviços de reumatologia dos hospitais terciários de Fortaleza. A amostra foi composta por 25 participantes, sendo 64% (16) participantes portadores de AR, 20% (5) portadores de LES e 4%(1) portadores de SS, miastenia gravis e NMO, respectivamente. Um paciente foi excluído por ter apresentado leishmania no estudo da MO. Metotrexate foi utilizada em 70,8% (17), em monoterapia ou associações, seguida de AZA em 29,1%(7) e ciclofosfamida, 4,1%(1). Terapia transfusional foi utilizada em 37,5% (9) da amostra. Infecções clinicamente importantes ocorreram em 33,3% (8) dos participantes. Não houve diferença estatística quanto às transfusões e infecções nos grupos em uso de AZA e MTX. Não houve diferença estatisticamente significativa nos níveis de hemoglobina e nas contagens de leucócitos, linfócitos e plaquetas no grupo em monoterapia com MTX quando comparado ao grupo utilizando associação MTX + leflunomida. Displasias na MO foram verificadas em 29,4% (5) participantes em uso de MTX. Nesse grupo, leucopenia e linfopenia tiveram associação estatisticamente significativa com a presença de displasias importantes na MO (Med leuc = 6200 (12630-3778); $p = 0,0023$ e Med linf = 1964 (3929-833); $p = 0,0006$). Deleção intersticial do braço curto do cromossomo foi verificada em um (1) indivíduo portador de AR em uso de MTX. Alterações displásicas

importantes na MO foram verificadas em 17,6%(3) dos participantes em uso de MTX, sendo diseritropoese a mais frequente. No entanto, não houve associação estatisticamente significativa destas com as citopenias encontradas no grupo ($p > 0,05$). Alterações citogenéticas estiveram presentes em 28,5% (2) participantes em uso de AZA. Um dos indivíduos apresentou deleções intersticiais nos braços longos dos cromossomos 5 e 7 (46,XX,del(5)(q31q33),del7(q32)[4]) enquanto outro, no braço curto do cromossomo 17 (46, XX del(17)(p11.2) [3]). Houve diferença estatisticamente significativa quando comparada contagem de linfócitos no grupo em uso de AZA (Med MTX = 1278 (3929-340); $p = 0,038$) ao grupo em uso de MTX. Anemia apenas mostrou tendência estatística para mesma associação ($p = 0,066$). Necessidade de terapia transfusional e infecções mostraram associação estatisticamente significativa, independente da droga utilizada (Odds ratio = 52,5; IC = 1,81-85,7; $p = 0,0005$). O mesmo não foi verificado quando da associação de complicações clínicas (infecções e/ou transfusões) e ocorrência de displasias importantes na MO ($p > 0,05$). Quanto à interferência na obtenção de metáfases pela técnica da banda G, não houve diferença estatística entre os casos com e sem metáfases ao uso de MTX ou AZA. Alterações citogenéticas não estiveram associadas ao achado de displasias importantes na MO ($p > 0,05$). O estudo evidencia necessidade de monitorização clínica periódica nos pacientes que apresentam complicações (infecções e/ou transfusão), bem como avaliação morfológica da MO, quando da presença de citopenias, uma vez que displasias importantes estão associadas à presença de citopenias. O achado de alterações citogenéticas, mesmo não associadas a displasias importantes na MO, requer seguimento e reavaliação laboratorial por não se conhecer o prognóstico de tais alterações, uma vez que o surgimento de um clone medular leva ao risco de desenvolvimento de SMD-t.

Palavras – chave: citopenias, imunossupressores, doenças autoimunes, mielodisplasia, alterações citogenéticas

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Efeitos secundários do MTX em baixas doses	22
Tabela 2. Estratificação de risco baseada nas alterações citogenéticas	28
Tabela 3. Estratificação de risco na síndrome mielodisplásica (IPSS Revisado)	29
Tabela 4. Manifestações autoimunes associadas com síndrome mielodisplásica	32
Tabela 5. Doenças autoimunes em estudo	37
Tabela 6. Características clínicas dos indivíduos em estudo	42
Tabela 7. Características dos indivíduos em uso de MTX	45
Tabela 8. Características dos indivíduos em uso de AZA	48

Tabela 9. Análise Morfológica e Citogenética da Medula Óssea de todos os indivíduos.	53
---	-----------

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Vias Metabólicas das Tiopurinas.	20
Figura 2. Esquema da ação do gene TP53 como indutor de apoptose e prevenção do surgimento de neoplasias.	26
Figura 3. Organograma – resumo da metodologia utilizada nesse estudo.	39
Figura 4. Associação entre necessidade transfusional e uso de MTX e AZA.	43
Figura 5. Associação entre ocorrência de infecções e uso de MTX e AZA.	43
Figura 6. Comparação da contagem de leucocitos, linfócitos, plaquetas e níveis de hemoglobina entre MTX (monoterapia) e associação MTX + LEF	46
Figura 7. Associação entre ocorrência de displasias e a contagem de leucócitos nos participantes utilizando MTX	46
Figura 8. Associação entre ocorrência de displasias e a contagem de linfócitos nos participantes utilizando MTX	47
Figura 9. Cariótipo evidenciando deleção intersticial do braço longo do cromossomo 5 em indivíduo com AR e uso prolongado de MTX.	47

- Figura 10.** Cariótipo evidenciando deleções interciais nos braços longos dos cromossomos 5 e 7 em indivíduo com LES e uso prolongado de AZA **49**
- Figura 11.** Cariótipo evidenciando deleção intersticial do braço curto do cromossomo 17 em indivíduo com miastenia gravis e uso prolongado de AZA. **49**
- Figura 12.** Análise comparativa entre ocorrência de citopenias e utilização de MTX e AZA **50**
- Figura 13.** Associação entre necessidade transfusional e ocorrência de infecções em todos os participantes. **51**
- Figura 14.** Associação entre presença de displasias significativas na MO e ocorrência de complicações clínicas. **51**
- Figura 15.** Associação entre a interferência na obtenção de metáfases e uso de MTX e AZA **52**
- Figura 16.** Associação entre alterações citogenéticas e ocorrência de displasias significativas na MO dos participantes em uso de MTX e AZA **53**

LISTA DE ABREVIATURAS

Síndrome Mielodisplásica	<i>SMD</i>
Síndrome Mielodisplásica relacionada ao Tratamento	<i>SMD-t</i>
Artrite Reumatóide	<i>AR</i>
Lúpus Eritematoso Sistêmico	<i>LES</i>
Azatioprina	<i>AZA</i>
Tiopuril-Metil-Transferase	<i>TPMT</i>
Metotrexate	<i>MTX</i>
Leflunomida	<i>LEF</i>
Drogas Modificadoras do Curso da Doença	<i>DMCD</i>
Ácido desoxirribonucléico	<i>DNA</i>
Doenças autoimunes	<i>DAI</i>
Manifestações autoimunes	<i>MAI</i>

Fator de necrose tumoral alfa	<i>TNF-α</i>
Interleucina - 6	<i>IL - 6</i>
Ácido ribonucléico mensageiro	<i>RNAm</i>
Fator Antinuclear	<i>FAN</i>
RDW	<i>Red cell distribution width</i>
Média \pm DP	<i>Média \pm desvio padrão</i>
Med	<i>Mediana</i>

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	16
1.1.	Doenças autoimunes associadas com citopenias	16
1.1.1.	Artrite Reumatóide	16
1.1.2.	Lúpus Eritematoso Sistêmico	17
1.1.3.	Síndrome de Sjögren	18
1.2.	Drogas Imunossupressoras: uso clínico, mecanismo de ação e mielotoxicidade	19
1.2.1.	Azatioprina	19
1.2.2.	Metotrexate	20
1.2.3.	Leflunomida	23
1.3.	Carcinogênese Química	23
1.4.	SMD-t e agentes imunossupressores	26
1.5.	SMD manifestações autoimunes: aspectos etiopatogênicos	27
1.5.1.	Incidência da SMD	30
1.5.2.	Etiologia da SMD	30
1.6.	SMD e manifestações autoimunes: aspectos etiopatogênicos	31
2.	OBJETIVOS	35
2.1.	Geral	35
2.2.	Específicos	35
3.	METODOLOGIA	36
3.1.	Considerações éticas	36
3.2.	Desenho do estudo	36
3.3.	Grupo de estudo	36

3.4.	Coleta de Material	37
3.5.	Citogenética clássica – banda G	39
3.6.	Análise Estatística	40
4.	RESULTADOS	41
4.1.	Caracterização da população estudada	41
4.2.	Caracterização das alterações hematológicas	44
4.2.1.	Grupo Metotrexate	44
4.2.2.	Grupo Azatioprina	48
4.3.	Metotrexate versus Azatioprina	50
4.4.	Ocorrência de complicações clínicas versus displasias na medula MO	50
4.5.	Interferência na obtenção de metáfases (técnica da banda G) pelo uso de MTX e AZA	52
4.6.	Alterações citogenéticas e ocorrência de displasias significativas na MO	52
5.	DISCUSSÃO	54
6.	CONCLUSÃO	58
	REFRÊNCIAS	59
	APÊNDICE A – Material para publicação	68
	APÊNDICE B – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido	73
	ANEXO – Parecer consubstanciado do CEP	76

1. INTRODUÇÃO

1.1. Doenças Autoimunes associadas com citopenias

Citopenias são achados relativamente comuns em pacientes com doenças autoimunes (DAI), particularmente anemia da doença crônica (Schrier e cols. 2012). Atividade inflamatória da doença e infecções estão entre as causas mais comuns e citopenias, que também podem ocorrer por efeito mielotóxico das drogas utilizadas durante o tratamento, bem como pelo surgimento de enfermidade hematológicas durante o curso crônico das DAI.

1.1.1. Artrite Reumatóide

Artrite reumatóide (AR) é uma doença autoimune inflamatória sistêmica caracterizada pelo comprometimento da membrana sinovial das articulações periféricas. A prevalência da AR é estimada em 0,5-1% da população, com predomínio em mulheres e maior incidência entre 30-50 anos (Mota e cols. 2012).

O diagnóstico de AR se baseia na presença de sinais e sintomas clínicos, bem como alterações laboratoriais e radiológicas. O critério de classificação revisado de 1987 se baseia na presença de 4 de 7 critérios levando em conta alterações radiológicas, estando os sintomas presentes há pelo menos 12 semanas. No entanto, devido sua sensibilidade e especificidade variáveis se torna subótimo para avaliação de pacientes com AR inicial. Em 2010 foi proposto novo critério (ACR/EULAR), com enfoque especial para classificação diagnóstica na fase precoce da doença. Este se baseia no somatório de pontos (≥ 6) entre 4 grupos de variáveis (Mota e cols. 2001). Na AR, anemia se correlaciona com o grau de atividade articular da doença e com a velocidade de hemossedimentação, geralmente não sendo menor que 10 g/dL (Schur e cols. 2014). A prevalência varia entre 30 – 70% em vários estudos (Ehrenfeld e cols. 2013). Outras citopenias, que não anemia, são incomuns no curso clínico

da AR e devem levar à suspeita de Síndrome de Felty, Síndrome de Grandes Linfócitos Granulares e doença linfoproliferativa (Schur e cols. 2014).

1.1.2. Lúpus Eritematoso Sistêmico

Lúpus eritematoso sistêmico (LES) é uma doença autoimune crônica de causa desconhecida que pode acometer vários órgãos e sistemas, sendo os mais envolvidos: pele, articulações, rins, sistema nervoso e membranas serosas. Alterações imunológicas, especialmente a produção de autoanticorpos, são características importantes da doença.

O diagnóstico de LES é baseado em critérios que levam em conta o somatório de sinais, sintomas e alterações laboratoriais. Atualmente, há dois critérios disponíveis: o critério diagnóstico proposto pelo *American College of Rheumatology* (ACR), atualizado em 1997; e o critério de classificação do grupo SLICC (Systemic Lupus International Collaborating Clinics), proposto em 2012. O critério ACR baseia-se na presença de 4 dos 11 critérios propostos, simultaneamente ou ao longo do seguimento clínico (Hocheberg MC, 2012). O critério SLICC requer a presença de 4 dos 17 critérios, sendo pelo menos 1 dos 11 critérios clínicos e pelo menos 1 dos 6 critérios imunológicos ou biópsia compatível com nefrite lúpica na presença de fator antinúcleo positivo (FAN) ou anticorpo anti-DNA dupla-hélice (Petri M e cols. 2012).

O curso clínico do LES é variável e pode ser caracterizado por períodos de remissão e surtos de atividade crônica ou aguda. Mulheres, especialmente na terceira e quarta décadas de vida, são mais afetadas que homens. O padrão mais comum de apresentação clínica é um complexo geralmente envolvendo sintomas constitucionais associados a acometimento cutâneo, musculoesquelético, renal, hematológico, neurológico e alterações sorológicas. O padrão que predomina nos primeiros anos de doença tende a prevalecer posteriormente (Fessler BJ, Boumpas DT. 1995).

Pacientes com LES frequentemente desenvolvem uma ou mais citopenias. Leucopenia é comum, mas raramente menor que 2000/ μ l. Contagens inferiores a 4500/ μ l estão presentes em 43-66% dos pacientes. Anemia é comum e geralmente leve, devendo-se comumente à anemia da doença crônica. No entanto, anemia hemolítica pode acontecer e requerer

tratamento específico devido sua gravidade, embora tal evento seja incomum. Plaquetopenia é achado comum, mas sangramento usualmente ocorre apenas com níveis inferiores a 25000/ μ l. As formas agudas geralmente acontecem por atividade da doença (Schur e cols. 2013).

1.1.3. Síndrome de Sjögren

Síndrome de Sjögren é uma colagenose crônica, inflamatória e multissistêmica caracterizada primariamente pelo acometimento de glândulas exócrinas, causando à diminuição da secreção lacrimal e salivar, levando ao quadro de “complexo sicca”. Acometimento extraglandular está compreendido em sinais sistêmicos (fadiga) e acometimentos de órgãos específicos, como articulações, pele, pulmões, rins, coração, sistema nervoso, sendo esses os mais comuns (Fox R, Creamer P. 2013)

Embora não designado para prática clínica, o critério mais aceito atualmente é o *American-European Criteria Group (AECG)*, proposto em 2002. Ele requer a presença de sintomas de xerostomia e xerofthalmia associados a alterações em testes específicos demonstrando disfunção exócrina das glândulas lacrimais e salivares. Também requer presença de autoanticorpos (anti-Ro e/ou anti-La) e biópsia de glândula salivar menor (lábio inferior) demonstrando infiltração linfocitária.

Anemia e leucopenia estão presentes em 35 e 19% dos casos de Sjögren, respectivamente; enquanto plaquetopenia, em apenas 6% e geralmente não têm gravidade clínica. Tais manifestações têm associação com a presença do anticorpo anti-Ro (Ramos-Casals M e cols. 2009, Assimakopoulos SF, e cols. 2007). Anemia hemolítica e Aplasia eritróide pura adquirida, no entanto, já foram descritas em paciente com Sjogren (Assimakopoulos SF, e cols. 2007).

1.2. Drogas Imunossupressoras: uso clínico, mecanismo de ação e mielotoxicidade

1.2.1 Azatioprina

Azatioprina (AZA) é um antimetabólito do grupo das tiopurinas que sofre quebra para formação de 6-mercaptopurina, que por sua vez é catalisada para formação de um metabólito inativo ou é submetido à metilação, gerando metabólitos ativos. Essa última etapa é dependente da atividade da enzima Tiopuril-Metil-Transferase (TPMT), que apresenta diferentes níveis de atividade nos indivíduos, a depender do polimorfismo genético apresentado. Isso explica a grande variabilidade de eficácia e toxicidade observada nos paciente em uso de AZA. São descritos 4 alelos para o gene da TPMT: TPMT-1 (tipo selvagem), TPMT-3A, TPMT-3B e TPMT-3C. Os pacientes portadores dos tipos 1 e 3C são considerados como possuidores de atividade normal da enzima. Os portadores do tipo 3B, atividade intermediária. Finalmente, os portadores do tipo 3A, atividade baixa (Corominas e cols. 2000).

Em várias enfermidades autoimunes o uso de AZA é recomendado, objetivando principalmente a redução da dose de corticosteroides e manutenção da remissão clínico - laboratorial. Por ser droga de manutenção, seu uso é ambulatorial e geralmente prolongado em doenças das mais diversas especialidades. Os principais paraefeitos que levam à suspensão da mesma são intolerância gastrointestinal ou toxicidade medular, que pode resultar em infecções secundárias. O uso de AZA, por exemplo, está bem estabelecido no LES. Dados de metanálise demonstraram redução de todas as causas de mortalidade em seis vezes, além de reduzir recidivas de nefrite lúpica em dois anos (Flanc e cols. 2004, Moroni e cols. 2006).

