



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
FACULDADE DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE CIRURGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO *STRICTO SENSU* EM CIÊNCIAS MÉDICO -
CIRÚRGICAS

FERNANDO BARROSO DUARTE

ESTUDO MOLECULAR DO GENE *TP53* E DA EXPRESSÃO DA PROTEÍNA p53
NAS CARACTERÍSTICAS PROGNÓSTICAS DE PACIENTES COM SÍNDROME
MELODISPLÁSICA DE BAIXO RISCO

FORTALEZA

2016

FERNANDO BARROSO DUARTE

**ESTUDO MOLECULAR DO GENE *TP53* E DA EXPRESSÃO DA PROTEÍNA p53
NAS CARACTERÍSTICAS PROGNÓSTICAS DE PACIENTES COM SÍNDROME
MIELODISPLÁSICA DE BAIXO RISCO**

Tese submetida à Coordenação do Programa de Pós- Graduação *Stricto Sensu* em Ciências Médico – Cirúrgicas do Departamento de Cirurgia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará, como critério para obtenção do Grau de Doutor em Ciências Médico-Cirúrgicas.

Orientador: Prof. Dr. Paulo Leitão de Vasconcelos
Co-Orientador: Profa.Dra.Romélio Pinheiro Gonçalves Lemes

FORTALEZA

2016

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

-
- D872e Duarte, Fernando Barroso.
Estudo molecular do gene *tp53* e da expressão da proteína p53 nas características prognósticas de pacientes com síndrome mielodisplásica de baixo risco. / Fernando Barroso Duarte. – 2016.
78 f.: il. color.
- Tese (doutorado) – Universidade Federal do Ceará; Faculdade Medicina; Departamento de Cirurgia; Programa de Pós-Graduação Ciências Médico-Cirúrgicas; Doutorado em Cirurgia, Fortaleza, 2016.
Área de Concentração: Metabolismo, Fisiologia e Biologia Celular no Estresse.
Orientação: Prof. Dr. Paulo Leitão de Vasconcelos.
Co-Orientação: Profa. Dra. Romélia Pinheiro Gonçalves Lemes.
1. Genes TP53. 2. Síndromes Mielodisplásicas. 3. Células-Tronco Hematopoéticas. 4. Transplante de Células. 5. Prognóstico. I. Título.

CDD 617

FERNANDO BARROSO DUARTE

**ESTUDO MOLECULAR DO GENE *TP53* E DA EXPRESSÃO DA PROTEÍNA p53
NAS CARACTERÍSTICAS PROGNÓSTICAS DE PACIENTES COM SÍNDROME
MIELODISPLÁSICA DE BAIXO RISCO**

Aprovada em ____/____/____

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Paulo Leitão de Vasconcelos (Orientador)
Universidade Federal do Ceará-UFC

Prof^a. Dr^a. Maria da Silva Pitombeira
Universidade Federal do Ceará-UFC

Prof. Dr. Francisco Dário da Rocha
Central de Análises Clínicas -CAC

Prof. Dr. Sérgio Botelho Guimarães
Universidade Federal do Ceará-UFC

Prof^a. Dra. Lúcia Mariano da Rocha Silla
Universidade Federal do Rio Grande do Sul-UFRS

DEDICATÓRIA

A minha esposa Pastora e aos meus filhos João Victor, Beatrice, Isabella e Fernando Filho, que são meu esteio e meu estímulo para tentar ser um homem melhor a cada dia

AGRADECIMENTOS

Dra Pastora Maria de Araújo Duarte, medica assistente, HUWC

Dr Paulo Roberto Leitão de Vasconcelos, professor titular, HUWC

Dra Romelia Pinheiro Goncalves Lemes, professora titular da FFOE/UFC

Dra Lucia Rocha M Silla, professora titular, UFRGS

Dra Maria da Silva Pitombeira, professora emérita, UFC

Dr Sergio Botelho Guimarães, professor, UFC, cirurgia

Samuel Landim, graduando de medicina da Unichristus

Dr Francisco Dario Rocha, professor aposentado da UFC, responsável pelo serviço de Anatomia Patológica do Laboratório Central de Análises Clínicas

Maritza Cavalcante Barbosa, doutoranda da Farmácia, UFC

Talyta Ellen de Jesus dos Santos, doutoranda da Farmácia, UFC

Dra Ilana Zalcborg , doutora , INCA

Dr Diego Coutinho, doutor, INCA

Dr João Paulo Vasconcelos, médico da hematologia e TMO do HUWC

Dra Luciana Barros Carlos, diretora do HEMOCE

Dra Margareth Vasconcelos, diretora administrativa, Nutriquímio

LISTA DE FIGURAS

Figuras	Descrição	Pg
Figura 1	Modelo de desenvolvimento e progressão da SMD	14
Figura 2	Eventos secundários relacionados com a progressão da SMD	15
Figura 3	Mecanismos de morte celular envolvidos na patogénese da SMD	17
Figura 4	Forte marcação para a proteína p53 ao diagnóstico em paciente com SMD de baixo risco	38
Figura 5:	Curva de sobrevivência livre de eventos combinados (LMA ou óbito) para pacientes com SMD de baixo risco, de acordo com a expressão da proteína p53.	46
Figura 6	Imagens referente ao paciente, com SMD de baixo risco do caso 1	52

LISTA DE TABELAS

Tabelas	Descrição	Pg
Tabela 1	Classificação Franco-Americana na SMD	19
Tabela 2	Classificação da Organização Mundial da Saúde da SMD (2008)	21
Tabela 3	Classificação da SMD de acordo com a WHO 2016	23
Tabela 4	Sistema Internacional de Escore Prognóstico (IPSS) para SMD	26
Tabela 5:	Sistema Internacional de Escore Prognóstico (IPSS-R) para SMD	27
Tabela 6:	Parâmetros do hemograma ao diagnóstico dos pacientes com SMD	41
Tabela 7	Classificação dos pacientes com SMD do estudo em relação a OMS 2016	42
Tabela 8	Influência da expressão imunohistoquímica da proteína p53 sobre as características clínicas de paciente com SMD de baixo risco	44
Tabela 9	Frequência genotípica e alélica nos pacientes em estudo.....	47
Tabela 10	Influencia do polimorfismo R72P sobre as características clínicas de pacientes com SMD de baixo risco	48
Tabela 11	:Características clínicas e laboratoriais , ao diagnóstico de pacientes com SMD com mutação no gene TP53	50
Tabela 12	Características laboratoriais dos pacientes submetidos ao TCTH com SMD	54

LISTA DE ABREVIATURAS

SMD	síndrome mielodisplásica
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
LMA	Leucemia mielóide aguda
<i>Stem cells</i>	Célula tronco hematopoética
FAB	Franco – Americano-Britânico
AR	Anemia refratária
ARSA	Anemia refratária com sideroblasto em anel
AREB	Anemia refratária com excesso de blastos
AREB-T	Anemia refratária com excesso de blastos em transformação
LMMC	Leucemia mielomonocítica crônica (LMMC)
OMS	Organização Mundial da Saúde
CRDU	Citopenia refratária com displasia unilinhagem
NR	Neutropenia refratária
TR	Trombocitopenia refratária
CRDM	Citopenia refratária com displasia multilinhagem
AREB-1	Anemia refratária com excesso de blastos 1
AREB-2	Anemia refratária com excesso de blastos 2
MO	Medula óssea
SP	Sangue periférico
IPSS	Sistema de Escore Prognóstico
IPSS-R	Sistema de Escore Prognóstico Revisado
DNA	ácido desoxirribonucleico.
RNA	ácido ribonucleico.
p53	Proteína do gene 53
p21	Proteína do gene 21
GADD-45	GrowthArrestDNADamageInducible
TCLE	Termo de consentimento livre e esclarecido
HUWC	Hospital Universitário Walter Cantídio
VCM	Volume Corpuscular Médio
CD34	<i>Cluster of Differentiation 34</i>
TP53	Gene 53