Provavelmente mielotoxicidade é o efeito mais importante e potencialmente fatal do uso de AZA. Em metanálise, estudando pacientes com doença inflamatória intestinal, a duração do tratamento com AZA dos pacientes que apresentaram mielotoxicidade variou de 12 dias a 27 anos (Gisbert e Gomollón. 2008). No entanto, deficiência de TPMT é responsável por apenas 1/4 dos casos de mielotoxicidade e uma variedade de outros efeitos adversos como

reações alérgicas, hepatotoxicidade, pancreatite, náuseas e vômitos não pode ser prevista pela testagem da TPMT (Higgs e cols. 2010).

A mesma metanálise supracitada revelou incidência cumulativa 7% de mielotoxicidade por AZA, sendo a taxa de incidência de 3% por paciente/ano. A incidência cumulativa de infecções foi de 6,5% e o risco de morte por mielotoxicidade de 0,94% (Gisbert e Gomollón. 2008).

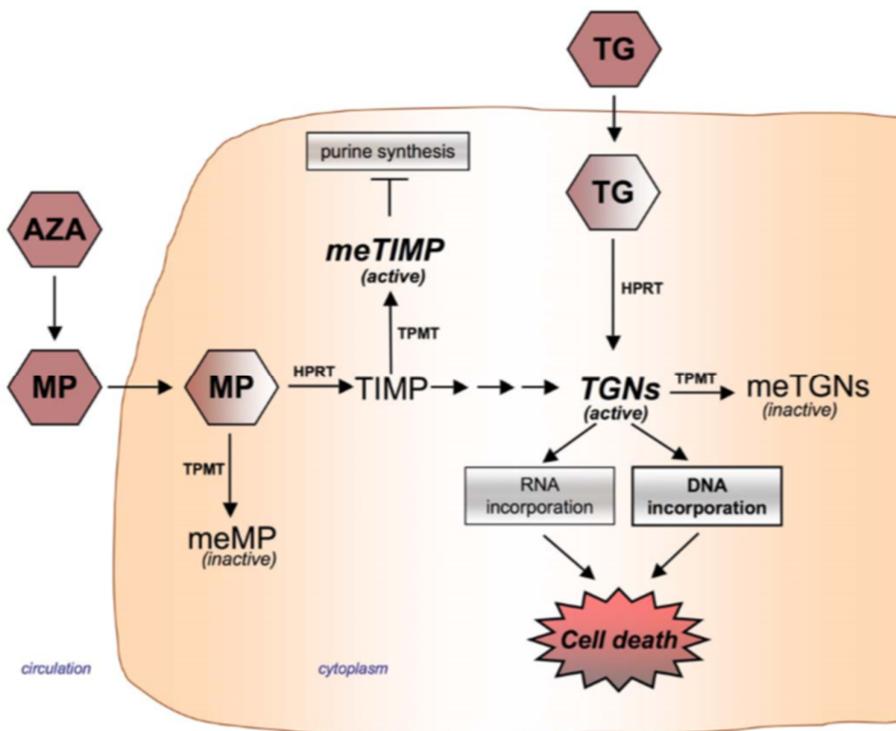


Figura 1 – Vias Metabólicas das Tiopurinas

Fonte: adaptado de Hosni-Ahmed e cols. 2011

1.2.2. Metotrexate

Metotrexato (MTX) é um agente imunomodulador cuja ação consiste na inibição da síntese de DNA, RNA, timidato e proteínas. Os efeitos anti-inflamatórios do MTX na AR parecem estar relacionados, pelo menos em parte, com a modulação do metabolismo da adenosina e com os efeitos possíveis nas vias do fator de necrose tumoral (TNF, do inglês, tumor necrosis factor). Os efeitos imunossupressivos e tóxicos do MTX são devido à inibição do

diidrofolato redutase, enzima envolvida no metabolismo do ácido fólico, o que evita a redução do diidrofolato a tetraidrofolato ativo (Mota e cols. 2012). Tais parafeitos são observados principalmente na medula e no trato gastrointestinal e manifestam-se através de náuseas, vômitos, dor abdominal, diarreia, úlceras orais, citopenias e infecções secundárias.

Metotrexate é considerada atualmente a droga de escolha para tratamento da artrite reumatóide de acordo com estudos que demonstram sua capacidade de reduzir sinais e sintomas da doença, bem como melhorar a capacidade funcional do paciente. Além disso, MTX reduz a progressão radiográfica da doença (Mota e cols. 2012).

Entre 30 a 80% dos doentes apresentam algum efeito adverso da terapêutica com MTX em baixas doses. A probabilidade de abandono da terapêutica ao fim de 1 ano é de 30%, e a razão principal são os seus efeitos adversos. Num estudo com 191 doentes com AR sob MTX em baixa dose, a probabilidade de manutenção da terapêutica com MTX ao fim de 2 anos era de 65% e aos 5 anos de 46%. Neste estudo, apenas 37,1% dos doentes sofreram algum tipo de efeito adverso e 15,7% dos doentes suspenderam permanentemente o MTX. Num outro estudo com 271 doentes com AR, 83% dos doentes tiveram algum efeito adverso, mas 78,7% e 60,3% dos doentes mantinham-se com a terapêutica ao fim de 1 e 5 anos respectivamente (Neves C e cols 2009).

Alguns dos efeitos adversos mimetizam as situações de deficiência de folato, o que é bem explicável, dado a natureza de antagonista do ácido fólico pelo MTX. O uso de suplementos de folato durante o tratamento pode minimizar ou prevenir efeitos como anemia, neutropenia, estomatite e úlceras orais. Outros efeitos adversos como nodulose, fibrose hepática, fibrose pulmonar, letargia, fadiga ou insuficiência renal não estão relacionados com o metabolismo do folato, não sendo por isso minimizados com o seu uso (Neves C e cols 2009).

Tabela 1 – Efeitos secundários de MTX em baixas doses		
Frequentes	Menos Frequentes	Raros
- Elevação de transaminases	- SNC (cefaleia, vertigens)	- Nefrotoxicidade - Dermatite
- Efeitos sobre o TGI (náuseas, anorexia, diarreia)	- Pneumonite - Leucopenia e plaquetopenia - Alopecia	- Fotossensibilidade - Ginecomastia - Oligospenia
- Estomatite	- Infecções	- Nodulose - Linforma

Fonte: adaptado de Neves C e cols. 2009

A mielossupressão é um dos efeitos adversos mais temidos do MTX, quer pela sua gravidade, como pela sua imprevisibilidade.

A incidência dos efeitos adversos hematológicos varia conforme os estudos. Leucopenia leve a moderada (o mais frequente), trombocitopenia, anemia megaloblástica variam entre 3% e 11%. A pancitopenia isolada é observada em 1,4% dos doentes e entre 0% a 5% dos doentes têm necessidade de suspender a terapêutica devido a citopenias (Neves C e cols 2009).

A pancitopenia pode ocorrer em qualquer momento durante o curso da terapêutica. Não é dose-dependente e pode ocorrer com doses cumulativas tão baixas como 10 mg, até dose superiores a 700 mg e tão rápido como após 10 dias do início da terapêutica. Pode ser fatal em cerca de 25% dos casos afetados (Neves C e cols 2009).

Existem alguns fatores de risco identificados para toxicidade medular: alterações da função renal, idade avançada, infecção concomitante, ingestão de álcool, hipoalbuminemia, Fator Antinuclear (FAN) positivo, deficiência de folato não tratada, polimedicação e certas drogas específicas quando em combinação com MTX (Neves C e cols 2009).

Alguns autores referem que um volume corpuscular médio aumentado (Stamp L e cols. 2006, Fries JF e cols. 1993) ou um RDW aumentado podem

ser indicadores de uma crise aplástica, mas a maioria destas observações foi realizada antes da suplementação com ácido fólico ser prática corrente (Fries JF e cols. 1993).

1.2.3. Leflunomida

Leflunomida (LEF) é um derivado isoxazol cuja estrutura não apresenta semelhança com outras Drogas Modificadoras do Curso da Doença (DMCD). Ela oferece um mecanismo exclusivo de tratamento para AR (Fox R e cols. 2014).

Trata-se de um imunomodulador com atividade antiproliferativa que inibe a enzima diidroorato desidrogenase, envolvida na síntese da pirimidina. É absorvida no trato gastrointestinal, e a biotransformação ocorre provavelmente no fígado e na parede gastrointestinal, onde é transformada principalmente em M1, o metabólito ativo responsável por todas as ações da medicação. Leflunomida melhora a atividade da doença e a qualidade de vida e reduz a progressão radiográfica. É prescrita na dose de 20 mg/dia por via oral, mas pode-se prescrever dose de 20 mg em dias alternados (Mota e cols. 2012).

Toxicidade hematológica basicamente resulta da interação entre leflunomida e outras drogas. Ela pode aumentar a toxicidade pelo MTX, levando a plaquetopenia, agranulocitose e pancitopenia (Fox R e cols. 2014).

1.3. Carcinogênese química

Os agentes químicos carcinógenos podem ser divididos em genotóxicos e não genotóxicos. Os primeiros são capazes de alterar quantitativa ou qualitativamente o genoma celular, ao passo que os últimos não interagem com o DNA, mas modulam o crescimento e a apoptose celular, potencializando o efeito genotóxico. Esses compostos, em altas doses, podem causar proliferação celular e quebras de fitas simples ou duplas do DNA (Hoeijmakers, 2009).

Normalmente, os efeitos carcinogênicos desses agentes são minimizados pela ação de enzimas da família do Citocromo P450 que atuam no processo de oxidação/ativação (fase I) e conjugação/detoxificação (fase II) desses compostos (Oliveira e cols. 2007).

Após ultrapassarem a membrana da célula, são metabolizados em compostos eletrofílicos que penetram no núcleo e interagem com o material genético, ocasionando alterações estruturais e instabilidade genômica (Oliveira *et al.*, 2007). Esta é chamada Fase de Iniciação, e constitui o primeiro passo para a carcinogênese. Os danos ao genoma levam a uma instabilidade genômica e podem ocorrer em decorrência de mutações ou alterações cromossômicas, tais como deleções e translocações (Pinheiro e cols., 2008). O desenvolvimento de uma neoplasia ocorre quando o dano na estrutura do DNA da célula se torna irreversível e, além disso, ocorre proliferação das células transformadas, esta é chamada Fase de Promoção (Oliveira e cols., 2007). O conceito de iniciação e promoção é baseado em estudos para o desenvolvimento de câncer em modelos experimentais.

Evidências demonstram que a massa tumoral origina-se de uma única célula que contraiu as alterações genéticas, denominadas clones tumorais. A Leucemia Mielóide Crônica é um tipo de tumor que reforça esta teoria, pois em quase todos os casos as células leucêmicas têm o mesmo tipo de translocação entre os cromossomos 9 e 22 (Cromossomo Filadélfia). O mesmo padrão é observado em neoplasias de linfócitos B (Linfomas Não-Hodgkin), em que todas as células do tumor possuem o mesmo tipo de rearranjo gênico no DNA que codifica as cadeias das imunoglobulinas (Gauduchon, 2004), sendo uma das mais encontradas a t(14; 18), que envolve o sítio do proto-oncogene *BCL-2*, e é recorrente em 70-90% dos casos de Linfoma Folicular e em 20-30% dos casos de Linfoma Difusos de Grandes Células B (Blair, 2009).

Outros mecanismos de defesa da célula contra a ação de carcinógenos são o sistema de reparo do DNA e os genes supressores tumorais. Entre eles, um dos mais importantes é o gene *TP53*, localizado na região p13 do cromossomo 17. Esse gene codifica uma proteína que, ao identificar danos na

estrutura do DNA, bloqueia a divisão celular na fase G1 e coordena respostas localizadas para facilitar o reparo do dano ou induzir apoptose da célula, caso não seja possível reparar a lesão encontrada (A Petitjean e cols., 2007; Hoeijmakers, 2009).

Quando as mutações ocorrem em proto-oncogenes ou genes supressores tumorais, estes genes deixam de exercer o seu papel de defesa, ocorrendo várias alterações na célula que se traduzem na expressão de proteínas anômalas e falha no controle do ciclo celular (Roy, 2007). Essas mutações podem resultar na hiperexpressão de oncogenes e provocar uma proliferação celular descontrolada, a chamada Fase de Transformação Neoplásica (Blair, 2009).

Vários genes supressores de tumor têm sido estudados nas diversas neoplasias, porém o mais mutado é o gene *TP53* (A Petitjean et al., 2007; Olivier, 2010). Dados da IARC (International Agency for Research on Cancer) indicam que o *TP53* está mutado em 30 a 50% dos casos de câncer em humanos (Smith, 1995; Olivier, 2010). Este gene é composto de 11 exons, gerando uma proteína de 52kDA com importante atividade supressora de tumor. Em condições normais, a proteína p53, codificada pelo gene *TP53*, está presente em baixos níveis no citoplasma, sendo inativada por ligação à MDM2. Uma vez ativado o gene *TP53*, a célula pode percorrer dois caminhos. No primeiro momento, o ciclo celular é interrompido para que o sistema de reparo do DNA perceba se o dano é ou não reversível. Se for reversível, é feita a correção ou reparo. Caso o dano seja irreversível, haverá ativação da via das caspases com ativação da caspase-3, a grande efetora do fenômeno de apoptose (morte celular programada). Se o gene *TP53* estiver mutado e o dano celular não for corrigido, a célula poderá progredir à transformação neoplásica.

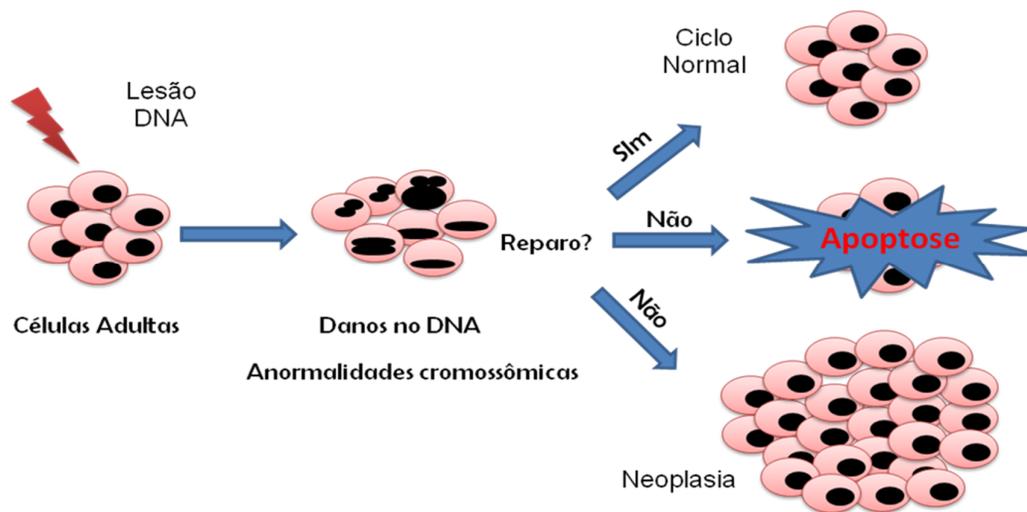


Figura 2 - Esquema da ação do gene TP53 como indutor de apoptose e prevenção do surgimento de neoplasias.

1.4. SMD relacionada ao tratamento (SMD-t) e agentes imunossupressores

Publicações recentes têm relacionado o uso prolongado de agentes imunossupressores e antimetabólicos, como metotrexato (MTX) e azatioprina (AZA), ao desenvolvimento de SMD-t, com potencial subsequente de transformação leucêmica. (Smith e cols. 2003, Knipp e cols. 2005). Estudo de coorte retrospectiva recente relatou alterações citogenéticas em 79% dos pacientes em uso prolongado de AZA, com média de 65 meses de uso e dose cumulativa média de 146g. Destaca-se o fato de que 40% dos casos apresentavam citopenias reversíveis antecedendo o desenvolvimento de SMD-t (Kwong YL, 2010).

Deleções no cromossomo (del 7 ou 7q -) tem sido descritas com ênfase nos pacientes em uso de AZA que desenvolvem citopenias transitórias ou SMD/ LMA-t (Kwong YL, 2010, Kwong YL e cols. 2010). Tais alterações citogenéticas, assim como deleções 5q e rearranjos no cromossomo 11q23, são bem descritas em casos secundários ao uso de agentes alquilantes. Dados *in vitro* sugerem que AZA pode selecionar clones com deficiência no reparo de

pareamento anômalos, o que pode ser evidenciado por instabilidade de microssatélite (Kwong YL, 2010).

Há vários estudos na literatura médica descrevendo a citotoxicidade produzida pelo MTX e os mecanismos pelos quais a mesma se processa. No entanto, há poucos artigos descrevendo sua associação com desenvolvimento de SMD-t. Além disso, alterações comumente vistas no mielograma de pacientes com SMD são encontradas em pacientes com doenças autoimunes (DAI) reumatológicas e 27% podem ser consideradas reativas (Hunt e cols. 2013)

Há dois relatos de caso em que MTX foi a principal droga envolvida no desenvolvimento de SMD-t. Em um dos casos, paciente com artrite reumatóide (AR) do sexo feminino, com anemia moderada em uso de MTX, o mielograma demonstrou anemia refratária com sideroblastos em anel (ARSA). Com a continuação do uso houve evolução para anemia refratária com excesso de blastos (AREB). Mesmo após suspensão da droga em questão não houve resolução da anemia [13]. Em outro caso, paciente também do sexo feminino em uso de MTX apresentou pancitopenia. Análise do mielograma mostrou diseritropoese e dismegacariopoese. Análise citogenética revelou translocação 10q11; 18q21. Nesse caso houve remissão das citopenias após suspensão do MTX (Okamoto e cols.99, Murphy e cols. 2004).

1.5. Aspectos Gerais sobre as Síndromes Mielodisplásicas

Síndrome Mielodisplásica (SMD) é um grupo de enfermidades hematológicas heterogêneas caracterizadas por citopenias, dismorfismos celulares ao mielograma e medula óssea normocelular, caracterizando portanto insuficiência medular. Deve-se a um distúrbio clonal na célula tronco hematopoiética que pode afetar as três linhagens. Anemia, infecções secundárias e autoimunidade patológica são as principais manifestações clínicas (Young e cols. 2008) Alterações citogenéticas estão presentes em aproximadamente 50% dos casos de SMD e não ocorrem aleatoriamente, podendo estar relacionadas com a etiologia (Coll e cols. 2012). As células tronco da medula óssea (stem cells), devido à suas propriedades de auto-

renovação e diferenciação, são capazes de persistir ao longo da vida. Esse fenômeno aumenta várias vezes o risco de acumular mutações deletérias que possam levar ao desenvolvimento de neoplasias.

O tratamento da SMD consiste em oferecer suporte clínico para todos os pacientes e, em casos selecionados, o emprego de imunossupressão com Imunoglobulina Antitimocítica e/ou ciclosporina, agentes hipometilantes (azacitabina e decitabina) ou Transplante Alogênico de Medula Óssea. O tratamento é baseado no escore clínico IPSS-R (Revised International Prognostic Scoring System) que estima a sobrevida do paciente levando em conta os níveis hematimétricos, a gravidade das alterações citogenéticas e a porcentagem de blastos na medula óssea (Coll e cols. 2012).

Tabela 2 - Estratificação de Risco baseada nas alterações citogenéticas				
Muito Bom	Bom	Intermediário	Ruim	Muito Ruim
del(11q) -Y	Normal der (1;7), del(5q), del(12p), del(20q), Duplo incluso del(5q)	del (7q) +8 i(17q) +19 +21 Qualquer outra	-7 der(3)(q21)/de r(3)(q26) Duplo incluso 7q- complexo 3 anormalidades	Complexo >3 anormalidades
Mediana Sobrevida (meses)				
60,8	48,5	24	14	5,7

Fonte: adaptado de Schanz e cols. 2012

Tabela 3 - Estratificação de Risco na Síndrome Mielodisplásica (IPSS Revisado)

Variáveis	Escore						
	0	0,5	1	1,5	2	3	4
Prognósticas							
Citogenética	Muito boa		Boa		intermediária	Ruim	Muito Ruim
Blastos na Medula (%)	≤ 2		>2 a <5		5 a 10	> 10	
Hemoglobina (g/dL)	≥ 10		8 a < 10	< 8			
Plaquetas (cél.10^3/mL)	≥ 100	50-100	< 50				
Contagem de neutrófilos (cél/mL)	≥ 800	< 800					

Fonte: adaptado de Greenberg e cols. 2012

Grupo de Risco	Escore IPSS-R	Sobrevida média (anos)	Tempo médio de evolução para LMA de 25% (anos)
Muito baixo	≤ 1,5	8,8	> 14,5
Baixo	>1,5 a 3	5,3	10,8
Intermediário	> 3 a 4,5	3	3,2
Alto	> 4,5 a 6	1,6	1,4
Muito	> 6	0,8	0,7

LMA: Leucemia Mielóide Aguda

Fonte: adaptado de Greenberg e cols. 2012

1.5.1. Incidência da SMD

Pesquisadores dos Estados Unidos, em 2007, relataram uma incidência anual de 5,4 a 36,2/100.000 em pessoas entre 60 e 84 anos. Segundo os autores, 86,4% dos pacientes diagnosticados tinham mais de 60 anos e apenas 6% menos de 50 anos (MA, 2007). De acordo com dados do programa americano SEER (Surveillance, Epidemiology and End Results), cerca de 12.000 e 20.000 pacientes com SMD são diagnosticados por ano nos Estados Unidos e na Comunidade Européia, respectivamente. Estes dados indicam que existe um número significativamente maior de casos de SMD do que de leucemias agudas e de doenças mieloproliferativas (Germing e cols., 2008; Strom; Velez-bravo; Estey, 2008).

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

1.5.2. Etiologia da SMD

A SMD é classificada como primária, ou *de novo*, e secundária ou relacionada com a terapia (SMD-t). As SMD primárias constituem a maioria dos casos e ocorrem sem um evento prévio, enquanto as SMD secundárias desenvolvem-se após um evento mutagênico conhecido (LI e cols., 2009).

As SMD-t podem surgir em qualquer idade, geralmente 4-5 anos depois do início de quimioterapia ou radioterapia. A percentagem de anomalias

citogenéticas e o risco de transformação em leucemia aguda são significativamente mais elevados nas SMD-t do que na SMD primária. Uma pequena proporção de doentes com SMD, cerca de 4-5%, pode desenvolver transformação blástica em locais extramedulares (sarcoma granulocítico), particularmente na pele, estando esta evolução associada a mau prognóstico (Naeim; Rao; Grody, 2008).

Os estudos epidemiológicos têm identificado consistentemente diversos fatores de risco para o acometimento das SMDs tais como o tabaco, exposição ao benzeno e outros solventes orgânicos, agentes químicos agrícolas (pesticidas, herbicidas e fertilizantes), radiações ionizantes, sexo masculino e história familiar de neoplasias hematológicas (Jädersten; Hellström-Lindberg, 2008; Brunning e cols., 2008). Algumas doenças hematológicas, tais como anemia de Fanconi, disqueratose congênita, síndrome de Shwachmann-Diamond e síndrome de Diamond-Blackfan estão também associadas a um risco aumentado de SMD (Vardiman e cols., 2008). Adicionalmente, a exposição a drogas citotóxicas, em particular agentes alquilantes e inibidores da topoisomerase II ou a radiações terapêuticas, está associada a um risco aumentado de desenvolvimento de SMD-t (Aul; Gattermann; Schneider, 1995; Jädersten; Hellström-Lindberg, 2008).

Agentes alquilantes têm sido relacionados a deleções dos cromossomos 5,7 e trissomias do 8. Os inibidores da topoisomerase – II estão relacionados a anormalidades envolvendo translocações cromossômicas entre 11q23 e 21q22 (Leone e cols. 2007).

1.6. SMD e manifestações autoimunes: aspectos etiopatogênicos

O achado de displasias na medula óssea também pode estar associado com a intensidade de sinais e sintomas no LES e, talvez, com a tendência de desenvolver um surto agudo da doença. No entanto, este estudo não teve número amostral suficiente para estabelecer avaliações estatísticas (Oka e cols. 2008). Estudo prospectivo avaliando aspectos clínicos e prognósticos de SMD primária não encontrou associação estatisticamente significativa entre

subtipos de SMD, prognóstico das alterações do cariótipo, evolução leucêmica e sobrevida geral nos pacientes com e sem manifestações autoimunes (MAI) – tabela 1. Destaca-se, no mesmo estudo, o fato de que a atividade das MAI não tinha associação com a gravidade das citopenias (Gianoulli e cols. 2012). A importância de tais estudos está no fato de se buscar possíveis semelhanças na patogênese da SMD e do LES, uma vez que várias publicações prévias tratam de fenômenos autoimunes associados à SMD cuja frequência se dá em torno de 10% dos casos (Voulgarelis e cols. 2004).

Tabela 4 - Manifestações autoimunes associadas com Sd. Mielodisplásica

Manifestações Autoimunes agudas	Manifestações Autoimunes Crônicas	Doenças Colágeno	do	Citopenias Autoimune
Vasculite Sistêmica Aguda	Vasculite cutânea	LES		-
	Artrite	Sd de Sjogren		-
	Glomerulonefrite	Fenômeno de Raynaud	de	-
	Polineuropatia Periférica	Policondrite Recidivante		-

Fonte: adaptado de Giannouli e cols. 2012

Fatos relevantes descritos por estudos avançados sugerem haver uma reação autoimune contra o clone medular emergente, do qual fazem parte macrófagos, linfócitos T e células Natural Killer, além de uma superexpressão de citocinas pró-inflamatórias, da qual merece destaque o Fator de Necrose Tumoral alfa (TNF- α) e interleucina-6 (IL-6). Fator de Necrose Tumoral - α parece ter um importante papel na hematopoiese, como tem sido evidenciado por numerosos estudos *in vivo* e *in vitro*. Relatos recentes têm demonstrado o papel clínico do TNF- α na patogênese da SMD. Em 2000, Birnbaum e Gentile relataram de caso uma paciente com diagnóstico de 11 anos de AR que apresentou anemia importante (6,1g/dL) e displasias na medula com mínima fibrose, além de piora do quadro articular. Houve reversão da anemia em apenas 3 semanas de uso de etanercept, um receptor solúvel no TNF- α , na dose de 50mg/sem. As alterações displásicas medulares também reverteram posteriormente (Birnbaum e cols. 2000).

Vários estudos apontam para um desequilíbrio entre citocinas inflamatórias e inibitórias no microambiente medular da SMD. A produção de IL-6 e TNF- α está superexpressa devido à produção aumentada por fibroblastos e macrófagos medulares. Alguns grupos têm relacionado os níveis de TNF- α da medula óssea com a taxa de apoptose, dependência transfusional e gravidade da anemia. Além do TNF- α F- α , IFN- γ têm demonstrado induzir expressão aumentada de FAS em células displásicas CD34+, levando-as à apoptose pela via FAS e à destruição imune (Gianoulli e cols. 2012). No entanto, o estudo da apoptose aumentada na SMD ainda precisa demonstrar seu valor, uma vez que ainda não está esclarecido como se dá seu início e se está direcionado apenas para células displásicas ou para progenitores normais. Além disso, transformação leucêmica e evolução clonal podem ser afetadas pelos subprodutos da apoptose, como stress oxidativo e parada do ciclo celular induzida pelo óxido nítrico, predispondo a aneuploidia (Barret AJ, Sloan E. 2009).

Evidências convincentes têm apoiado que a excessiva apoptose, especialmente nos estágios iniciais da SMD, possa ser interpretada como uma resposta do sistema imune ao clone hematopoiético (Barret J e cols.). A supressão medular observada nas unidades formadoras de colônias de granulócitos e monócitos de pacientes com SMD produzida por células T CD3+/ CD8+ produz um cenário de “células T anti-clone” no qual é criado um ambiente apoptótico pela liberação de citocinas inibitórias e pela expressão aumentada de FAS (Gianoulli e cols. 2012). A relação entre subpopulações de linfócitos Th17 e linfócitos T reguladores (Treg) tem sido observada por alguns autores. De acordo com eles, a relação Th17:Treg está desequilibrada, baseado no maior risco de autoimunidade e maior resposta à imunossupressão observada nos pacientes com baixo risco quando comparada aos pacientes com SMD de alto risco (Kordasty SY e cols. 2009).

A resposta inflamatória observada no micromabinete medular na SMD é responsável pela hematopoese ineficaz. Interessantemente, observa-se que as MAI são geralmente sensíveis ao tratamento com corticosteroides pela sua atuação tanto na imunidade inata quanto adaptativa. No entanto, não há resposta hematológica com o uso de imunossupressores clássicos. Agentes anti-TNF e terapias epigenéticas, porém, têm-se mostrado promissoras e

podem se tornar eficazes se corroborados por investigações posteriores (Gianoulli e cols. 2012).

Fator de regulação de interferon – 1 (*Interferon Receptor Factor -1*: IRF-1) é um fator de transcrição envolvido na sinalização do interferon, leucemogênese e desenvolvimento do sistema imune. Estudo realizado em 2004 utilizando técnicas de biologia molecular mostrou associação inversa com surgimento de MAI através da observação da redução de 10 vezes dos níveis de RNA mensageiro (RNAm) do IRF -1 em pacientes com SMD sem MAI. Os pacientes com MAI apresentaram níveis de RNAm semelhantes a pacientes com vasculite primária e controles normais. Portanto, níveis diminuídos de IRF-1 têm papel protetor no surgimento de MAI (Giannouli e cols. 2012). Além disso, estudos experimentais sugerem papel do IRF-1 na inflamação e autoimunidade, oferecendo um modelo de estudo para doenças desta natureza (Tada Y e cols. 1997).

2. OBJETIVOS

2.1. Geral:

Avaliar alterações da medula óssea nos pacientes portadores de doenças autoimunes e inflamatórias (DAI) em uso de Drogas Modificadoras do Curso da Doença (DMCD) e imunossupressores que apresentem citopenias permanentes ou transitórias, a despeito da suspensão da(s) droga(s) envolvida(s), atendidos em hospitais terciários em Fortaleza.

2.2. Específicos:

- 1) Identificar a frequência de citopenias no hemograma e alterações displásicas e citogenéticas no estudo da medula óssea.
- 2) Comparar a necessidade transfusional relacionada ao uso de MTX e AZA.
- 3) Verificar possível associação entre ocorrência de infecções e o uso de MTX e AZA.
- 4) Comparar a frequência de citopenias entre os grupos em uso de MTX (monoterapia) e associação MTX+LEF.
- 5) Comparar a frequência de citopenias entre os participantes em uso de MTX e AZA.
- 6) Associar ocorrência de citopenias com presença de displasias significativas na medula óssea dos participantes em uso de MTX e AZA.
- 7) Associar a ausência de metáfases na citogenética pela banda G ao uso de MTX e AZA pelos participantes.
- 8) Associar a ocorrência de complicações clínicas (infecção e transfusão) dos participantes em uso de MTX e AZA com a presença de displasias significativas na medula óssea.
- 9) Associar as alterações citogenéticas encontradas com a presença de displasias significativas (> 10% displasia nas linhagens eritróide, mielóide ou granulocítica) na medula óssea dos participantes em uso de MTX e AZA.

3. METODOLOGIA

3.1. Considerações Éticas

O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Geral César Cals de Oliveira, através do Protocolo CEP N° 11506812.5.0000.5041 (EM ANEXO), tendo sido cumpridas todas as exigências da resolução 466/12 do Conselho Nacional de Saúde.

Todos os participantes envolvidos no estudo tiveram, em algum momento da sua evolução, parecer especializado por hematologista, ambulatorialmente ou em regime de internação hospitalar.

3.2. Desenho do estudo

O estudo foi caracterizado como sendo observacional, analítico e transversal, realizado entre maio de 2012 e maio de 2014.

3.3. Grupo de estudo:

Foram analisados indivíduos portadores de DAI em uso de imunossupressores que apresentaram citopenias transitórias ou permanentes, e que estivessem em acompanhamento clínico nos três hospitais terciários de Fortaleza – CE (Hospital Dr. César Cals de Oliveira - HGCCO, Hospital Geral de Fortaleza - HGF e Hospital Universitário Walter Cantídio - HUWC). Os pacientes eram assistidos tanto ambulatorialmente quanto em regime de internação hospitalar, sempre com o consentimento dos médicos assistentes. Os participantes do estudo eram pacientes que já tinham indicação clínica de realização o mielograma para investigação de citopenias. Os mesmos tinham diagnóstico provável ou preenchiam critérios para DAI, definidos com base em critérios de sociedades internacionais (Tabela 5). O tamanho da amostra foi definido por conveniência dado a dificuldade de identificação e seleção dos indivíduos.

Tabela 5 – Doenças autoimunes em estudo	
Reumatológicas (critérios ACR)	Neurológicas
LES	Miastenia Gravis
AR	Neuromielite ótica (NMO)*
Sjögren	
Artrite Psoriática	

ACR: American College of Rheumatology, 2002

* Critérios revisados de NMO (Wingerchuk DM e cols. 2006)

Critérios de Inclusão:

- Pacientes residentes no estado do Ceará, acompanhados ambulatorialmente ou internados nos hospitais terciários previamente mencionados.
- Idade igual ou superior a 18 anos.
- Pacientes portadores de DAI em uso de imunossupressores que apresentem pelo menos uma citopenia transitória ou persistente em sangue periférico definida por Hemoglobina < 12g/dL, Leucócitos < 3000/ μ L e Plaquetas < 150.000/ μ L.