SNP	Polimorfismo de nucleotídeo único
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra acético.
CEMO	Centro de Transplante de Medula Óssea
INCA	Instituto Nacional do Câncer
IARC	Agência Internacional de Pesquisa do Câncer
PCR	Reação de cadeia em polimerase
LMC	Leucemia Mielóide Crônica
KDa	Kilodaltons (unidade de medida de massa)
WPSS	Sistema de escore de prognóstico da OMS
TCTH	Transplante de células tronco hematopoéticas
G-CSF	Fator estimulador de colônias granulocíticas
Hb	Concentração de hemoglobina
Ht	Hematócrito
HCT-CI	Índice de comorbidade
HLA	Antígeno de histocompatibilidade dos leucócitos
CIR	Condicionamento de intensidade reduzida
DECH	Doença enxerto versus hospedeiro
TRM	Mortalidade relacionada ao transplante
SMD-NC	Síndrome mielodisplásica de causa desconhecida
AA	Anemia Aplástica
NCCN	<i>National Comprehensive Cancer Network.</i>
EBMT	Banco Europeu para transplantes de sangue e medula
CIBMTR	<i>Center for International Blood and Marrow Transplant Research.</i>
LMAS	Leucemia mielóide aguda secundária
SNVS	Variante somática de nucleotídeo único
NF-kB	Fator nuclear kappa beta
NLRP3	Receptor da família do NLR (receptores que reconhecem o padrão de repetição ricos em leucinas e de domínio que se ligam a nucleotídeo)
ALIP	<i>atypical localization of immature progenitor cells</i>

RESUMO

ESTUDO MOLECULAR DO GENE *TP53* E DA EXPRESSÃO IMUNOHISTOQUÍMICA DA PROTEÍNA p53 NAS CARACTERÍSTICAS PROGNÓSTICAS DE PACIENTES COM SÍNDROME MIELODISPLÁSICAS DE BAIXO RISCO

A Síndrome Mielodisplásica (SMD) compreende um conjunto heterogêneo de doenças clonais com a patogênese complexa, que envolve várias etapas e fatores. As mutações no gene TP53 têm sido implicadas em alterações na homeostase de células progenitoras, com impacto em funções relevantes no desenvolvimento de neoplasias, como manutenção da integridade genômica, regulação do ciclo celular, apoptose e resposta inflamatória. O objetivo do estudo foi investigar o impacto da expressão da proteína p53, mutações no gene TP53 e do polimorfismo R72P em pacientes com SMD de baixo risco associando-os aos marcadores clínicos e com escores prognósticos e a sua aplicabilidade como critério adicional para auxiliar a indicação do TCTH. Trata-se de um estudo analítico e prospectivo envolvendo 73 pacientes, de ambos os sexos estratificados como de baixo risco, em acompanhamento no ambulatório do Hospital Universitário Walter Cantídio (HUWC), no período de fevereiro de 2012 a agosto de 2016. A expressão da proteína p53 foi avaliada por imunohistoquímica, as mutações e o polimorfismo R72P foram analisados por sequenciamento direto. A análise estatística utilizou o programa GraphPad Prism 5.0 e considerou o nível de significância do $p < 0,05$. Dos 73 pacientes que participaram do estudo, 20 (27,4%) foram positivos para a expressão da proteína p53. No grupo com expressão de p53 houve significativa redução dos níveis de hemoglobina e hematócrito com aumento da frequência de fibrose, hipercelularidade e positividade CD34 em megacariócitos. Dos 73 pacientes, 35 foram analisados quanto a pesquisa da mutação do TP53 e do polimorfismo R72P. Foram identificadas duas mutações na população em estudo, com uma frequência de 5,7%. Uma mutação *nonsense* foi identificada pela primeira vez na SMD, em um paciente do sexo feminino e uma mutação *missense*, ainda não descrita na literatura, em um paciente do sexo masculino. Quanto ao polimorfismo R72P, houve uma predominância do alelo G e do genótipo GG. Todos os pacientes com o genótipo “heterozigoto” (CG) foram do sexo masculino. Não houve associação entre as mutações, os genótipos do polimorfismo e as variáveis clínicas e de prognóstico. Durante o seguimento do estudo, dois pacientes apresentaram indicação para o transplante de células tronco hematopoiéticas. Um deles foi positivo para p53 em 40% dos precursores granulocíticos e foi a óbito seis meses após o diagnóstico. O segundo, negativo para a expressão de p53 e mutação TP53, foi submetido ao TCTH, e encontra-se estável. Os resultados mostraram que a expressão

de p53 pode influenciar evolução clínica e está associada a pior prognóstico, mesmo em pacientes de baixo risco refletindo a complexidade da SMD e fornecendo subsídios para novos estudos, a fim de esclarecer o impacto do gene TP53 e da expressão da proteína na origem, na progressão da doença e na conduta terapêutica, incluindo o TCTH.

Palavras-chave: Síndrome Mielodisplásica; TP53; R72P; Prognóstico; Transplante de Células-Tronco Hematopoiéticas

ABSTRACT

MOLECULAR STUDY OF GENE *TP53* AND IMMUNOHISTOCHEMICAL EXPRESSION OF p53 PROTEIN IN THE PROGNOSTIC CHARACTERISTICS OF PATIENTS WITH LOW-RISK MYELODYSPLASTIC SYNDROME

The Myelodysplastic Syndrome (MDS) comprises a heterogeneous group of clonal diseases with complex pathogenesis, involving several phases and factors. *TP53* gene mutations have been involved in progenitor cell homeostasis alterations with an impact on relevant functions in the development of neoplasms, such as genomic integrity maintenance, cell cycle regulation, apoptosis and inflammatory response. The aim of the study was to investigate the impact of the p53 protein expression, *TP53* gene mutations and the R72P polymorphism on patients with low-risk MDS, associating them with clinical markers and prognostic scores and their applicability as an additional criterion to support hematopoietic stem cell transplantation (HSCT) indication. This is an analytical and prospective study involving 73 patients, of both genders, stratified as low risk, followed at the Outpatient Clinic of Walter Cantídio University Hospital (HUWC) from February 2012 to August 2016. The p53 protein expression was assessed by immunohistochemistry, whereas the mutations and the R72P polymorphism were analyzed by direct sequencing. The statistical analysis used the GraphPad Prism 5.0 software and the significance level was set at $p < 0.05$. Of the 73 patients who participated in the study, 20 (27.4%) were positive for the p53 protein expression. In the group with p53 expression, there was a significant reduction in hemoglobin and hematocrit levels, with increased frequency of fibrosis, hypercellularity and CD34 positivity in megakaryocytes. Of the 73 patients, 35 were screened for mutations in the *TP53* gene and R72P polymorphism. Two mutations were identified in the study population, with a frequency of 5.7%. A nonsense mutation was identified for the first time in MDS in a female patient and a missense mutation, not yet reported in the literature, in a male patient. As for the R72P polymorphism, there was a predominance of the G allele and the

GG genotype. All patients with "heterozygous" (CG) genotype were males. There was no association between mutations, polymorphism genotypes and clinical and prognostic parameters. During the study follow-up, two patients had indication for hematopoietic stem cell transplantation. One of them was positive for p53 in 40% of granulocytic precursors and died six months after the diagnosis. The second, who was negative for p53 expression and TP53 mutation, was submitted to HSCT and is in a stable condition. The results showed that p53 expression can influence clinical evolution and is associated with poor prognosis even in low-risk patients, reflecting the complexity of MDS and providing subsidies for further studies aiming to clarify the impact of the *TP53* gene and the protein expression on the disease origin, progression and its therapeutic management, including HSCT.