Critérios de Exclusão:

- Pacientes portadores de patologias que fazem diagnóstico diferencial com SMD.
- Tratamento prévio por quimioterapia ou radioterapia para neoplasias sólidas ou hematológicas.
- Uso de outras drogas potencialmente mielotóxicas.
- Pacientes gestantes.

3.4. Coleta de Material:

O material biológico foi obtido a partir da coleta de sangue venoso periférico, por coleta em veia antecubital e por punção esternal ou em crista ilíaca com agulha padronizada para realização do mielograma e cariótipo.

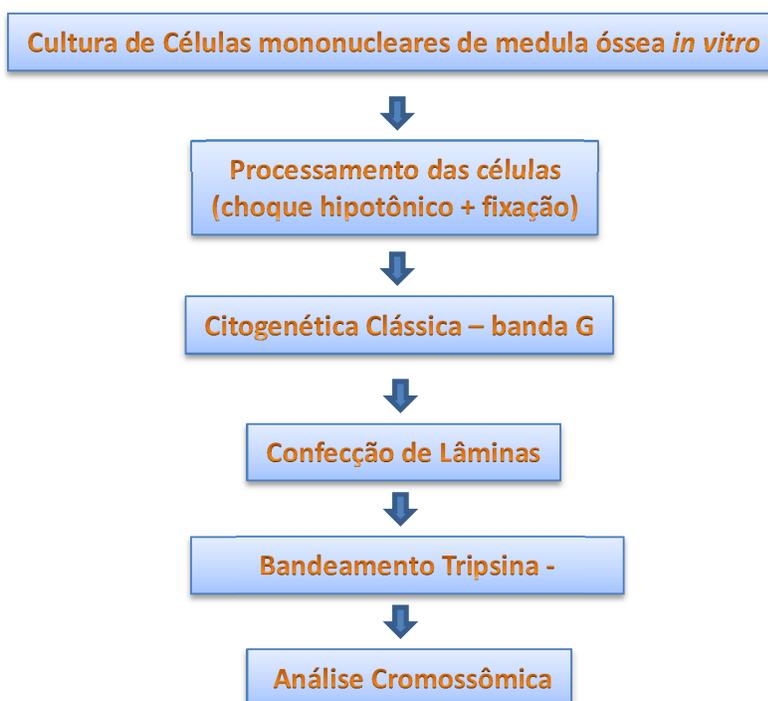
Foi realizada retirada de uma gota de sangue medular para realização de esfregaço, 3mL em seringa heparinizada para realização do cariótipo por banda G e 4 mL para serem distribuídos igualmente em 2 tubos de EDTA para estudos posteriores de DNA e RNA. O sangue medular era idealmente processado nas primeiras horas após sua obtenção e permanecia no máximo 18h sob acondicionamento de 16 graus Celsius.

O material dos indivíduos da pesquisa foi submetido à análise, conforme se segue:

- Hemograma automatizado;
- Esfregaço do sangue medular pela coloração pelo May-Grunwald-Giemsa;
- Citogenética clássica por banda G do aspirado medular.

Dos 25 casos obtidos, 15 foram oriundos do HGCCO e tiveram seus mielogramas analisados no laboratório Emílio Ribas, ao passo que 5 foram oriundos do HGF e 5, do HUWC. Os mielogramas obtidos dos indivíduos do HGF e HUWC foram analisados junto à equipe do HEMOCE. A análise morfológica da medula óssea foi realizada segundo os critérios morfológicos da OMS 2008.

Figura 3. Organograma – resumo da metodologia utilizada nesse estudo



3.5. Citogenética Clássica – Banda G

A citogenética clássica por banda G foi realizada de acordo com a técnica descrita por Chauffaille e cols. 1997. Nesta, a medula óssea (M.O) colhida em heparina e de forma estéril foi dividida em dois frascos contendo 7 mL de meio RPMI (pH 7,0), 3 mL de soro fetal bovino e 100µl de L-glutamina. Este material será cultivado por 24 horas em estufa a 37°C.

Uma hora antes do término da cultura foram adicionados 50µL de colchicina (Colcemid®), por 30 minutos. Em seguida, o material será centrifugado e ressuspenso em solução hipotônica de KCL 0,075 M e fixado em solução de ácido acético e metanol (3:1), por 4 vezes. Para confecção das lâminas para análise, o material foi gotejado em lâminas de microscopia e secado ao ar.

As bandas foram feitas pela técnica de tripsina-Giemsa (GTG), sendo analisadas pelo menos 20 mitoses e os cromossomos classificados de acordo com o Sistema Internacional de Nomenclatura Citogenética Humana (ISCN 2009). As imagens das metáfases foram capturadas em sistema computadorizado (Cytovision-USA Inc) com software para cariotipagem, e o cariótipo digitalizado e impresso em impressora a laser (Lexmark).

3.6. Análise Estatística

A análise dos dados foi realizada através do programa Excel 2010 (versão 14.0.4760.1000) e expressa sob a forma de porcentagem plotadas em figuras e tabelas.

Para análise estatística inferencial foi utilizado programa Graphpad Prism versão 6.04. Para avaliação das diferenças entre os grupos não – pareados e dados não - paramétricos foi empregado o teste de Mann Whitney. Os dados foram expressos em forma de mediana (mínimo - máximo). Para análise de variáveis qualitativas se utilizou tabela de contingência 2x2 e o teste exato de Fisher. Foram consideradas diferenças estatisticamente significativas quando os valores de p foram inferiores a 5% ($p < 0,05$).

4. RESULTADOS

4.1. Caracterização da População Estudada

Foram estudados 26 indivíduos oriundos do Sistema Único de Saúde que foram atendidos nos hospitais terciários de Fortaleza ambulatorialmente ou em regime de internação hospitalar, compreendido entre os meses de maio de 2012 e maio de 2014. Após aplicação dos critérios de inclusão e exclusão, um sujeito foi excluído por apresentar Leishmaniose visceral no mielograma.

Entre os participantes envolvidos na pesquisa, 92% (23) eram do sexo feminino e 8% (2) do sexo masculino. A idade média dos participantes foi de 54 anos (20 – 87). Em relação ao diagnóstico, 64% (16) tinham diagnóstico de AR e 20%, (5) de LES. Havia 4% (1) com diagnóstico de Miastenia gravis, artrite psoriática (ArPsol), Sjögren e Neuromielite óptica. Entre as drogas utilizadas no tratamento das DAI, MTX foi a mais frequente com 68% (16). Destes, 29,4% (5) estavam em associação com leflunomida, 5,8% (1) em associação com abatacepte e 5,8% (1), com infliximabe. Não houve participantes em monoterapia com LEF. Azatioprina, por sua vez, foi utilizada por 28% (7) dos casos. Ciclofosfamida foi utilizada em 4% (1) dos indivíduos.

Dos participantes estudados, 36% (9) necessitaram de terapia transfusional (concentrado de hemácias e/ou plaquetas) e 32% (8) foram tratados para algum tipo de infecção clinicamente importante (sepse de origem não mencionada, infecção de partes moles, infecção urinária complicada e infecção respiratória). Houve 8% (2) de óbito entre os participantes em estudo, ambos do sexo feminino, que apresentaram infecção seguida de sepse. Um dos casos tinha diagnóstico de AR e SMD-t (AREB-II) e outro, LES com atividade de doença importante (tabela 6).

Não houve diferença estatisticamente significativa entre os indivíduos quem usaram MTX e AZA quanto à necessidade transfusional de qualquer hemocomponente, bem como a ocorrência de infecções (figura 4 e 5).

Tabela 6 – Características clínicas dos indivíduos em estudo

Caso	Droga	Idade	Transfusão	Infecção	Óbito
1	MTX	59	N	N	N
2	MTX	71	N	N	N
3	MTX	80	N	N	N
4	AZA	36	S	S	S
5	MTX	57	N	N	N
6	MTX	87	N	N	N
7	AZA	20	N	N	N
8	MTX	45	S	S	S
9	MTX	71	N	N	N
10	MTX+LEF	81	N	N	N
11	MTX	84	N	N	N
12	AZA	44	N	S	N
13	AZA	26	S	N	N
14	MTX+ABATA	65	S	S	N
15	MTX	83	N	N	N
16	MTX	58	N	N	N
17	MTX+INFLIX	62	N	N	N
18	AZA	62	N	N	N
19	MTX+LEF	43	N	N	N
20	MTX+LEF	51	N	N	N
21	MTX+LEF	74	S	S	N
22	MTX+LEF	68	S	N	N
23	AZA	30	S	S	N
24	AZA	18	S	S	N
25	CFM	49	S	S	N

Figura 4. Associação entre necessidade transfusional e uso de MTX e AZA.

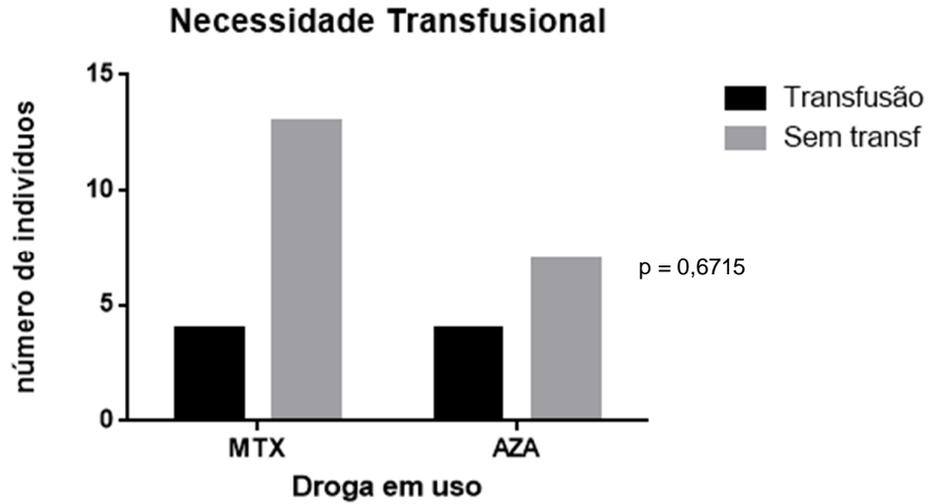
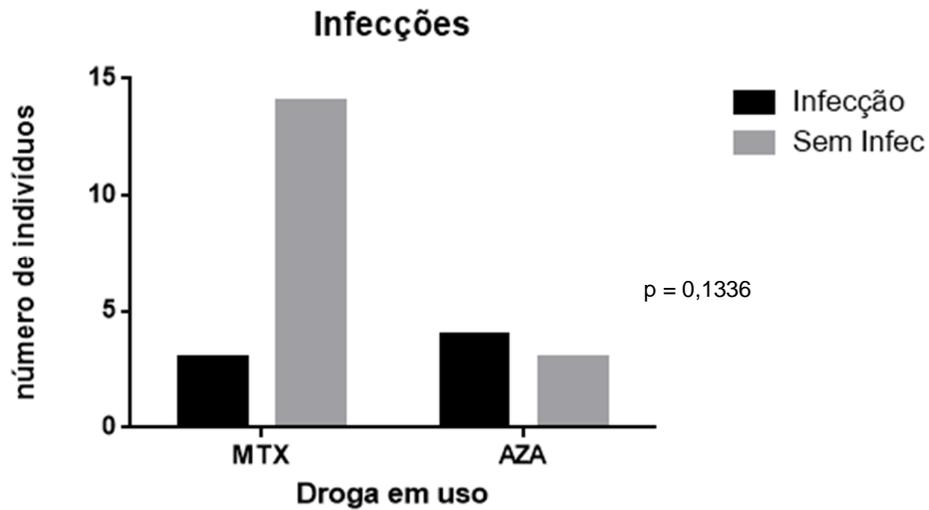


Figura 5. Associação entre ocorrência de infecções e uso de MTX e AZA.



4.2. Caracterização das Alterações Hematológicas

Todos os participantes do estudo tiveram amostras de sangue periférico colhidas no mesmo dia da realização do mielograma ou em data próxima, não distando mais que 3 dias da realização do procedimento. Anemia, leucopenia, linfopenia, plaquetopenia, bicitopenia, pancitopenia e displasias na medula foram avaliadas, conforme descrito a seguir.

4.2.1. Grupo Metotrexate

Anemia foi verificada em 59,09% (13) dos indivíduos em uso de MTX e os níveis de hemoglobina variaram de 5 a 11,8 g/dL. Do total de casos, 35,2% (6) apresentaram anemia leve (10-12 g/dl); 29,4% (5), anemia moderada (8-10 g/dl) e 5,8% (1), anemia grave (<8 g/dl). Bicitopenia foi verificada em 35,2% (6) dos casos enquanto que pancitopenia, em 11,7% (2) (tabela 7).

Associação MTX + LEF não apresentou diferença estatisticamente significativa nas contagens de hemoglobina, leucócitos, linfócitos e plaquetas quando comparada ao MTX em monoterapia (figura 6).

Linfopenia, definida por contagem inferior a 1000 céls/ μ L, foi verificado em 29,4% (5) dos indivíduos em uso de MTX, com contagens variando entre 340 e 3929 céls/ μ L.

Displasias em níveis significativos no mielograma foram observadas em 29,4% (5) indivíduos em uso de MTX, sendo a displasia na série eritróide o achado mais frequente. Disgranulopoese e dismegacariopoese também foram observadas em 1 indivíduo, representadas por pseudo Pelger-Huet, bastonetes de Auer e micromegacariócitos. Blastos foram observados em 2 participantes da pesquisa.

Nos pacientes em uso de MTX, leucopenia e linfopenia apresentaram associação estatística com a presença de displasias no mielograma (Med leuc = 6200 (12630-3778); $p = 0,0023$ e Med linf = 1964 (3929-833); $p = 0,0006$ - figuras 7 e 8, respectivamente). Os níveis de hemoglobina e plaquetas, no

entanto, não tiveram associação estatística com a predição de alterações displásicas.

Alteração citogenética foi encontrada em 1 caso, caracterizada por deleção intersticial do braço longo do cromossomo 5 (46,XX,del(5)(?q13q22) [4]/ 46,XX [16]- figura 4) apresentando, no entanto, mielograma normoplásico.

Tabela 7 - Características dos indivíduos em uso de MTX

Caso	Diagnóstico	Gênero	Hb	Leuc	Linf	Plq
1	AR	F	9,5	6250	1321	264000
2	ArPsol	F	13,1	5210	2565	117000
3	AR*	F	10,4	920	340	82000
5	AR	F	12,1	6150	2300	112000
6	AR	F	10,9	8000	1104	39000
8	AR*	F	7,1	890	571	43000
9	AR	F	11,4	8180	3380	225000
10	AR	F	14,2	7050	2050	166000
11	AR	F	10,5	5740	1149	215000
14	AR	F	8,8	5963	3929	60120
15	AR*	M	10,6	3820	525	104000
16	AR	M	9,8	12630	1278	2000
17	AR	F	10	6450	1878	268000
19	AR	F	12,7	4439	2130	147800
20	AR*	F	9,9	5000	1055	123000
21	AR*	F	7	742	570	12740
22	AR	F	11,8	3778	833	99060
Média+DP			11,9±1,9	5365±2965	1587±1029	122336±82618

* casos em que houve alterações displásicas importantes no mielograma

Figura 6. Comparação da contagem de leucocitos, linfócitos, plaquetas e níveis de hemoglobina entre MTX (monoterapia) e associação MTX + LEF.