Key words: Myelodysplastic syndrome; TP53; R72P; Prognosis; Hematopoietic Stem Cell Transplantation

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	10
1.1. Síndrome Mielodisplásica (SMD)	10
1.2. Epidemiologia	11
1.3. Diagnóstico	12
1.4. Fisiopatologia da SMD	13
1.5. Mecanismo inflamatório na patogênese da SMD	15
1.6. Citogenética	17
1.7. Sistemas de classificação e estratificação de risco	18
1.7.1. Sistemas de classificação	18
1.7.2. Sistemas de estratificação de risco	25
1.8. Os Aspectos moleculares da SMD	28
1.9. O gene TP53 e seu papel na SMD	29
2. OBJETIVOS	34
2.1 Objetivo Geral	34
2.2 Objetivos Específicos	34
3. METODO	35
3.1. Aspectos éticos	35
3.2. Delineamento do estudo	35
3.3. Casuística	35
3.4. Critérios de seleção da amostra	36
3.4.1. Critérios de inclusão	36
3.4.2. Critérios de exclusão	36
3.5. Coleta de dados e de material biológico	37
3.6. Análise imunohistoquímica da proteína p53	37
3.7. Extração de DNA	38
3.8. Pesquisa de mutações no gene <i>TP53</i> e polimorfismo R72P	39
3.9. Análise estatística	39
4. RESULTADOS	41
4.1. Características da população estudada	41
4.2. Frequência da expressão da proteína p53 e a influência sobre os marcadores de prognóstico de pacientes com SMD de baixo risco	43
4.3. Influência da expressão de p53 sobre a sobrevivência livre de eventos	45
4.4. Avaliação do polimorfismo R72P em pacientes com SMD de baixo risco	47
4.5. Pesquisa de mutações no gene <i>TP53</i> e impacto na evolução clínica	49
4.6 Casos Clínicos	51
5. DISCUSSÃO	55
6. CONCLUSÃO	65
7. REFERÊNCIAS	66

APÊNDICES

ANEXOS

1. INTRODUÇÃO

1.1 Síndrome Mielodisplásica

A síndrome mielodisplásica (SMD) constitui um grupo de doenças hematológicas clonais das células progenitoras hematopoiéticas caracterizada por apresentar uma hematopoese ineficaz, citopenias, displasias em uma ou mais linhagens e um risco de evolução para leucemia mielóide aguda (LMA) (BRUNNING *et al.*, 2008). Segundo dados da literatura aproximadamente 30,0% dos pacientes com SMD evoluem para LMA (RIBEIRO, 2005; RIBIZZI; DARNOWSKI; GOULETT, 2001).

Os principais achados hematológicos na SMD são displasias, citopenias e assincronismo maturativo. Além disso, alterações como: presença de sideroblastos em anel, fragmentação nuclear dos eritroblastos, bastonetes gigantes, granulócitos hipersegmentados e anomalia pseudo Pelger-Huët, que também podem ser encontradas (RIBEIRO, 2005).

Na SMD, os sinais e sintomas clínicos comumente encontrados são fadiga, palidez, fraqueza e dispneia. Além disso, podem-se observar quadros de infecções, púrpura e complicações hemorrágicas, que são inespecíficos e variáveis, pois são consequência do funcionamento inadequado da linhagem hematológica afetada. Alguns pacientes apresentam eventos sistêmicos ou alterações de autoimunidade, que talvez possam estar envolvidos na patogênese da doença (MALCOVATI *et al.*, 2013; NIMER, 2008).

A SMD pode apresentar etiologia variada e desconhecida, podendo ser classificada como doença primária (*de novo*) ou secundária, decorrente de exposição prévia à quimioterapia, radiação e ao transplante autólogo de MO (BORTOLHEIRO, 2006). A SMD primária não é desencadeada por um evento mutagênico exógeno conhecido; no entanto, há um consenso de que fatores hereditários, exposição ocupacional e/ou ambiental e senescência do processo de hematopoese influenciem no seu desenvolvimento (LORAND-METZE *et al.*, 2004). A SMD secundária ocorre após um evento mutagênico exógeno e apresenta prognóstico reservado, com rápida progressão e curta sobrevida (CANIZO, *et al.*, 2000; KETTERLING, *et al.*, 2002; MISGELD *et al.*, 2001).

1.2 Epidemiologia

A SMD é a neoplasia hematológica mais comum em idosos com mais de 70 anos de idade (HAMBLIN, 2009). A incidência anual da SMD nos Estados Unidos, onde existe o maior número de estudos epidemiológicos é de 3,4 casos para cada 100.000 habitantes, representando mais de 10.000 novos diagnósticos e cerca de 60.000 indivíduos portadores da doença (SEKERES *et al.*, 2010). O aumento da incidência da doença pode ter relação com um maior conhecimento de sua patogenia, melhores métodos diagnósticos e o avanço da idade da população mundial. As estimativas são de que esse número aumente ainda mais, uma vez que os dados mostram que a população com idade superior a 65 anos duplique até o ano de 2030 (BARZI; SEKERES, 2010; SEKERES, 2010).

Entretanto a incidência dessa doença pode variar de acordo com idade, sexo e raça (MA *et al.*, 2007). A incidência da doença chega a 20 casos para cada 100.000 habitantes quando se leva em consideração apenas a população com mais de 70 anos de idade. Dessa forma, a SMD é considerada uma doença de idosos com média de idade 70 anos. Nos países asiáticos a SMD ocorre em indivíduos mais jovens com média de idade de 53 anos (KOMROKJI, 2006; MATSUDA *et al.*, 2005).

Em relação ao sexo, os estudos mostram uma taxa de incidência maior no sexo masculino (NEUKIRCHEN *et al.*, 2011). Ma (2012) mostrou nos EUA uma incidência de 4,5 para cada 100.000 habitantes do sexo masculino e 2,7 para cada 100.000 habitantes do sexo feminino. Quanto à raça, os dados apontam para uma maior taxa de incidência em indivíduos caucasianos (HAMBLIN, 2009).

No Brasil, mesmo com a importância que deve ser dada as doenças com maior incidência nos idosos, devido ao aumento da expectativa de vida do brasileiro como apontam os dados do último censo, realizado pelo Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), ainda são escassos os dados epidemiológicos sobre essa doença. No entanto, um estudo multicêntrico avaliou 1080 pacientes com SMD *de novo*, envolvendo centros da Argentina (n=635), Brasil (n=345) e Chile (n=100). O estudo determinou uma mediana de idade de 68 anos, com discreto predomínio do sexo masculino nos pacientes brasileiros (BELLI *et al.*, 2015).

1.3. Diagnóstico

O diagnóstico de SMD é um dos mais complexos dentro do grupo de neoplasias mielóides, uma vez que os sinais e sintomas são inespecíficos. Desta forma, o diagnóstico das SMD deve levar em consideração os achados clínicos e laboratoriais (hematológicos, citológicos, histológicos, bioquímicos e genéticos) (MALCOVATI *et al.*, 2013; NIERO-MELO *et al.*, 2006).

Malcovati e colaboradores (2013) sugerem que os critérios diagnósticos para SMD tem o objetivo inicial de excluir outras causas de citopenia e displasia, bem como outras doenças clonais da célula-tronco hematopoiética. Sendo assim, a abordagem para SMD deve iniciar com a exclusão de causas não malignas de citopenias e, após a realização do protocolo de exclusão, faz-se necessário o estudo morfológico para avaliar a presença de displasia celular e número de blastos na medula óssea, bem como a biópsia óssea e o cariótipo. Ao diagnóstico podem ocorrer situações onde os achados clínicos e laboratoriais são sugestivos de SMD, mas os achados morfológicos não são conclusivos (BEJAR; STEENSMA, 2014; VARDIMAN *et al.*, 2009).

O diagnóstico diferencial da SMD também deve ser realizado com outras patologias que cursam com citopenias sem a presença dos critérios morfológicos considerados para o diagnóstico da SMD, tais como o “clonal hematopoiesis of indeterminate potential” CHIP (MALCOVATI ;CAZZOLA, 2015); o “idiopathic cytopenia of uncertain significance” ICUS (SANTOS; GONÇALVES; DUARTE, 2013; SCHROEDER *et al.*, 2010), o “idiopathic dysplasia of uncertain significance” IDUS (VALENT *et al.*, 2012) e a síndrome de anemia do idoso (VALENT *et al.*, 2012).

1.4. Fisiopatologia da SMD

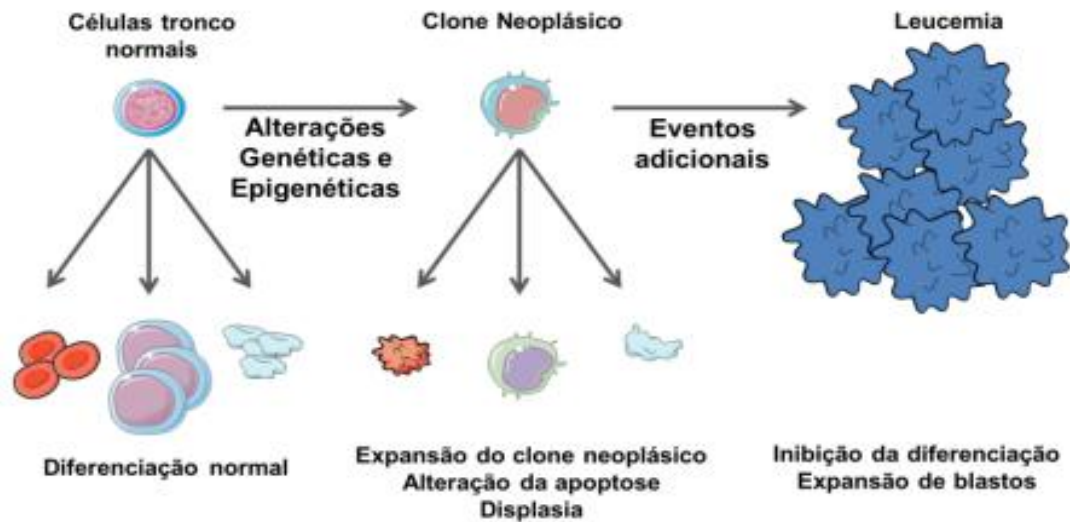
A fisiopatologia da SMD é complexa e ainda não foi totalmente elucidada; no entanto, sabe-se que os principais fatores que contribuem para a ocorrência da doença são as mutações que alteram a sequência de nucleotídeos dos genes e as anormalidades epigenéticas. A maioria dos pacientes possui mutações que alteram a sequência e função de oncogenes ou genes supressores de tumores e alterações epigenéticas, que resultam em expressão gênica anormal (BEJAR; EBERT, 2010; BEJAR; LEVINE; EBERT, 2011).

Os estágios associados à patogênese das SMD são:

1. Capacidade de autorrenovação em uma célula progenitora;
2. Aumento da capacidade de proliferação no clone transformado;
3. Bloqueio ou diminuição da diferenciação celular;
4. Instabilidade genômica;
5. Mecanismos antiapoptóticos ativados na célula transformada;
6. Evasão do sistema imune;
7. Supressão da hematopoese normal.

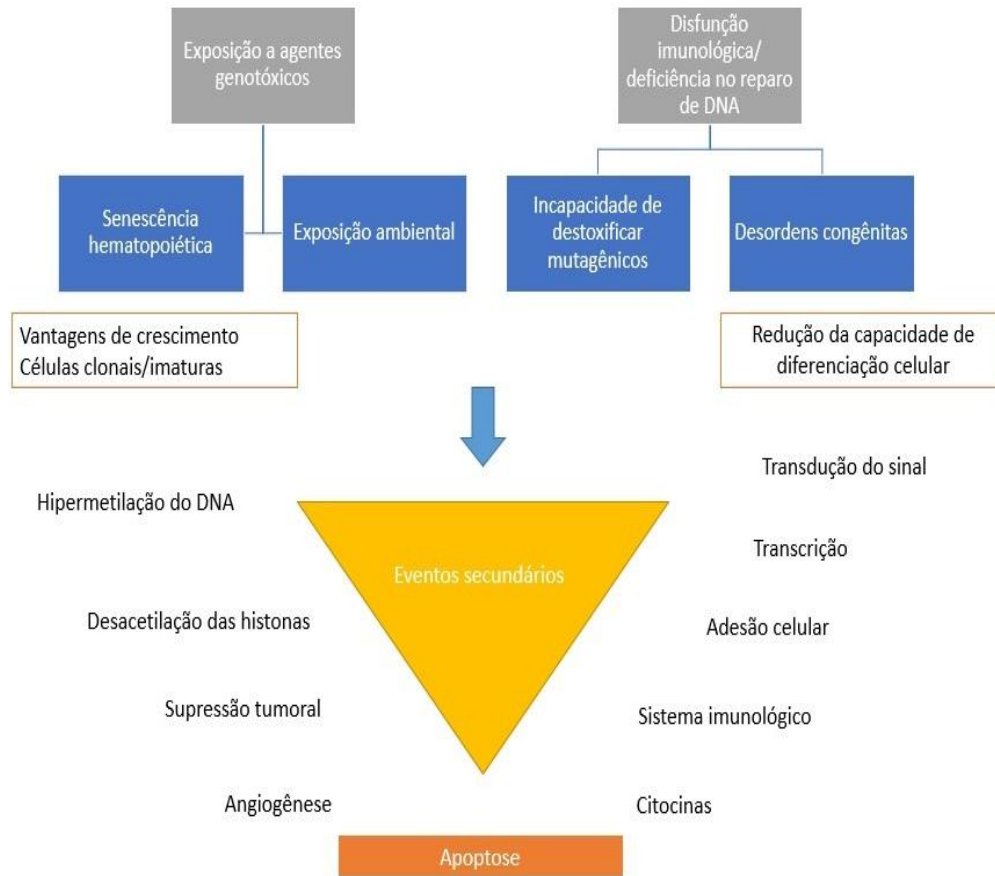
Um microambiente anormal na medula óssea pode favorecer o aparecimento do clone neoplásico e a expansão clonal adicional pode surgir do aumento da proliferação ou da resistência à apoptose. A maneira como cada processo celular é afetado pode determinar a manifestação clínica da doença, incluindo diferentes graus de citopenias, riscos de evolução para LMA e sobrevida global (ZEIDMAN; DAYAN; MITTELMA, 1995) (Figura 1).

Figura 1. Modelo de desenvolvimento e progressão das síndromes mielodisplásicas (SMD). (adaptado de ISSA, 2013).



As mutações conferem vantagem seletiva a subclones de células, permitindo seu crescimento e eventual domínio em um ambiente tecidual local. Assim, a progressão da SMD resulta de uma sucessão de expansões clonais, desencadeadas pela aquisição ou ativação de um genótipo mutante. A inativação de genes supressores tumorais pode ocorrer através de alterações na sequência de nucleotídeos ou através de mecanismos epigenéticos como metilação do DNA e modificações de histonas, que não alteram nucleotídeos, mas afetam a regulação da expressão gênica. Danos no reparo do DNA podem ser decorrentes da exposição a agentes mutagênicos, com consequente aumento da susceptibilidade às mutações conforme ilustrado na figura 2 (HANAHAN; WEINBERG, 2000; HANAHAN; WEINBERG, 2011).