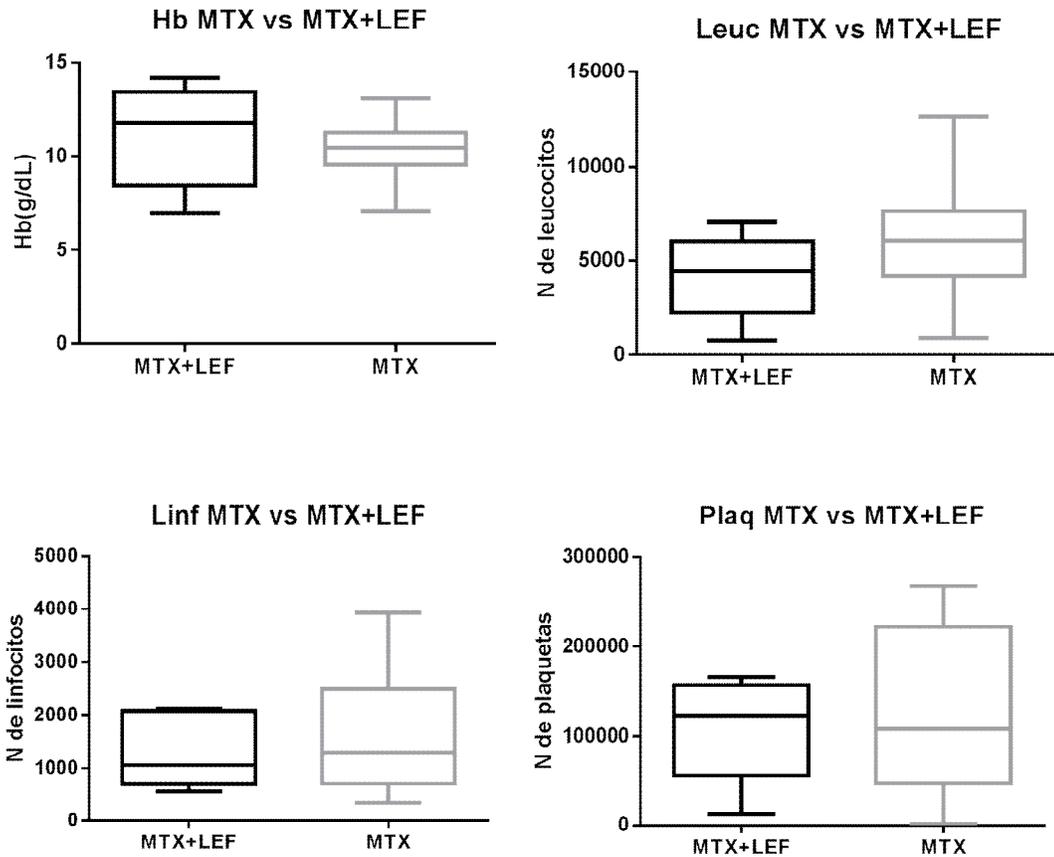


Figura 7. Associação entre ocorrência de displasias e a contagem de leucócitos nos participantes utilizando MTX.

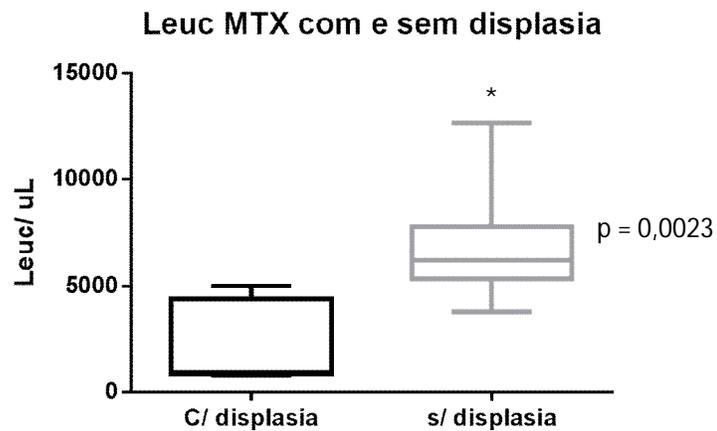


Figura 8. Associação entre ocorrência de displasias e a contagem de linfócitos nos participantes utilizando MTX.

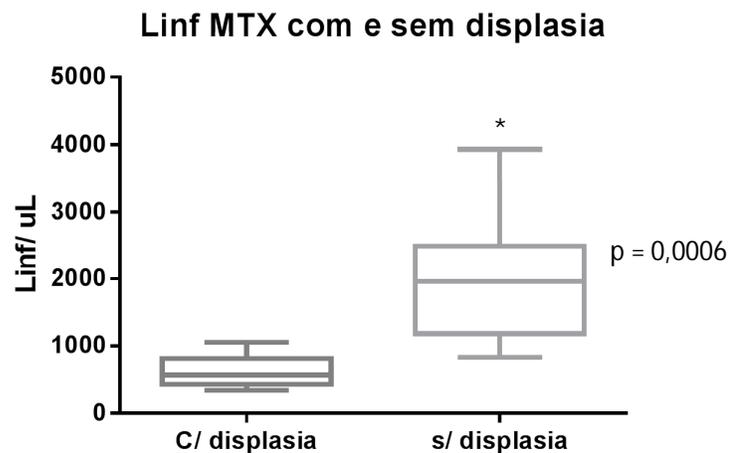
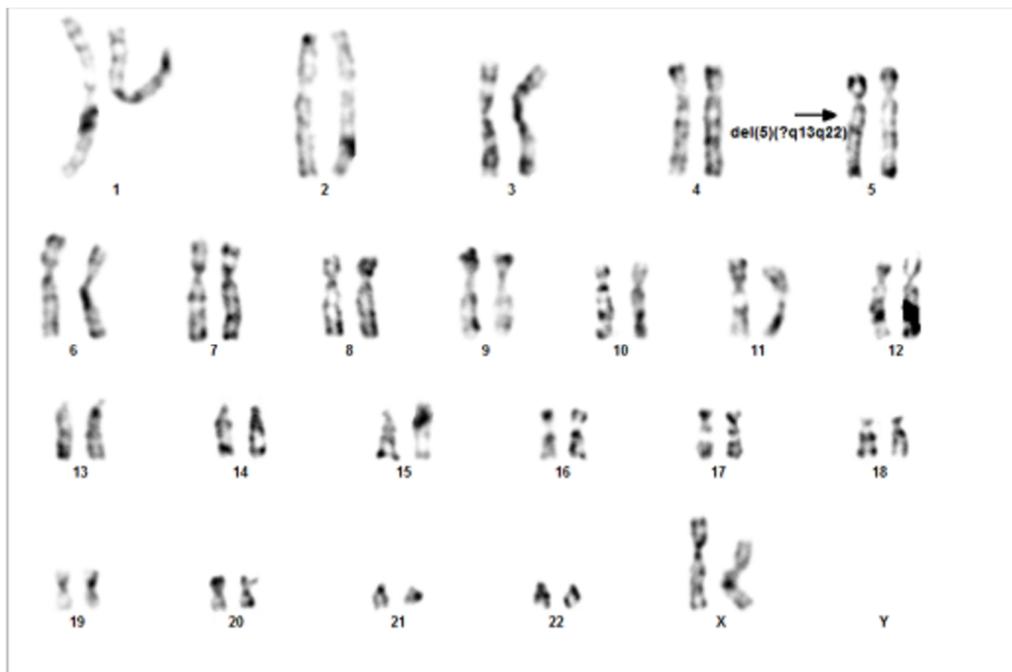


Figura 9. Cariótipo evidenciando deleção intersticial do braço longo do cromossomo 5 em indivíduo com AR e uso prolongado de MTX.



4.2.2. Grupo Azatioprina

Entre os casos em uso de AZA, houve 85,7% (6) de frequência de anemia, sendo leve em 16,6% (1), moderada em 50% (3) e grave em 33,3% (2). Bicitopenia foi verificada em 28,5% (2) dos casos e pancitopenia, em 42,8% (3) dos casos.

Alterações displásicas estavam presentes em 42,8% (3) dos casos em uso de AZA. Displasia moderada da série eritróide foi a alteração mais frequente, estando também presente disgranulopose. Não houve associação estatisticamente significativa entre as citopenias encontradas e a presença de alterações displásicas no mielograma.

Alterações cromossômicas, detectadas pela citogenética clássica, estiveram presentes em 28,5% (2) dos casos. Ambos os casos apresentaram deleções intersticiais: um deles no cromossomo nos cromossomos 5 e 7 (46,XX,del(5)(q31q33),del7(q32)[4]- figura 5) e outro no cromossomo 17 (46,XX del(17)(p11.2) [3] – figura 6).

Linfopenia, definida por contagem inferior a 1000 céls/ μ L, foi verificada em 42,8% (3) dos casos, estando presente tanto em pacientes no contexto clínico de atividade de doença como em pacientes em remissão clínica.

Tabela 8 – Características dos indivíduos em uso de AZA

Caso	Diagnóstico	Sexo	Hb	Leuc	Linf	Plaquetas
4	LES	F	8,05	962	165	11900
7	LES	F	10,4	2910	1531	3000
12	LES	F	8,5	1152	501	68680
13	Miastenia	F	5,4	9600	1000	321000
18	Sjögren	F	13,4	4300	1058	107000
23	LES	F	5	1148	263	24410
24	Devic	F	9,18	1310	1008	2000
Média\pmDP			8,6 \pm 2,9	3055 \pm 3138	789 \pm 494	76856 \pm 114462

Figura 10. Cariótipo evidenciando deleções intersticiais nos braços longos dos cromossomos 5 e 7 em indivíduo com LES e uso prolongado de AZA

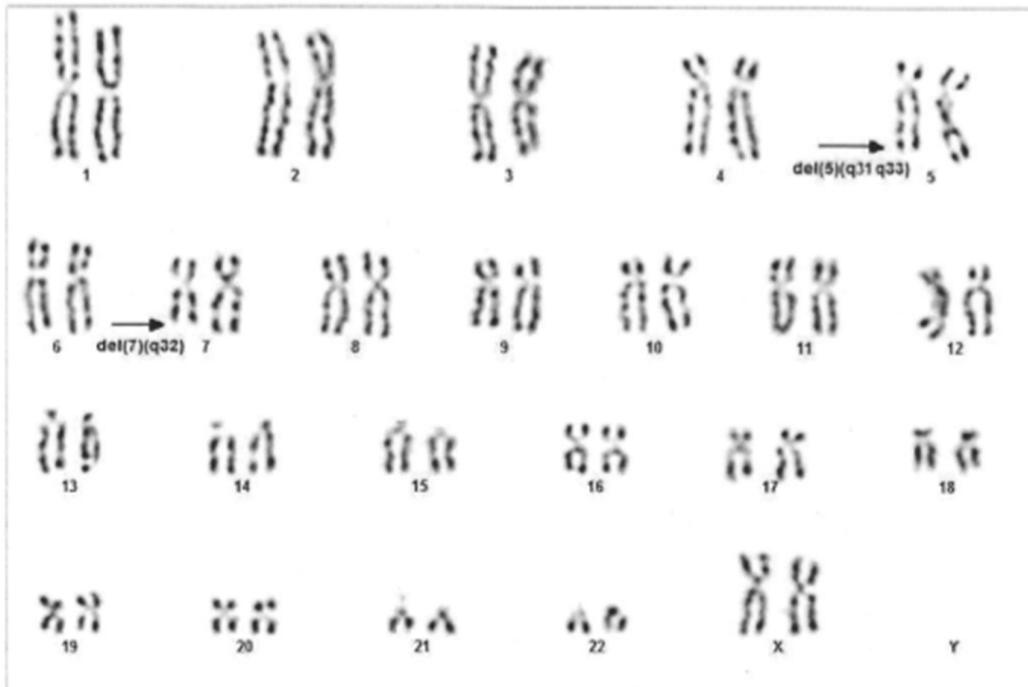
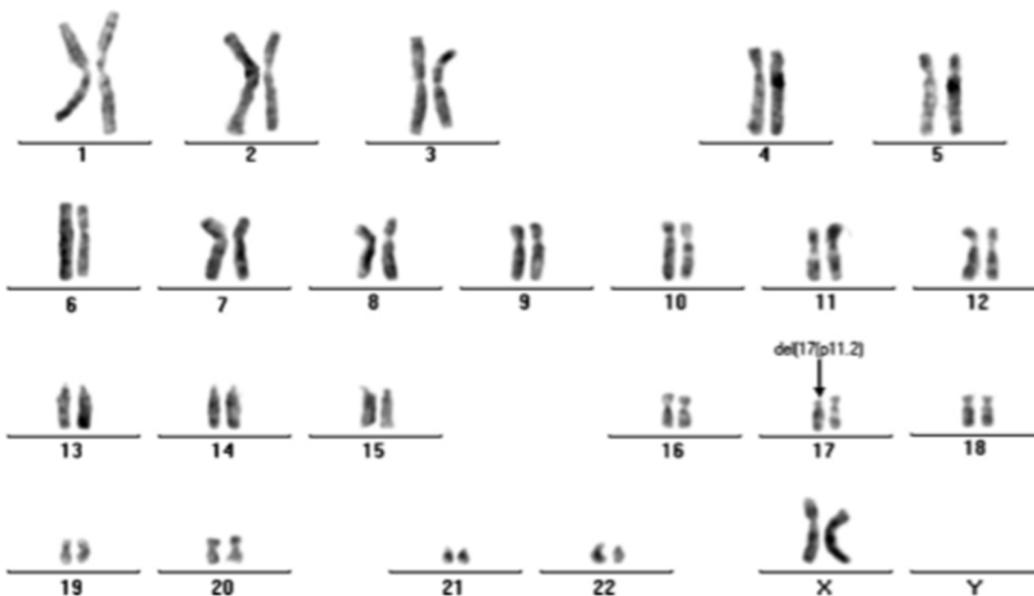


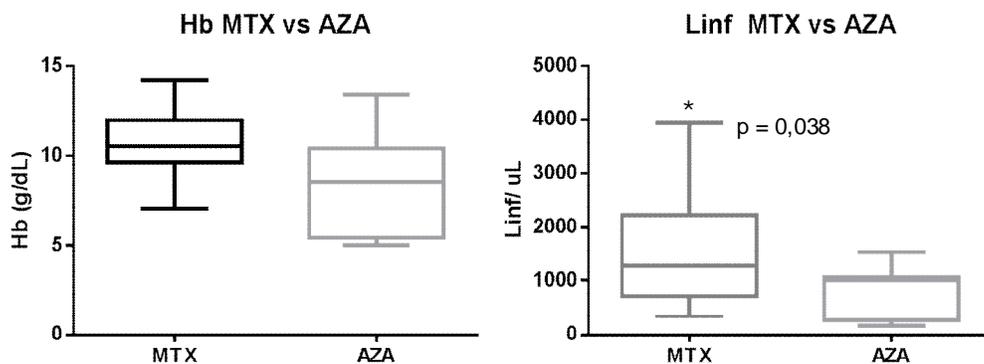
Figura 11. Cariótipo evidenciando deleção intersticial do braço curto do cromossomo 17 em indivíduo com miastenia gravis e uso prolongado de AZA.



4.3. Metotrexate versus Azatioprina

Quando realizada a análise comparativa dos grupos de indivíduos em uso de MTX e AZA, houve uma diferença estatisticamente significativa para contagem de linfócitos (Med MTX = 1278 (3929-340); $p = 0,038$), (figura 12). Contagem de leucócitos e plaquetas, bem como níveis de hemoglobina, não apresentaram diferenças estatísticas significativas, embora nesta tenha havido tendência para níveis menores da última no grupo em uso de AZA ($p = 0,066$); (figura 12).

Figura 12. Análise comparativa entre ocorrência de citopenias e utilização de MTX e AZA



4.4. Ocorrência de complicações clínicas versus displasias na medula MO

A ocorrência de complicações clínicas (transusão e infecção) esteve presente em 40 % (10) da amostra. Houve associação estatística entre o grupo que apresentou infecção e que necessitou de terapia transfusional, independente da droga utilizada, tornando evidente maior necessidade transfusional nos participantes que tiveram infecção clinicamente importante (Odds ratio = 52,5; IC = 1,81-85,7; $p = 0,0005$), (figura 13).

Não houve associação estatística entre presença de displasias significativas na MO e ocorrência de complicações clínicas (infecção e/ou transfusão; $p \geq 0,05$); (figura 14). Nesta análise foram considerados apenas 24 participantes, pois 1(um) deles apresentou mielograma hemodiluído, impossibilitando análise quanto à presença de displasias.

Figura 13. Associação entre necessidade transfusional e ocorrência de infecções em todos os participantes.