Figura 2. Eventos secundários relacionados com a progressão da SMD.



1.5. Mecanismo inflamatório na patogênese da SMD

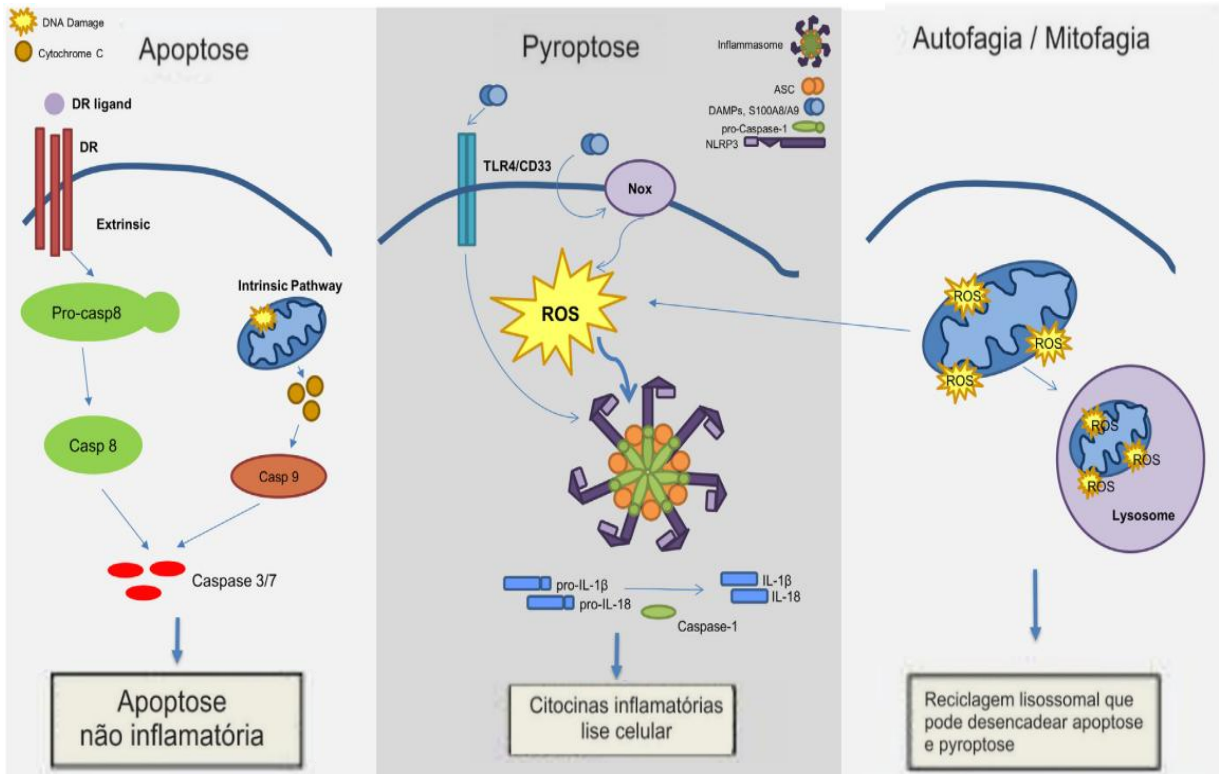
A patogênese da SMD é complexa com relatos na literatura de envolvimento de vários mecanismos dentre eles o genético, epigenético e imunomediadores. O mecanismo inicial envolve danos genéticos das células tronco hematopoiéticas, com um desenvolvimento de um clone mielodisplásico, que é caracterizado por apresentar vantagem proliferativa e excesso de apoptose (MORAES *et al.*, 2009). Os mecanismos patogênicos subjacentes que impulsionam um fenótipo clínico comum a partir de um conjunto diversificado de anormalidades genéticas têm recentemente sido reportado. Evidências acumuladas destacou o papel integral do sistema imune inato em citocinas inflamatórias através da ativação de NF- κ B na patogênese da doença (LOUNNAS *et al.*, 2009).

O NF- κ B é uma proteína reguladora envolvida no controle de vários mecanismos celulares pela regulação da expressão genica, de enzimas e citocinas, gerando, crescimento e apoptose (LOUNNAS *et al.*, 2009).

Mecanismos de morte celular envolvidos na patogênese da síndrome mielodisplásica: tanto a Apoptose, como a piroptose e autofagia contribuem para a morte celular nas síndromes mielodisplásicas. A apoptose, um tipo de morte celular que não induz a inflamação, pode se iniciar através de vias extrínsecas e intrínsecas, ambas ativam caspases e levam a formação de corpos apoptóticos. (SALLMAN *et al.*, 2016).

O tipo de morte celular denominado de Piroptose é um mecanismo de morte celular que cursa com inflamação, e é iniciado por padrões moleculares associados ao dano celular, particularmente S100A8/S100A9, iniciados pela produção de espécies reativas de oxigênio e a ativação de inflamossomas; tais eventos resultam na produção de citocinas pró-inflamatórias tais como a IL- 1β e IL-18, além da ativação da caspase 1, acarretando lise celular. Por fim se tem a via mitofágica ou autofágica, caracterizada pela degradação seletiva da mitocôndria através de vesículas lisossomais e um mecanismo autofágico, iniciado pela produção de espécies reativas de oxigênio, podendo induzir, também, as vias da apoptose e da piroptose (Figura 3)(SALLMAN *et al.*, 2016).

Figura 3. Mecanismos de morte celular envolvidos na patogênese das síndromes mielodisplásicas (SMD).



Fonte: SALLMAN *et al.*, 2016

1.6. Citogenética

A análise citogenética desempenha um papel importante na determinação da clonalidade em pacientes com suspeita de SMD. A realização do cariótipo é uma ferramenta que contribui para o diagnóstico, prevenção e monitoramento da evolução para LMA e sobrevida global, e mais recentemente na tomada de decisão em relação ao tratamento a ser utilizado. As alterações cromossômicas são observadas em 30% a 50% dos casos de SMD primária, ao diagnóstico, e entre 80% e 90% das secundárias (CHAUFFAILLE, 2006; NIERO-MELO *et al.*, 2006).

Em mais de 50% dos casos de SMD são observadas alterações cromossômicas. As alterações mais frequentes são as monossomias e as deleções

dos cromossomos 5 (-5 /del5q) e 7 (-7 /del7q) (CHAUFFAILLE, 2011). A SMD associada com del(5q) ocorre primariamente no sexo feminino e é caracterizada por megacariócitos hipolobulados, anemia refratária do tipo macrocítica, contagem de plaquetas normal ou aumentada e curso clínico favorável (BRUNNING *et al.*, 2008).

Na SMD de baixo risco, geralmente as alterações citogenéticas são isoladas, enquanto que nas SMD de alto risco são associadas. A trissomia do cromossomo 8 é a alteração numérica mais comum e não está associada a nenhum subtipo especificamente. Outra alteração comum é a nulissomia do Y que ocorre em aproximadamente 10% dos idosos que pode representar um clone maligno ou um fenômeno senescente na medula óssea (CHAUFFAILLE, 2011).

Os cariótipos complexos são observados em cerca de 20% dos doentes com SMD primária e em mais de 90% dos pacientes com SMD secundária (OLNEY; LE BEAU, 2002). De acordo com critérios internacionais, as anomalias cromossômicas complexas nas SMD definem-se pela ocorrência simultânea de 3 ou mais anomalias independentes. Estas resultam de um processo de acumulação sequencial de anomalias, designado por evolução do cariótipo (HAASE, 2008).