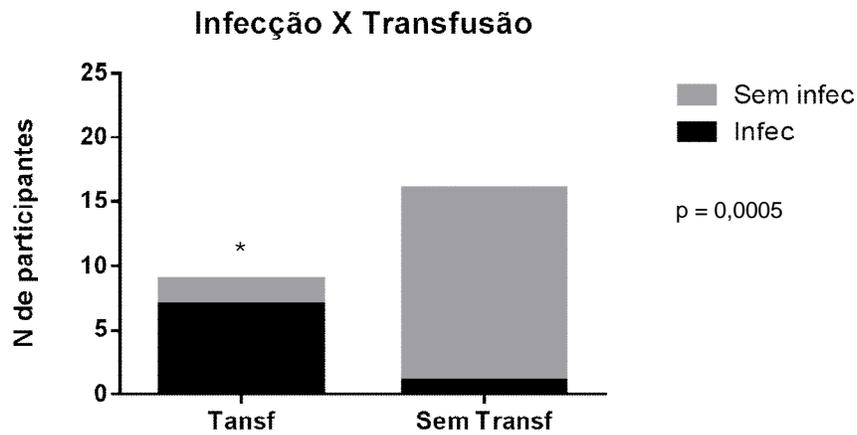
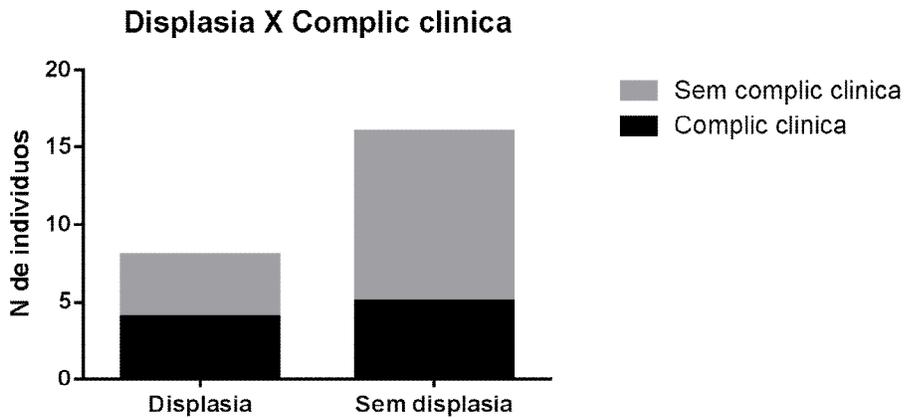


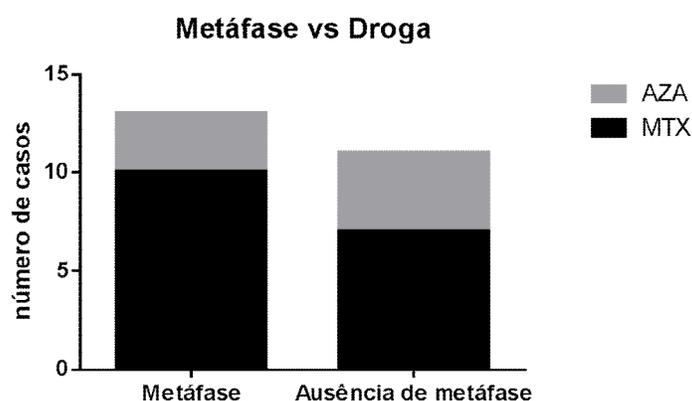
Figura 14. Associação entre presença de displasias significativas na MO e ocorrência de complicações clínicas.



4.5. Interferência na obtenção de metáfases (técnica da banda G) pelo uso de MTX e AZA

O uso de drogas imunossupressoras foi avaliado quanto à interferência na obtenção de metáfases pela técnica da banda G, uma vez que MTX pode bloquear o ciclo celular em prófase e prometáfase através do bloqueio da síntese de aminoácidos, purinas e timidinas. Do total de 25 participantes estudados foram obtidos 14 (56%) resultados com metáfase e 11 (44%) com ausência de metáfase. Não houve diferença estatística entre o número de participantes com e sem metáfases relacionado ao uso de MTX ou AZA ($p > 0,05$).

Figura 15. Associação entre a interferência na obtenção de metáfases e uso de MTX e AZA



4.6. Alterações citogenéticas e ocorrência de displasias significativas na MO

Alterações citogenéticas foram encontradas em 3 (37,5%) participantes do presente estudo dentre os 14 cariótipos que puderam ser analisados. Destes, apenas um (1) possuía alterações displásicas importantes na MO e anormalidade no cariótipo. Um dos indivíduos com alterações citogenéticas tinha mielograma normoplásico e o outro, alterações inespecíficas. Não houve associação estatística entre achado de anormalidades citogenéticas e ocorrência de alterações displásicas no estudo da MO ($p > 0,05$).

Figura 16. Associação entre alterações citogenéticas e ocorrência de displasias significativas na MO dos participantes em uso de MTX e AZA

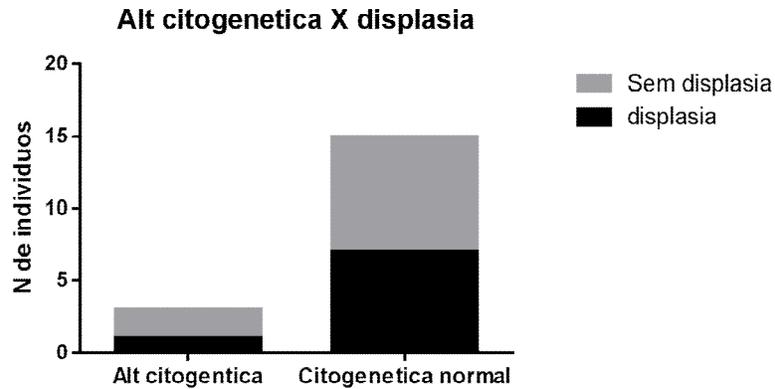


Tabela 9 - Análise Morfológica e Citogenética da Medula Óssea de todos os indivíduos

Caso	Droga	Idade	Citogenética	Mielograma
1	MTX	59	46, XX[10]	Inespecífico
2	MTX	71	46, XX[15]	Inespecífico
3	MTX	80	46, XX [20]	Diseritropoese > 10%
4	AZA	36	Ausência de metáfase	Inespecífico
5	MTX	57	46, XX del (5)(?q13q22) [4]/ 46, XX [16]	Normoplásico
6	MTX	87	46,XX[20]	Inespecífico
7	AZA	20	46,XX, del (5)(q31q33), del (7) (q32), 46, XX[14]	Inespecífico
8	MTX	45	46,XX [7]	AREB – II
9	MTX	71	46,XX[7]	Inespecífico
10	MTX+LEF	81	Ausência de metáfase	Inespecífico
11	MTX	84	Ausência de metáfase	Inespecífico
12	AZA	44	Ausência de metáfase	Hemodiluído
13	AZA	26	46,XX del (17) (p11.2)[3]/ 46, XX[4]	Diseritro/disgranulopoese
14	MTX	65	Ausência de metáfase	Inespecífico
15	MTX	83	Ausência de metáfase	Diseritropoese > 10%
16	MTX	58	Ausência de metáfase	Inespecífica
17	MTX#	62	46,XX[15]	Normoplásico
18	AZA	62	Ausência de metáfase	10% sideroblastos anel
19	MTX+LEF	43	Ausência de metáfase	Inespecífico
20	MTX+LEF	51	Ausência de metáfase	Diseritropoese > 10%
21	MTX+LEF	74	46,XX[20]	blastos, bastonetes Auer
22	MTX+LEF	68	46,XX[20]	Inespecífico
23	AZA	30	Ausência de metáfase	Diseritropoese > 10%
24	AZA	18	46, XX [22]	Inespecífico
25	CFM	49	46, XX [22]	Inespecífico

* MTX associado ao abatacepte

MTX associado ao ifliximabe

5. DISCUSSÃO

A média de idade dos indivíduos envolvidos no presente estudo foi de 54 anos; e sua mediana, de 54 ± 7 anos. Do subgrupo de casos que apresentaram alterações displásicas importantes na medula óssea, a mediana foi condizente com a aquela total do grupo, sendo de 55 anos. Mesmo não havendo estudos para essa população no Brasil, trata-se de um a valor 10 anos inferior ao observado em estudo publicado por Magalhães e cols., compreendido entre os anos de 2003-2007, cuja mediana foi de 65 anos para indivíduos portadores de SMD primária. Tal fato pode ser explicado pela idade mais precoce em que ocorrem as doenças autoimunes e pela exposição prolongada ao MTX e AZA, drogas reconhecidamente mielotóxicas cuja literatura médica tem relatado ser também genotóxicas através de estudos de coorte (AZA) e relatos de caso (MTX) (Kwong YL e cols. 2010, Okamoto e cols.99, Murphy e cols. 2004).

Não houve diferença estatística quanto à ocorrência de infecção entre os grupos de participantes em uso de MTX e AZA. Esse fato torna-se importante uma vez que a literatura demonstra uma incidência cumulativa de infecções de 6,5% dos pacientes em uso de AZA, ao passo que estudos de coorte e revisões sistemáticas mostram apenas tendência estatística a infecções nos pacientes com AR em uso de MTX (Gisbert e Gomollón. 2008; Caporalli R e cols. 2008; Aletaha D e cols. 2003). Outros autores, no entanto, citam taxas de infecção de 33 eventos/1000 pacientes-ano em estudos duplo-cegos controlados e taxas de 0-16% em séries retrospectivas (Caporalli R e cols. 2008; Aletaha D e cols. 2003). O tamanho reduzido da amostra pode ter limitado a observação dessas diferenças entre os grupos.

Linfopenia e tendência a menores níveis de hemoglobina foram achados presentes em indivíduos em uso de AZA quando comparado ao grupo em uso de MTX. Tal observação pode não ser apenas consequência do uso da droga, uma vez que os participantes em uso de AZA foram na maioria portadores de LES em atividade inflamatória da doença cujos níveis de linfócitos estão sabidamente reduzidos em tal condição.

Embora esteja descrita a potencialização dos efeitos mielotóxicos do MTX pela LEF (Fox R e cols. 2014), não foi verificada diferença estatística nos níveis

de hemoglobina e na contagem de leucócitos, linfócitos e plaquetas quando comparado MTX em monoterapia com associação MTX + LEF.

A ocorrência de displasias importantes nos usuários de MTX, pelo mielograma, esteve associada a uma menor contagem de leucócitos e linfócitos, não o fazendo para hemoglobina e plaquetas. Possivelmente, a atividade inflamatória da AR pode ter influenciado alterações destas últimas, uma vez que anemia e trombocitose podem ocorrer nesses pacientes (Fox R, Creamer P. 2013).

Quantificação da atividade da doença utilizando índices de escores compostos para LES (ex:SLEDAI) e AR (ex:DAS 28) foi uma das limitações do estudo, pois sabe-se que as citopenias estão frequentemente associadas a atividade inflamatória das colagenoses. Tal observação pode influenciar diretamente os achados das citopenias encontradas frente ao uso das drogas envolvidas no estudo, bem como associação daquelas com a ocorrência de displasias na MO. O registro irregular das informações necessárias nos prontuários foi a principal limitação para o cálculo dos índices.

Alteração citogenética foi observada apenas em 1(um) indivíduo em uso de MTX em que foi verificada deleção intersticial do braço longo do cromossomo 5 (46, XX del (5)(?q13q22) [4]/ 46, XX [16]). O mielograma do participante correspondente foi, entretanto, normoplásico. Embora 27% das alterações displásicas encontradas no mielograma de pacientes com DAI sejam reativas e, portanto, transitórias, o mesmo não possa ser afirmado quanto às alterações cromossômicas pela falta de dados na literatura (Hunt e cols. 2013). Portanto, a necessidade de acompanhamento das citopenias, suspensão do MTX e reavaliação periódica do cariótipo são sugeridas uma vez que não se pode prever o prognóstico.

A ocorrência de displasias importantes na medula de usuários de AZA não apresentou associações estatísticas com os níveis de hemoglobina, contagem de leucócitos, linfócitos ou plaquetas. Mais uma vez, o tamanho reduzido da amostra pode não ter favorecido tal inferência.

Foram encontradas alterações no cariótipo de dois indivíduos em uso de AZA. Em um deles, houve deleções intersticiais nos cromossomos 5 e 7 (46,XX,del(5)(q31q33),del7(q32)[4]). Tratava-se de uma participante do sexo feminino, de 20 anos de idade, portadora de LES e plaquetopenia imune. A

mesma vinha em uso de 150mg/dia de AZA por 3 anos quando apresentou epistaxe volumosa e pancitopenia, revertida após suspensão da droga e aumento da dose da corticoterapia. Não havia critérios clínicos para atividade da doença, bem como alterações nos níveis de complemento, marcadores inflamatórios de fase aguda e alterações no sedimento urinário. Porém não foi possível mensurar atividade da doença por meio de escores compostos de doença (SLEDAI) devido ausência de todas as informações necessárias no prontuário. No outro caso, deleção intersticial no braço curto do cromossomo 17 (46, XX del(17)(p11.2) [3]) foi observada. Neste, tratava-se também de uma participante do sexo feminino, 26 anos de idade, portadora de mistenia gravis há 6 anos e uso de AZA 50mg/dia há 5 anos. Desenvolveu anemia refratária à eritropoetina e necessitou de repetidas transfusões, tendo então sido suspenso uso da AZA. A exemplo do outro caso houve reversão da anemia e melhora da dependência transfusional, mas que apenas ocorreu após meses da suspensão da AZA.

Não houve diferença quanto à obtenção de cariótipos viáveis para análise entre os indivíduos em uso de MTX e AZA. O índice de ausência de metáfases foi de 40,7%, acima do valor de 30%, relatado na literatura, o que pode ter interferido nos resultados. O baixo índice de mitoses observado nos pacientes com SMD e mielodisplasia pode explicar a reduzida obtenção de metáfases no presente estudo.

A associação estatística encontrada entre infecção e transfusão corroborou com as observações da prática clínica em que pacientes com infecções clinicamente importantes necessitam de maior suporte transfusional. Coorte retrospectiva de 10 anos, desenvolvida em pacientes australianos com SMD, relatou de maneira semelhante que a dependência transfusional está associada ao risco de infecções bacterianas (RR 1,75), fungicas (RR 3,13) e sepse como causa de morte (RR 1,23) (McQuilten ZK e cols. 2013).

A ocorrência de alterações citogenéticas foi de 37,5% no presente estudo sendo, portanto inferior àquela relatada na literatura. Revisão sistemática publicada em 2010 encontrou 79% de alterações citogenéticas em pacientes com DAI e pacientes submetidos a transplantes de órgãos sólidos, nos quais foram encontradas monossomias do cromossomo 7, deleções nos braços longos dos cromossomos 5 e 7 e rearranjos do cromossomo 11q23. Foram

verificados 13% de casos com SMD-t a análise morfológica da MO. Neste estudo, a média de tempo de uso de AZA foi de 65 meses, sendo a dose cumulativa média de 146g (Kwong YL, 2010). Outros autores relatam alterações cromossômicas clonais de 80-95% em SMD-t, bem como maior percentagem de cariótipos complexos (5,3 por caso) e clones citogenéticos não-relacionados (Chauffille MLLF, 2006). A não visualização de metáfases em quase metade dos casos (44%) pode ter interferido para o baixo índice de alterações citogenéticas encontradas, uma vez que alguns casos tiveram alterações displásicas importantes no mielograma, mas não obtiveram metáfases para análise do cariótipo.

Outra limitação encontrada frente ao presente estudo foi a estimativa da quantidade cumulativa das drogas utilizada pelos participantes. Novamente, o registro irregular das informações nos prontários foi uma limitação para obtenção de tal dado. A má aderência de alguns participantes também influenciou negativamente o registro das informações do uso das drogas.

6. CONCLUSÃO

É fundamental o acompanhamento do hemograma de pacientes com DAI em uso crônico de drogas imunossupressoras, pois não apenas atividade da doença, mas também efeitos citotóxicos e alterações displásicas podem contribuir para o surgimento de citopenias. Embora estudos retrospectivos evidenciem perfil de segurança aceitável quanto à ocorrência de infecções em indivíduos que fazem uso crônico de MTX e AZA, a associação entre infecções e necessidade transfusional torna evidente a necessidade de uma monitorização clínica cuidadosa naqueles que apresentam tais complicações.

A capacidade da AZA em promover lesão no cariótipo e expansão clonal através da pressão seletiva sobre células mielóides mutantes é consistente com um papel no desenvolvimento de SDM-t, indicando que AZA pode atuar como agente leucemogênico (Heredia F e *co/s.* 2010). Tal mecanismo parece ser semelhante nos indivíduos em uso de MTX.

O achado de alterações citogenéticas pela análise do cariótipo, mesmo não associadas a displasias importantes na MO, requer segmento clínico próximo por não se conhecer o prognóstico de tais alterações, uma vez que o surgimento de um clone medular potencializa o risco de desenvolvimento de SMD-t.

REFERÊNCIAS

YOUNG N.S. Aplastic Anemia, Myelodysplasia, and Related Bone Marrow Failure Syndromes: Introduction. **Harrison** 17ed, parte VI, seção 2, capítulo 102.

COLL D.C., LANDAW A.S. Clinical Manifestations of the Myelodysplastic Syndromes, **UptoDate**, Topic 4492, version 12.0, 2012.

GREENBERG PL, TUECHLER H, SCHANZ J, *e cols.* Revised International Prognostic Scoring System (IPSS-R) for myelodysplastic syndromes. **Blood** v.120, n.12, p.2454-65, 2012.

SCHANZ J., TÜCHLER H., SOLÉ F. *e cols.* New comprehensive cytogenetic scoring system for pfoxrimary myelodysplastic syndromes (MDS) and oligoblastic acute myeloid leukemia after MDS derived from an international database merge. **J Clin Oncol**, v.30. n.8, p.820-9, 2012.

MOTA L.C.H., CRUZ B.A., BRENOL C.V. *e cols.* 2011 consensus of the Brazilian Society of Rheumatology for diagnosis and early assessment of rheumatoid arthritis. **Rev. Bras. Reumato**, v.51, n.3:<http://dx.doi.org/10.1590/S0482-50042011000300002>, 2011.