1.7. Sistemas de Classificação e Estratificação de Risco

1.7.1. Sistemas de Classificação

A classificação inicial da SMD foi realizada em 1976 pelo grupo Franco-Americano-Britânico (FAB), baseada em parâmetros morfológicos observados no sangue periférico e na medula óssea. A classificação FAB foi revisada em 1982 e utilizada por anos como guia para melhor compreensão desse heterogêneo grupo de doenças. Foram definidas cinco entidades: anemia refratária (AR), anemia refratária com sideroblastos em anel (ARSA), anemia refratária com excesso de blastos (AREB), anemia refratária com excesso de blastos em transformação (AREB-T) e Leucemia mielomonocítica crônica (LMMC). Nesta classificação dois grupos de risco podiam ser facilmente observados: grupo de baixo risco (AR e ARSA) e o grupo de alto risco (AREB e AREB-t) com média de sobrevida variando entre 05 e 06 anos para baixo risco e menos de um ano para o alto risco (Tabela 1) (BENNETT *et al.*, 1982).

Tabela 1. Classificação Franco-Americana-Britânica da SMD (1976)

Tipo	Sangue Periférico	Medula óssea
Anemia Refratária (AR)	Blastos $\leq 1\%$	Blastos $\leq 5\%$
Anemia Refratária com sideroblastos em anel (ARSA)	Blastos $\leq 1\%$	Blastos $\leq 5\%$ Sideroblastos em anel $> 15\%$
Anemia Refratária com excesso de blastos (AREB)	Blastos $< 5\%$	Blastos $> 5\%$ e $< 20\%$
Leucemia mielomonocítica crônica (LMMC)	Blastos $< 5\%$ Monócitos $> 1000/\text{mm}^3$	Blastos $< 20\%$
Anemia Refratária com excesso de blastos em transformação (AREB-T)	Blastos $\geq 5\%$	Blastos entre $> 20\%$ e $< 30\%$ ou com bastonete de Auer

Fonte: Adaptado de BORTOLHEIRO, 2006

Apesar de muito importante, este sistema de classificação apresentava diversas limitações, tais como: variabilidade clínica dentro de um mesmo grupo e os achados citogenéticos e a presença de displasia em uma única linhagem ou displasias em multilinhagens não foram considerados como impactantes na evolução clínica (KOMROKJI; ZHANG; BENNETT, 2010).

Levando em consideração esse contexto, em 2001, a Organização Mundial da Saúde (OMS) publicou uma nova classificação, com modificações significativas nos diversos subgrupos da FAB, com o intuito de agrupar melhor subtipos com comportamento clínico semelhante (BORTOLHEIRO, 2006). Em 2008, foi feita uma nova revisão dos critérios para classificação da SMD pela OMS, na tentativa de reduzir os doentes inclassificáveis e tornar as categorias mais precisas. A principal modificação realizada foi a definição de três categorias de Citopenia Refratária com Displasia Unilinhagem (CRDU): Anemia Refratária (AR), Neutropenia Refratária (NR) e Trombocitopenia Refratária (TR); e as Citopenias Refratárias com Displasia Multilinhagem com ou sem Sideroblastos em Anel (JÄDERSTEN; HELLSTRÖM-LINDBERG, 2009) (Tabela 2).

Tabela 2. Classificação da Organização Mundial da Saúde da SMD (2008)

Classificação OMS 2008		
Subgrupo	Medula Óssea	Sangue Periférico
Citopenias refratárias com displasia de única linhagem (CRDU): - Anemia Refratária (AR) - Neutropenia Refratária (NR) - Trombocitopenia refratária	Displasia >10% das células, <5% de blastos <15% de sideroblastos em anel	Citopenia única ou bicitopenia ^a Blastos ausentes ou raros (<1%) ^b
Anemia Refratária com Sideroblastos em Anel (ARSA)	Displasia em ≥10% das células eritróides <5% de blastos Ausência de bastonetes de Auer 15% de sideroblastos em anel	Anemia
Citopenia Refratária com displasia de múltiplas linhagens (CRDM)	Displasia em ≥10% das células em duas ou mais linhagens mielóides <5% de blastos Ausência de bastonetes de Auer Com ou sem sideroblastos em anel	Citopenia (s) Blastos ausentes ou raros (<1%) ^b , sem bastão de Auer, Monócitos < 1.000/mm
Anemia Refratária com excesso de blastos-1 (AREB-1)	Displasia de única ou múltiplas linhagens 5 a 9% de blastos ^b Ausência de Bastonetes de Auer	Citopenia (s) <5% de blastos ^b Ausência de Bastonetes de Auer Monócitos <1.000/mm ³
Anemia Refratária com excesso de blastos-2 (AREB-2)	Displasia de única ou múltiplas linhagens 10 a 19% de blastos Bastonetes de Auer presentes ou não ^c	Citopenia (s) 5 a 19% de blastos Bastonetes de Auer presentes ou não ^c <1x10 ⁹ /L de monócitos
Síndrome Mielodisplásica - não classificável (SMD-NC)	Displasias em <10% das células em uma ou mais linhagem mielóide quando acompanhada de anormalidades citogenéticas presuntivas de SMD ^d <5% de blastos	Citopenias ≤ 1% de blastos ^b
Síndrome mielodisplásica associada com del(5q) isolada	Normo ou hiperplasia megacariocítica núcleo hipolobulado <5% de blastos Anormalidades citogenéticas: del(5q) isolada Sem Auer	Anemia Contagem de plaquetas normal ou elevada Blastos ausentes ou raros (<1%)

Fonte: Adaptado de STEENSMA et al., 2015.

A classificação da OMS foi revisada recentemente, em 2015, e passou a considerar a importância de mutações genéticas para o melhor estabelecimento do diagnóstico e da classificação da SMD (ARBER; HARSSEJIAN, 2015) (Tabela 3).

Tabela 3. Classificação da SMD de acordo com a Organização Mundial de Saúde 2016.

CLASSIFICAÇÃO OMS 2016					
Subgrupo	Linha-gem com displasia	Citopenia	% de Sideroblasto em anel na MO	% Blastos na MO e SP	Citogenética
SMD com displasia em única linhagem	1	1 ou 2	<15% <5% [†]	MO <5% SP <1%	Qualquer alteração desde que não associada a SMD com del(5q) isolada
SMD com displasia em múltiplas linhagens	2 ou 3	1-3	<15% <5% [†]	MO <5% SO <1%	Qualquer alteração desde que não associada a SMD com del(5q) isolada
SMD com sideroblastos em anel (SA)					
SMD-SA com displasia em única linhagem	1	1 ou 2	≥15% ≥5% [†]	MO <5% SP <1%	Qualquer alteração desde que não associada a SMD com del(5q) isolada
SMD-SA com displasia em múltiplas linhagens	2 ou 3	1-3	≥15%/≥5% [†]	MO <5% SP <1%	Qualquer alteração desde que não associada a SMD com del(5q) isolada
SMD com del(5q) isolada	1-3	1-2	Nenhuma ou qualquer anormalidade	MO <5% SP <1%	del(5q) isolada ou com 1 anormalidade adicional, exceto -7 ou del(7q)
SMD com excesso de blastos					
SMD com excesso de blastos -1	0-3	1-3	Nenhuma ou qualquer anormalidade	MO 5%-9% SP 2%-4%	Qualquer anormalidade
SMD com excesso de blastos -2	0-3	1-3	Nenhuma ou qualquer anormalidade	MO 10%-19% SPB 5%-19%	Qualquer anormalidade
SMD inclassificável					
Com 1% de blastos	1-3	1-3	Nenhuma ou qualquer anormalidade	MO <5% SP = 1%, [‡]	Qualquer anormalidade
Com displasia em única linhagem e citopenia	1	3	Nenhuma ou qualquer anormalidade	MO <5% SP <1%	Qualquer anormalidade
Baseada na definição da anormalidade citogenética	0	1-3	<15% [§]	MO <5% SP <1%	Anormalidade que define o subtipo de SMD
Citopenia refratária da infância	1-3	1-3	Nenhuma	MO <5% SP <2%	Qualquer anormalidade

* Citopenias, definidas como: hemoglobina, <10 g / dL, contagem de plaquetas, <100 × 10⁹ / L e contagem absoluta de neutrófilos <1,8 × 10⁹ / L. Raramente, a SMD pode apresentar anemia leve ou trombocitopenia acima destes níveis. A contagem absoluta de monócitos no SP deve ser <1 × 10⁹ / L.
[†] Se a mutação *SF3B1* estiver presente.