SCHRIER SL, CAMASCHELLA C. Anemia of chronic disease (anemia of [chronic] inflammation). **UptoDate**, Topic 7149, version 20.0, 2014.

FESSLER B.J., BOUMPAS D.T. Severe major organ involvement in systemic lupus erythematosus. Diagnosis and management. **Rheum Dis Clin North Am**; v.21, p.81, 1995.

HOCHBERG MC. Updating the American College of Rheumatology revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus (letter). **Arthritis Rheum**, v.40, p.1725, 1997.

PETRI M, ORBAI AM, ALARCÓN GS, et al. Derivation and validation of the Systemic Lupus International Collaborating Clinics classification criteria for systemic lupus erythematosus. **Arthritis Rheum**, v.64, p.2677, 2012.

SCHUR P.H., GLADMAN D.D. Overview of the clinical manifestations of systemic lupus erythematosus in adults. **UptoDate**, Topic 4674, version 10.0. 2013.

SCHUR P.H., MATTESON E.L. Overview of the systemic and nonarticular manifestations of rheumatoid arthritis. **UptoDate**, Topic 7511, version 14.0. 2014.

EHRENFELD M, SHOENFELD Y. Hematologic manifestations of rheumatoid arthritis. **UptoDate**, Topic 7512, version 10.0. 2013.

SCHUR P.H., GLADMAN D.D. Overview of the clinical manifestations of systemic lupus erythematosus in adults. **UptoDate**, Topic 4674, version 10.0. 2013.

FOX R., CREAMER P. Treatment of systemic and extraglandular manifestations of Sjögren's syndrome. **UptoDate**, Topic 14921, version 3.0. 2013.

RAMOS-CASALS M., BRITO-ZERÓN P., PEREZ-DE-LIS M. *e cols.* Sjögren Syndrome or Sjögren Disease? The Histological and Immunological Bias Caused by the 2002 Criteria. **Clin Rev Allergy Immunol**, v.38, n.2-3, p.178-185, 2010.

ASSIMAKOPOULOS S.F., MICHALOPOULOU S., MELACHRINO M. *e cols.* Primary Sjögren syndrome complicated by autoimmune hemolytic anemia and pure red cell aplasia. **Am J Med Sci**, v.334, n.6, p.493-6. 2007.

LEONE G., PAGANO L., BEN-YEHUDA D., VOSO M.T. Therapy-related leukemia and myelodysplasia: susceptibility and incidence. **Haematologica**, v.92, n.10, p.1389-98, 2007.

SMITH S.M., LE BEAU M.M., HUO D., KARRISON T., SOBECKS R.M., ANASTASI J., *e cols.* Clinical-cytogenetic associations in 306 patients with therapy related myelodysplasia and myeloid leukemia: the University of Chicago series. **Blood**, v.102, p.43-52, 2003.

KNIPP S., HILDEBRANDT B., RICHTER J., HAAS R., GERMING U., GATTERMANN N. Secondary myelodysplastic syndromes following treatment with azathioprine are associated with aberrations of chromosome 7, **Haematol**; v.90, p.691-693, 2005.

YOK-LAM KWONG. Azathioprine: Association with Therapy-related Myelodysplastic Syndrome and Acute Myeloid Leukemia. **The Journal of Rheumatology**, v.37, p.3, 2010.

KWONG Y.L., AU W.Y., LIANG R.H. Acute myeloid leukemia after azathioprine treatment for autoimmune diseases: association with -7/7q-. **Cancer Genet Cytogenet**, v.104, n.2, p.94-97, 1998.

HÉCTOR COROMINAS, MONTSERRAT DOMÉNECH, DOLORS GONZÁLEZ, CÉSAR DIAZ, MARTÍN ROCA, MARIA ASUNCIÓN GARCÍA-GONZÁLEZ, SALVADOR PEÑA, MONTSERRAT BAIGE. Allelic Variants of the Thiopurine S-Methyltransferase Deficiency in Patients With Ulcerative Colitis and in Healthy Controls, **American Journal of Gastroenterology**, v.95, p.2313-2317, 2000.

FLANC R.S., ROBERTS M.A., STRIPPOLI G.F., *e cols.* Treatment for lupus nephritis. **Cochrane Database Syst Rev**, v.1, CD002922, 2004.

MORONI G., D ORIA A., MOSCA M. *e cols.* A randomized pilot trial comparing cyclosporine and azathioprine for maintenance therapy in diffuse lupus nephritis over four years. **Clin J Am Soc Nephrol**, v.1, p.925-932, 2006.

MOTA L.M.H., CRUZ B.A., BRENOL C.V .e cols. Consenso 2012 da Sociedade Brasileira de Reumatologia para o tratamento da artrite reumatóide. **Rev Bras Reumatol**; v.52, n.2, p.135-174, 2012.

HUNT K.E., SALAMA M.E., SEVER C.E., FOUCAR K. Bone marrow examination for unexplained cytopenias reveals nonspecific findings in patients with collagen vascular disease. **Arch Pathol Lab Med**, v.137, n.7, p.948-54, 2013.

OKAMOTO H., TERAMURA M., KATAMANY N. Myelodysplastic syndrome associated with low-dose methotrexate in rheumatoid arthritis. **The Annals of Pharmacotherapy**, v.38, p.172-173, 1999.

MURPHY P.T., FAY M.J., SWORDS R.T. *et al.*, Progression of myelodysplasia during low-dose methotrexate therapy in rheumatoid arthritis. **Ann Pharmacother**, v. 38, n.11, p.1969-70. 2004.

YUMIKO OKA, JUNICHI KAMEOKA, YASUHIKO HIRABAYASHI *et al.* Reversible Bone Marrow Dysplasia in Patients with Systemic Lupus Erythematosus. **Inter Med**, v.47, p.737-742, 2008.

GIANNOULI S., KANELLOPOULOU T., VOULGARELIS M. Myelodysplasia and autoimmunity. **Curr Opin Rheumatol**, v.24, n.1, p.97-102, 2012.

VOULGARELIS M., GIANNOULI S., RITIS K., TZIOUFAS A.G. Myelodysplasia-associated autoimmunity: clinical and pathophysiologic concepts. **Eur J Clin Invest**, v.34, n.10, p.690-700, 2004.

BARRET J., SAUNTHARARAJAH Y., MOLDREM J. Myelodysplastic syndrome and aplastic anemia: distinct entities or diseases linked by a common pathophysiology? **Semin Hematol**, v.37, p.15 – 29, 2000.

KORDASTI S.Y., AFZALI B., LIM Z., *et al.* IL-17 producing CD4(+) T cells, proinflammatory cytokines and apoptosis are increased in low risk myelodysplastic syndromes. **Br J Hematol**, v.145, p.64-72, 2009.

BIRNBAUM A.J., GENTILE P. Treatment of myelodysplasia in a patient with active rheumatoid arthritis. **Ann Intern Med.** v.133, n.9, p.753-4, 2000.

BARRET A.J., SLOAND E. Autoimmune mechanisms in the pathophysiology of myelodysplastic syndromes and their clinical relevance. **Haematologica**; v.94: p.449-451, 2009.

TADA Y., HO A., MATSUYAMA T., MAK T.W. Reduced incidence and severity of antigen-induced autoimmune diseases in mice lacking interferon regulatory factor-1. **J Exp Med.** Jan 20;v.185, n.2, p.231-8. 1997

GISBERT J.P., GOMOLLÓN F. Thiopurine-induced myelotoxicity in patients with inflammatory bowel disease: a review. **Am J. Gastroenterol.** v.103, n.7, p.1783-1800, 2008.

HIGGS J.E., PAYNE K., ROBERTS C., WILLIAM N.G. Are patients with intermediate TPMT activity at increased risk of myelosuppression when taking thiopurine medications? **Pharmacogenomics** v.11, n.2, p.177–188, 2010.

NEVES C., JORGE R., BARCELOS A. A teia de toxicidade do metotrexate. **Acta Reumatol Port.**, v.34, p.11-34, 2009.

STAMP L., ROBERTS R., KENNEDY M. *e cols.* The use of low dose methotrexate in rheumatoid arthritis - are we entering a new era of therapeutic drug monitoring and pharmacogenomics? **Biomed Pharmacother**, v.60, p.678-687, 2006.

FRIES J.F., WILLIAMS C.A., RAMEY D. *e cols.* The relative toxicity of disease-modifying antirheumatic drugs. **Arthritis Rheumatism**;v.36, p.297-306, 1993.

FOX R., M.D., HELFGOTT S.M., M.D. Leflunomide in the treatment of rheumatoid arthritis. **UptoDate**, Topic 7515. Version 9.0

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

HEREDIA F., MAGALHÃES J.S.S., PINHEIRO R. Therapy-related myelodysplastic syndrome with 17p deletion following long-term azathioprine treatment. **Leuk Res** v.34, p.311-312, 2010.

MA X., DOES M., RAZA A., MAYNE S. T. Myelodysplastic syndromes: Incidence and survival in the United States. **Cancer**, v. 109, n. 8, p. 1536-1542, 2007.

GERMING U. Epidemiology, classification and prognosis of adults and children with myelodysplastic syndromes. **Ann. Hematol.**, v. 87, n. 9, p. 691-699, 2008.

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

LI L., LIU X-P, NIE L., YU M-H., ZANG Y., QIN T-J., XIAO Z-J. Unique cytogenetics features of primary myelodysplastic syndromes in Chinese patients. **Leuk. Res.**, v. 33, p.1194-1198, 2009

NAEIM F., RAO P.N., GRODY WW. MYELODYSPLASTIC SYNDROMES. In: Hematopathology: morphology, immunophenotype, cytogenetics and molecular approaches. **1st ed. New York: Academic Press Publication**, p. 129-154, 2008.

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

VARDIMAN J.W., THIELE J., ARBER D.A., BRUNNING R.D., BOROWITZ M.J., PORWIT A., HARRIS N.L., LE BEAU M.M., HELLSTRÖM-LINDBERG E., TEFFERI A., BLOOMFIELD C.D.. The 2008 revision of the World Health Organization (WHO) classification of myeloid neoplasms and acute leukemia: rationale and important changes. **Blood**, v.114, n. 5, p. 937-951, 2009.

AUL C., GATTERMANN N., SCHNEIDER W.. Epidemiological and Etiological Aspects of Myelodysplastic Syndromes. **Leuk. Lymphoma**, v. 16, n. 3, p. 247-262, 1995.

HOEIJMAKERS J.H.J. DNA damage, aging, and cancer. **N England J Medicine**, v. 361, p. 1475-1485, 2009.

OLIVEIRA P.A., COLAÇO A., CHAVES R., GUEDES-PINTO H., LOPES C. Chemical Carcinogenesis. **An Acad Bras Cienc**, v. 79, n. 4, p. 593-616, 2007.

PINHEIRO R.F., SERIO F.M., SILVA M.R., BRIONES M.R., CHAUFFAILLE M.L. Association of loss of heterozygosity with cytogenetic abnormalities in acute myeloid leukemia and myelodysplastic syndrome. **Braz J Med Biol Res**, v. 41, n. 7, p. 610-614, 2008.

GAUDUCHON P., POTTIER D., BRIAND M., LECLUSE Y., LEBAILLY P., ROULLAND S. Characterization of the t(14;18) BCL2-IGH translocation in farmers occupationally exposed to pesticides. **Cancer Res**, v. 64, p. 2264-2269, 2004.

BLAIR A., CHIU B.C.H.: Pesticides, Chromosomal Aberrations, and Non-Hodgkin's Lymphoma. **J Agromedicine**, v. 14, n.2, p. 250-255, 2009.

A PETITJEAN M.I.W., ACHATZ, AL BORRESEN-DALE, P HAINAUT, M OLIVIER. TP53 mutations in human cancers: functional selection and impact on cancer prognosis and outcomes. **Oncogene**, v. 26, p. 2157–2165, 2007.

ROY D, CALAF GM. Gene expression signature of parathion-transformed human breast epithelial cells. **Int J Mol Med**, vol. 19, p. 741-750, 2007.

OLIVIER, M; HOLLSTEIN, M.; HAINAUT, P. TP53 Mutations in Human Cancers: Origins, Consequences, and Clinical Use. **Cold Spring Harb Perspect Bio** 2010, v. 2:a001008, 2010

SMITH ML, FORNACE AJ JR: Genomic instability and the role of p53 mutations in cancer cells. **Curr Opin Oncol**, v. 7, p. 69-75, 1995.

YUNIS J. High resolution on human chromosomes. **Science**, v. 191, p. 1268-1270, 1976.

CHAUFFILLE MLLF, Chromosomal abnormalities in myelodysplastic syndrome. **Rev bras hematol hemoter**, vol. 28, n. 3, p. 182-187, 2006.

MCQUILTEN ZK, POLIZZOTTO MN, WOOD EM, SUNDARARAJAN, V. Myelodysplastic syndrome incidence, transfusion dependence, health care use, and complications: an Australian population-based study 1998 to 2008. **Transfusion** vol. 53, n.8, p. 1714-1721, 2013.

CAPORALLI R, CAPRIOLI M, BOBBIO-PALAVACCINI F, MONTECUCCO C. DMARDS and infections in rheumatoid arthritis. **Autoimmunity Reviews** 2008; 8(2): 139-143.

ALETAHA D, KAPRAL T, SMOLEN JS. Toxicity profiles of traditional disease modifying antirheumatic drugs for rheumatoid arthritis. **Ann of Rheum Dis.**, vol 62, n. 5, p. 482-486, 2003.

WINGERCHUK, LENNON VA, PITTOCK SJ LUCCHINETTI CF,
WEINSHENCKER BG. Revised diagnostic criteria on neuromyelitis optica.
Neurology, v.66, n. 10, p. 1485-1489, 2006.

APÊNDICE A

MATERIAL PARA PUBLICAÇÃO

Cytogenetic Aberration Associated with Chronic Use of Immunosuppressant in Autoimmune Rheumatic Diseases

INTRODUCTION

Treatment related Myelodysplastic syndrome (MDS-t) is a clinical disease described as complication of cytotoxic therapy. Its occurrence depends on the mechanism of DNA damage, cumulative dose or intensity of the preceding cytotoxic therapy [1,2,3].

Immunosuppressant drugs used in autoimmune diseases have been linked to the development of MDS-t in series and case reports. Antimetabolites like azathioprine (AZA) and methotrexate (MTX) have been related to the development of MDS-t [4].

Cytogenetic aberrations promoted by AZA are comparable to those seen in patients who used alkylating agents. *Knipp and Cols* reported a report of fourteen patients with MDS-t due to AZA. Of utmost importance, seven of them developed acute myeloid leukemia [4]. Another research found cytogenetic aberrations in 79% of patients related to long term use of AZA. In 40% of cases, transient cytopenias were observed before the diagnosis of MDS-t [5].

Systemic Lupus Erythematosus (SLE) and Rheumatoid Arthritis (RA) are autoimmune diseases associated with organ damage without appropriate treatment. Antimetabolites like AZA and MTX are main stain drugs used to treat SLE and RA, respectively. AZA has been associated with reduction of mortality and reduction of nephritis flares [6,7]. Methotrexate is currently considered the first choice for treating RA. Its capacity to reduce signs and symptoms of RA activity, improve patients' functional status and reduce radiograph progression has been demonstrated [8].

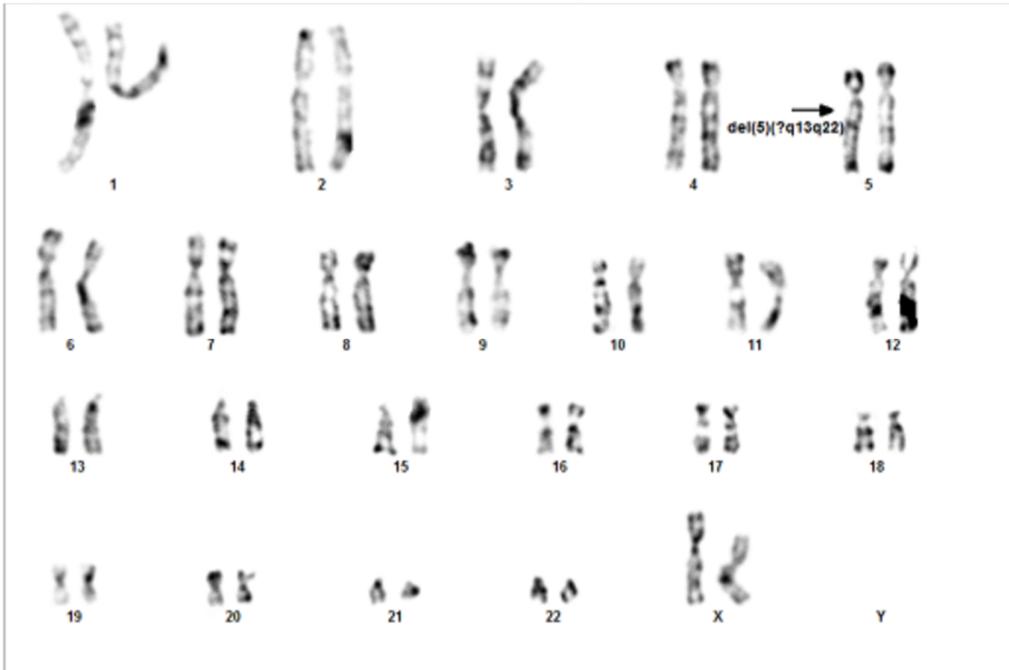
The aim of this report is to present chromosomal abnormalities in patients with autoimmune rheumatic diseases due to long standing use on immunosuppressants.