‡ Um por cento de blastos no SP deve ser registrado em, pelo menos, duas ocasiões distintas.

§ Casos com $\geq 15\%$ sideroblastos em anel, por definição, têm significativa displasia eritróide, e são classificados como SMD-SA-Displasia em uma 'única linhagem.

Ausência de bastonete de Auer em todos subgrupos

MO= Medula Óssea

SP= Sangue Periférico

Fonte: ARBER; HARSSEJIAN, 2015.

1.7.2. Sistemas de estratificação de risco

Os sistemas de estratificação de risco assumem papel fundamental na SMD, sendo decisivo na escolha da melhor opção terapêutica. O sistema de modelo prognóstico desenvolvido por Greenberg e colaboradores (1997) é o sistema mais utilizado e denomina-se Sistema Internacional de Escore Prognóstico (IPSS). Esse sistema baseia-se na percentagem de blastos na medula óssea, no número de citopenias e no cariótipo. De acordo com o IPSS, os pacientes com SMD podem ser estratificados em grupos de comportamento evolutivos distintos: baixo risco (bom prognóstico); risco intermediário-1 e risco intermediário-2 (prognóstico intermediário); e alto risco (prognóstico desfavorável) (Tabela 4) (TEFFERI; VARDIMAN, 2009).

Tabela 4. Sistema Internacional de Escore Prognóstico (IPSS) para SMD.

Escore				
Variáveis de prognóstico	0,0	0,5	1,0	1,5
Número de citopenias ^I	0-1	1-2	-	-
Cariótipo ^{II}	Bom	Intermediário	Mau	-
Porcentagem de blastos na M.O.	<5	5-10	-	11-20
Escore total	Grupo de risco	Média de sobrevida (anos)		
0,0	Baixo	5,7		
0,5-1,0	Intermediário 1	3,5		
1,5-2,0	Intermediário 2	1,2		
≥2,5	Alto	0,4		

^I Citopenias: nível de hemoglobina <10,0g/dL, contagens de plaquetas <100.000/mm³ e contagens absolutas de neutrófilos < 1.800/mm³.

^{II} Cariótipo: bom (normal, anomalias isoladas: -Y, 5q-, 20q-); mau (complexo ou anomalias no cromossomo 7 associadas a outras alterações); intermediário (outras anomalias).

Fonte: adaptado de JÄDERSTEN; HELLSTRÖM-LINDBERG, 2009.

Posteriormente o IPSS foi revisado com o propósito de determinar o impacto de novos parâmetros com poder prognóstico; incorporar maiores subgrupos citogenéticos; reavaliar o seu impacto prognóstico; analisar a profundidade de citopenias; proporcionar uma melhor capacidade de estratificação prognóstica (GREENBERG *et al.*, 2012) (Tabela 5).

Tabela 5. Sistema Internacional de Escore Prognóstico (IPSS-R) para SMD.

Variável	0	0,5	1,0	1,5	2,0	3,0	4,0
Cariótipo*	Muito bom		Bom		Intermediário	Ruim	Muito ruim
Blastos (%)	≤ 2		> 2 a < 5			> 10	
Hb (g/dL)	≥ 10		8 a < 10	< 8			
Neutrófilos (cél/mm ³)	≥ 800	< 800					
Plaquetas (cél/mm ³)	≥ 100.000	50.000 a 100.000	< 50.000				

Classificação de risco	Pontuação	Sobrevida Média (anos)
Muito baixo	≤ 1,5	8,8
Bom	> 1,5 a 3,0	5,3
Intermediário	3,0 a 4,5	3,2
Alto	> 4,5 a 6	1,6
Muito alto	> 6 0	0,8

*

Muito bom:

del(11q), -Y;

Bom: Normal, del(20q), del(5q) isolada e dupla, del(12p);

Intermediário: +8, 7q-, i(17q), +19, +21, qualquer outra alteração isolada ou dupla, clones independentes;

Ruim: inv(3)/t(3q)/del(3q), -7, anormalidades duplas incluindo -7/del(7q), presença de 3 anormalidades;

Muito ruim: presença de > 3 anormalidades

Fonte: GREENBERG et al, 2012.

1.8. Aspectos moleculares da SMD

Para o desenvolvimento da SMD, pelo menos uma alteração molecular deve acontecer. As mutações iniciais nas células tronco podem causar bloqueio da diferenciação levando à displasia, enquanto defeitos subsequentes afetam a proliferação, causando expansão clonal das células aberrantes e progressão para LMA. Além disso, múltiplas alterações genéticas podem ser adicionadas levando à manifestação da doença, diferenciação displásica e hematopoese ineficaz (ABDEL-WAHAB; FIGUEROA, 2012; BEJAR *et al.*, 2011; BRUNNING *et al.*, 2008; RAZA; GALILI, 2008).

Diversos estudos identificaram nos últimos anos mutações somáticas de vários genes envolvidos na patogênese da SMD, proporcionando uma caracterização mais detalhada dos subtipos da doença e explorando novas oportunidades para o desenvolvimento de estratégias terapêuticas. Atualmente, as mutações somáticas podem ser agrupadas em diversas categorias distintas, com base no seu papel funcional específico. As mutações mais frequentemente verificadas detectadas em pacientes com SMD, incluem *splicing* de RNA (SF3B1, SRSF2, U2F1, ZRSR2), metilação do DNA (TET2, DNMT3A, IDH1 / IDH2), modificação da cromatina (ASXL1, EZH2), regulação da transcrição (RUNX1, BCOR) e controle de reparo de DNA, tais como p53 (HARFERLACH *et al.*, 2014; KULASEKARARAJ, *et al.*, 2013b).

Apesar da baixa frequência de mutação, algumas mutações têm se mostrado como valor de prognóstico independente, como a mutação SF3B1 e o aparecimento de sideroblastos em anel; a ocorrência de TET2, que promove melhor resposta ao tratamento com de 5-azacitidina; a ocorrência de DNMT3A, que promove a redução da sobrevida global com rápida progressão para LMA, dentre outras (BEJAR; STEVENSON; CAUGHEY, 2014; VALENCIA *et al.*, 2014).

Em pacientes com estratificação de baixo risco, as mutações podem consistir um importante diferencial prognóstico na identificação de subgrupos com evolução distinta. Um trabalho realizado por Bejar e colaboradores (2012) verificou que as mutações EZH2, RUNX1, TP53 e ASXL1 associaram-se a características clínicas e a menor sobrevida de pacientes com SMD de baixo risco. Adicionalmente, outro estudo realizado pelo mesmo grupo, identificou a presença das mutações TP53, TET2 e DNMT3A como preditoras para diminuição da sobrevida de pacientes com

SMD após o transplante de células tronco-hematopoiéticas (BEJAR; STEVENSON; CAUGHEY, 2014).