CASE 1- A 57 years old female patient diagnosed with long standing seropositive rheumatoid arthritis (>15 years) presented with persistent and progressive thrombocytopenia, for three months. She used irregularly 15mg/week of MTX since the diagnosis establishment and was followed previously by another outpatient clinic.

The patient was admitted at the tertiary rheumatologic clinic with active RA due to synovitis in knees and wrists, despite the use of MTX in the previously mentioned dose – whilst she had not been following by her rheumatologist for undisclosed reasons. Radiologic sequelae was noted in the affected joints above mentioned revealed by juxtaarticular osteopenia, subcondral bone erosions and narrowing of articular spaces in wrists and metacarpals joints. According to the Brazilian Consensus for the Treatment of Rheumatoid Arthritis, MTX dose was increased to 20mg/week, but no therapeutic EULAR response was observed in 2 months. Leflunomide was then added to control the disease. Low active disease was not achieved in three months and infliximab 3mg/kg was prescribed in association with methotrexate. Disease remission was seen in the first six months of infliximab use, but the drug was discontinued approximately 12 months after due to progressing thrombocytopenia of 134.000/dL and 112.000/dL, noted in two blood samples three months apart. One single dose of abatacept 500mg was administered after infliximab discontinuation. Admission to the hospital was decided for investigational purposes.

A bone marrow aspiration was made by iliac crista aspiration. The sample was sent to morphologic and cytogenetic studies. The former showed no alterations. Cytogenetic study was performed by G band analysis. It revealed an interstitial deletion in the chromosome 5 long arm (46 XX, del (5) (?q13q22) [4] – figure 1). Methotrexate was discontinued and platelet count recovered in few weeks. The biologic drugs have been stopped earlier to MTX. The patient was discharged with prednisone only. Antimetabolites were no more used.

Figure 1 – interstitial deletion in chromosome 5 long arm

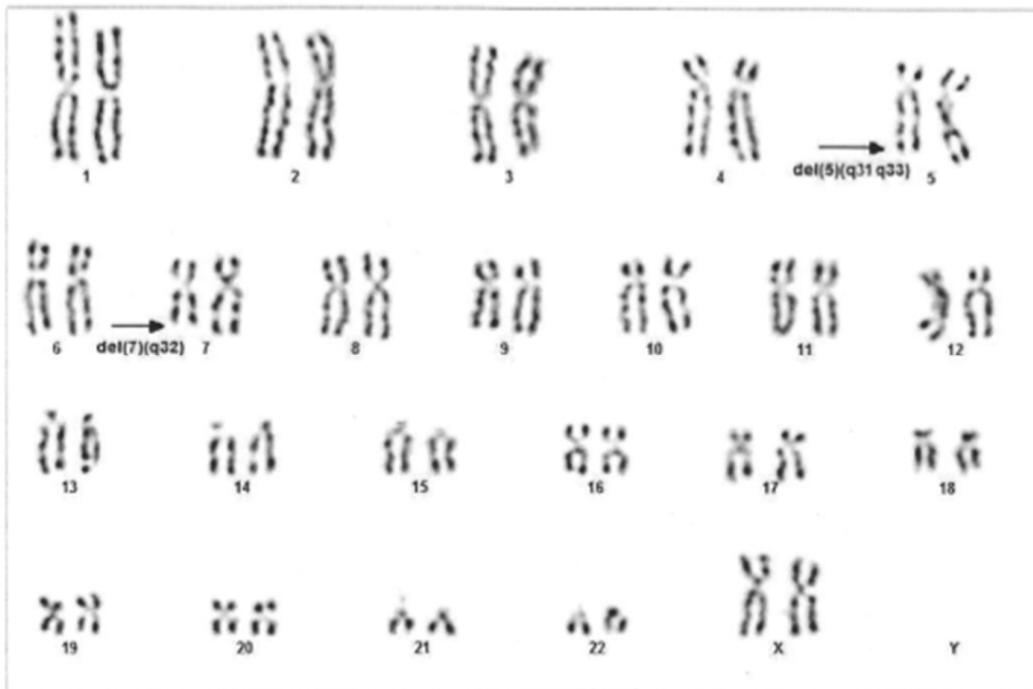


CASE 2 – A 22 years-old female-patient was diagnosed with SLE five years previously, according to 2012-updated American College of Rheumatology Criteria for Classification of SLE. The patient developed serositis (pleural effusion), arthritis, rash and autoantibodies (FAN, anti-Ro and anti-Sm) 2 years apart from the diagnosis. Prednisone 1mg/kg was started and withdrawn to 10mg/d after 8 weeks. Hydrochloroquine 400mg/d was associated along with azathioprine at 150mg/ day for steroid-sparing purposes.

She had been using AZA for three years when anemia (Hb = 10.4g/dL), leucopenia (2910/ uL) and thrombocytopenia (30000/uL) was noted. The patient presented epistaxis and was admitted at the tertiary rheumatologic clinic. A bone marrow aspiration was then made by iliac crista aspiration. Previous treatment with prednisone 30mg/day was changed to 60mg/day. Azathioprine was stopped and the clinical and laboratorial picture remitted within a week: Hb = 11.5g/dL; Leuc = 13210/ mL; Plt = 133000/ mL. Morphological analysis revealed a normocellular bone marrow with mild megakaryocytic hyperplasia, diminished plaquetopoesis and no parasites. Cytogenetic analysis showed interstitial deletion in chromosome 5 and 7 long arms [46, XX, del (5) (q31q33),del (7)(32) [4], 46 XX[11] – figure 2. She was discharged to outpatient

clinic following with prednisone only. In the outpatient clinic follow up, mycophenolate mofetil was started and up-titrated to 2000mg/d. The patient remained in good clinic control, but mild thrombocytopenia (100,000 – 150,000/ mL) has been recurrent observed.

Figure 2 – interstitial deletions in chromosomes 5 and 7 long arms



DISCUSSION

Many of the morphological characteristics reported in bone marrow study by medical literature are not specific of autoimmune diseases once they are reactive and may occur in up to 27% of patients. Noteworthy, these findings are commonly seen in MDS. So it has been suggested a cytogenetic analysis before making a diagnosis of MDS-t in patients with autoimmune diseases and unexplained cytopenias [9].

The present study demonstrated the presence of aberrant clones in cytogenetic analysis in two cases although the bone marrow studies (aspirate smears) were not suggestive of MSD-t. The presence of these mutations does not imply in positive selection and possibly the clones aroused from the drug-induced mutations may be cleared by over the time [10].

Previously reported cases are strongly supportive of a leukaemogenic role for azathioprine with monosomy of chromosome 7 being a consistent finding in the majority of cases in whom karyotyping has been performed. The reversibility of dysplastic and cytogenetic abnormalities following treatment with AZA is not clear [11].

Medical literature is scarce about the use of MTX and development of MDS-t in autoimmune diseases. Methotrexate was the main drug involved in two cases published in the same year, both female patients with seropositive rheumatoid arthritis. One patient with moderate anemia developed MDS-t and the marrow study was consistent with refractory anemia with excess blasts (RAEB), but cytogenetic study showed normal karyotype. Another case with pancytopenia reported translocation 10;18 [q11; q21] on cytogenetic analysis and marrow study revealed dyserythropoiesis e dysmegakaryopoiesis. Pancytopenia resolved after discontinuation of MTX in this patient, but not in the former [12,13]. Similarly, balanced translocation has been well described in acute myeloid leukemia related to previous use of drugs targeting DNA – topoisomerase II, particularly bands 11q23 and 21q22. [14]. More studies, however, are needed to infer the probable mechanism by which MTX may induce chromosomal abnormalities.

These cases show the importance of strict observation in the cell blood count of rheumatic patients in chronic use of immunosuppressant drugs. Not only active disease, but cytotoxic effects and dysplastic changes may contribute to development of cytopenias. The cytogenetic alterations seen in these cases cannot be responsible for the cytopenias found, but rise attention to the importance of accessing bone marrow morphology and karyotype of patients in chronic use of immunosuppressant drugs who develop persistent or recurrent cytopenias, since the rise of a medullar clone requires carefully following by the risk of MDS-t.

APÊNDICE B

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Você está sendo convidado(a) como voluntário(a) a participar da pesquisa: ESTUDO DE ALTERAÇÕES DE MEDULA ÓSSEA EM PACIENTES COM DOENÇAS AUTOIMUNES SOB TRATAMENTO COM IMUNOSSUPRESSORES. O motivo que nos leva a estudar a medula óssea de pacientes usando tais medicações é o fato de se observar alterações que podem predispor ao surgimento de doenças hematológicas nos pacientes que fazem uso crônico dessas medicações.

A pesquisa se justifica em se conhecer quais são as alterações encontradas na medula óssea de pacientes com doenças autoimunes que usam imunossupressores (medicações que diminuem a imunidade) e quais mecanismos estão relacionados a estas alterações. O objetivo desse projeto é avaliar a frequência das alterações encontradas na medula óssea dos pacientes portadores de doenças autoimunes e inflamatórias em uso de imunossupressores que apresentem anemia, plaquetas ou glóbulos brancos em baixos níveis de forma permanente ou transitória.

O procedimento de coleta de material será da seguinte forma: será realizado uma punção do osso esterno ou na crista ilíaca (bacia) com agulha padronizada. Serão retirados aproximadamente 7mL de sangue para estudo. Existe um desconforto mínimo para você quando submetido ao exame de mielograma devido à injeção anestésica e aspiração da medula. Os riscos de complicações são baixos, sendo os mais comuns hematoma e dor no local do mielograma, mas pode ocorrer mediastinite (infecção torácica grave – bastante rara). Tal procedimento se justifica pelo fato desse exame poder avaliar a presença ou o risco de desenvolvimento de doenças hematológicas graves ou potencialmente graves caso seja positivo.

Caso alterações hematológicas sejam detectadas, você será avaliado(a) por hematologista em regime de internação hospitalar ou ambulatorialmente. O

mesmo irá acompanhá-lo conjuntamente com seu médico assistente e realizar o tratamento e/ou novos exames que sejam necessários.

Você será esclarecido(a) sobre a pesquisa em qualquer aspecto que desejar. Você é livre para recusar-se a participar, retirar seu consentimento ou interromper a participação a qualquer momento. A sua participação é voluntária e a recusa em participar não irá acarretar qualquer penalidade ou perda de benefícios.

O(s) pesquisador(es) irá(ão) tratar a sua identidade com padrões profissionais de sigilo. Os resultados dos exames laboratoriais serão enviados para você e permanecerão confidenciais. Seu nome ou o material que indique a sua participação não será liberado sem a sua permissão. Você não será identificado(a) em nenhuma publicação que possa resultar deste estudo. Uma cópia deste consentimento informado será arquivada no Laboratório de Citogenômica do Câncer do Departamento de Patologia da Universidade Federal do Ceará, e outra será fornecida a você.

A participação no estudo não acarretará custos para você e não estará disponível nenhuma compensação financeira adicional. No caso você sofrer algum dano decorrente dessa pesquisa serão garantidos todos os recursos de assistência médica para tratamento do mesmo. No entanto, nenhuma compensação financeira será dispensada.

Eu,

_____ fui informada (o) dos objetivos da pesquisa acima de maneira clara e detalhada e esclareci minhas dúvidas. Sei que em qualquer momento poderei solicitar novas informações e motivar minha decisão se assim o desejar. O professor orientador Max Victor Carioca Freitas e o professor co-orientador Ronald Feitosa Pinheiro certificaram-me de que todos os dados desta pesquisa serão confidenciais.

Também sei que caso existam gastos adicionais, estes serão absorvidos pelo orçamento da pesquisa. Em caso de dúvidas poderei chamar a estudante José Djandir Costa Filho, o professor orientador Max Victor Carioca Freitas ou o professor co-orientador Ronald Feitosa Pinheiro no Departamento de

Patologia e Medicina Legal sito na Rua Monsenhor Furtado s/n – Rodolfo Teófilo cujo telefone é (85) 3366-8300 ou o Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Geral Dr. César Cals de Oliveira sito na Av. do Imperador, 545 - Centro e do Hospital Geral de Fortaleza sito na Rua Ávila Goulart 900 – Papicu cujos os números são respectivamente: 3101-5342 e 3101-3345.

Declaro que concordo em participar desse estudo. Recebi uma cópia deste termo de consentimento livre e esclarecido e me foi dada a oportunidade de ler e esclarecer as minhas dúvidas.

Nome	Assinatura do Participante	Data
Nome	Assinatura do Pesquisador	Data
Nome	Assinatura da Testemunha	Data

APÊNDICE C

HOSPITAL GERAL DR. CÉSAR
CAL/S/S/S/S



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: ESTUDO DE ALTERAÇÕES DE MEDULA ÓSSEA EM PACIENTES COM DOENÇAS AUTOIMUNES SOB TRATAMENTO COM IMUNOSSUPRESSORES

Pesquisador: José Djandir Costa Filho

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 11506812.5.0000.5041

Instituição Proponente: Hospital Geral Dr. César Cals/SES/SUS

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 191.850

Data da Relatoria: 01/02/2013

Apresentação do Projeto:

Trata-se de um estudo transversal em que os autores pesquisarão alterações de polimorfismo genético da enzima Tiopuril-Metil-Transferase (TPMT) em usuários crônicos de azatioprina e suas alterações citogenéticas. Serão recrutados 30 pacientes em hospitais públicos terciários de Fortaleza (nomes não citados) e a análise genética será feita no Laboratório de Citogenômica do Câncer da Universidade Federal do Ceará (UFC). Os critérios de inclusão e exclusão estão bem definidos. Haverá um punção de medula óssea no esterno ou na crista ilíaca.

Objetivo da Pesquisa:

Avaliar a frequência das alterações citogenéticas da SMD encontrada nos pacientes portadores de doenças autoimunes e inflamatórias (DAI) em uso de Drogas Modificadoras do Curso da Doença (DMCD) e imunossupressores que apresentem citopenias permanentes ou transitórias, a despeito da suspensão da(s) droga(s) envolvida(s), atendidos em hospitais terciários em Fortaleza.

Objetivo Secundário:

1) Identificar a frequência das alterações citogenéticas encontradas pela técnica padrão (banda G) e avaliar possíveis associações com a gravidade clínica (IPSS-R) 2) Avaliar a frequência de envolvimento do gene p53, pela deleção do braço curto do cromossomo 17 (17p-), através de citogenética molecular (FISH) 3) Identificar a frequência dos diferentes polimorfismos da enzima Tiopuril-Metil-Transferase (TPMT) nos pacientes em

Endereço: Av. Imperador, nº 372

Bairro: Centro

CEP: 60.015-052

UF: CE

Município: FORTALEZA

Telefone: (853)101-5354

Fax: (853)101-5354

E-mail: ceap@hgcc.ce.gov.br

uso de azatioprina portadores de SMD-t e associá-las com as alterações citogenéticas encontradas pela técnica padrão (banda G)

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

os riscos existentes decorrem de complicações do procedimento (punção de medula óssea) que é um evento bastante raro Benefício seria a identificação de pacientes com alterações de polimorfismo genético da enzima Tiopuril-Metil-Tranferase(TPMT)entre os usuários de azatioprina e que poderiam orientar decisões terapêuticas

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

A pesquisa é relevante porque busca identificar alterações genéticas ocasionadas pelo uso crônico de droga imunossupressora que poderá determinar complicações graves e definitivas entre os usuários desta medicação. O protocolo de pesquisa está bem estruturado e a indicação de estudo da medula óssea destes pacientes já tem indicação clínica definida.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

TCLE agora encontra-se em linguagem mais adequada e foi incluído o Termo de compromisso do laboratório sobre o armazenamento e uso das amostras de medula óssea

Recomendações:

nenhuma

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

aprovado

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

FORTALEZA, 01 de Fevereiro de 2013

Assinador por:
ANTONIO LUIZ CARNEIRO JERONIMO
(Coordenador)

Dr. Antonio Luiz C. Jerônimo
R. Fortaleza
CURR 4776

Endereço: Av. Imperador, nº 372
Bairro: Centro CEP: 60.015-052
UF: CE Município: FORTALEZA
Telefone: (853)101-5354 Fax: (853)101-5354 E-mail: ceap@hgcc.ce.gov.br