As mutações no gene TP53 constituem 8 a 12 % das mutações descritas em pacientes com SMD e estão associadas com cariótipo complexo e menor sobrevida. A maioria ocorre no domínio que envolve os exons 5 a 8 e constituem mutações *missense* (BEJAR *et al*, 2012; KULASEKARARAJ *et al.*, 2013b).

1.9. O Gene TP53 e seu papel na SMD

O gene TP53 tem sido correlacionado com a patogênese do câncer, tendo em vista que suas mutações podem levar a uma desregulação do controle do ciclo celular, com proliferação exacerbada, danos nos mecanismos de reparo de DNA e consequente instabilidade genômica (YONISH-ROUACH, 1997).

O gene TP53 está localizado no braço curto do cromossomo 17, na região p13.1, e possui aproximadamente 20kb de tamanho. Apresenta seu produto de transcrição uma proteína de 53kDa, denominada proteína 53 (p53). Esta fosfoproteína nuclear funciona como fator de transcrição de sequência específica que está diretamente relacionado com a regulação do ciclo celular, indução da morte celular programada, reparo do DNA, senescência e metabolismo energético (BENSAAD; VOUSDEN, 2007; CHEUNG; VOUSDEN, 2010).

A forma inativa da proteína p53 se localiza no citoplasma em baixas concentrações. No entanto, quando as células são submetidas a situações que acarretam estresse, como exposição à radiação ionizante e à radiação UV, ocorre sinalização intracelular com consequente conversão do seu estado inativo em estado funcional, além da elevação de sua concentração no citoplasma (MILNER, 1997). A proteína p53 funciona como um regulador negativo do ciclo celular, controlando a progressão do ciclo da fase G1 para a S e ativa a transcrição de genes de reparo do DNA, impedindo desta forma a propagação do erro genético para as células filhas. No entanto, se o reparo do DNA não for efetuado de forma satisfatória, a proteína p53 dispara o mecanismo de morte celular programada, denominado apoptose (PROKOCIMER; ROTTER, 1994).

No início do ciclo mitótico, a proteína p53 ativa transcricionalmente o gene p21, induzindo a síntese da proteína 21 (p21), cuja função é inibir a ação das quinases dependentes de ciclina, fazendo com que as células parem na fase G1 do ciclo celular, até que se complete o reparo do DNA. Para tanto, a proteína p53 ativa o gene *Growth Arrest DNA Damage Inducible* (GADD-45), que atua corrigindo a lesão no DNA. Quando o reparo do DNA é finalizado, a proteína p53 é então degradada pela ação da proteína MDM-2, produto do gene *mouse double minute 2* (MDM-2) (MILNER, 1997; TARAPORE; FUKASAWA, 2000).

Nas células que apresentam o gene p53 mutado e inativação da proteína p53, não ocorre a parada do ciclo celular necessária para o reparo do DNA. Essas células, geneticamente instáveis, tendem a acumular mutações e rearranjos cromossômicos adicionais, levando a uma rápida proliferação de clones de células com DNA mutado e transformação neoplásica (ROTTER; PROKOCIMER, 1991; BARCINSKI, 2004).

A forma ativa da proteína p53 tem vida média muito curta (em torno de 6 minutos), devido a sua rápida degradação, o que torna extremamente difícil a sua detecção. Ao contrário, as formas mutadas ou inativas tendem a acumular-se no núcleo das células, podendo ser facilmente detectadas por métodos imunológicos como a imunohistoquímica (MILNER, 1997; ROTTER; PROKOCIMER, 1991).

Estudos relacionando mutações no gene TP53 com doenças onco-hematológicas, entre eles destacam-se o estudo de Kaneko e colaboradores (1995), que demonstraram uma elevada frequência (12%) de mutações do gene TP53 em pacientes com SMD, associando este achado com um pior prognóstico e com cariótipo complexo, corroborando assim o fato de que tanto a ativação de oncogenes como a inativação de supressores tumorais são requeridos no processo de oncogênese.

Estudo realizado por Kita-Sasai e colaboradores (2001) associou as mutações no gene TP53 com SMD de alto risco, com pior prognóstico e com resistência a terapia. Jäderstein e colaboradores (2011) demonstraram que pacientes com SMD de baixo risco com gene TP53 mutado apresentaram níveis elevados da proteína p53 e progrediram para LMA.

Níveis elevados da proteína p53 estão associados com mutações no gene TP53 e, conseqüentemente, à parada da regulação do ciclo celular, podendo favorecer a proliferação celular descontrolada e o surgimento de mutações adicionais, contribuindo para a progressão da doença e para resistência ao tratamento. Assim, os níveis da proteína p53 podem ser utilizados como fator de prognóstico e como ferramenta auxiliar na escolha terapêutica em pacientes com SMD (KULASEKARARAJ et al., 2013a).

O gene *TP53* é um dos mais frequentemente mutados em neoplasias humanas, incluindo as neoplasias hematológicas. Cerca de 50-60% dos pacientes com neoplasias apresentam mutações nesse gene. A perda do *TP53*, por mutação ou deleção, compromete sua função, levando a uma instabilidade genômica, contribuindo para evolução clonal e progressão tumoral (CHAN et al., 2008). A mutação mais frequentemente observada no gene p53 é a substituição de um nucleotídeo, geralmente resultando em uma alteração *missense* (troca de aminoácidos) (KLEIN, 2016).

As mutações do *TP53* na SMD *de novo* ocorrem em 8-12% dos casos. Desse percentual, aproximadamente 30-50% correspondem àqueles com cariótipo complexo (BEJAR, 2011; KULASEKARARAJ et al., 2013b). Nos casos de deleção do 5q, a frequência é cerca de 15 a 20%. Na SMD relacionada à terapia, observa-se uma incidência superior, variando de 27-86% (IMAMURA; ABE; OGUMA, 2002; KULASEKARARAJ et al., 2013b).

A presença de mutações em p53 tem sido considerada um fator independente de mau prognóstico, estando relacionada a manifestações clínicas mais graves, trombocitopenia, aumento no número de blastos, resistência à lenalidomida, recidiva e pior sobrevida (GANGAT; PATNAIK, TEFFERI, 2016; MCGOWAN et al., 2015a). Os pacientes com deleção do 5q, isolada, ainda que classificados como baixo risco, na presença da mutação, demonstram maior risco de progressão da doença e recaída precoce, em tratamento com lenalidomida (JADERSTEIN et al., 2011). Diante desses achados, têm sido sugerido uma análise dessas mutações em todos os pacientes candidatos ao tratamento com o fármaco (MALCOVATI et al., 2013).

Nos pacientes de baixo risco com cariótipo normal, mutações no gene *TP53* têm sido associadas a um prognóstico desfavorável, baixa resposta ao tratamento e

sobrevida reduzida (BEJAR *et al.*, 2012; KULASEKARARAJ *et al.*, 2013a). O papel desse gene e da expressão da proteína nos pacientes de baixo risco, ainda não está elucidado, porém é sugerido que essas mutações ocorrem no início do curso da doença (JÄDERSTEN *et al.*, 2011; KULASEKARARAJ *et al.*, 2013a), apesar de ocorrer menos frequentemente em estágios mais avançados da doença (SAFT *et al.*, 2014).

Um dos polimorfismos no gene *TP53* relacionados ao desenvolvimento de neoplasias é o polimorfismo de nucleotídeo único (SNP) R72P, o qual decorre da substituição de um nucleotídeo citosina (C) para uma guanina (G), promovendo a alteração do aminoácido prolina para arginina. Os diferentes genótipos obtidos interferem no bloqueio do ciclo celular, reparo de DNA e ativação da apoptose, afetando conseqüentemente, o crescimento tumoral. Nas neoplasias hematológicas, não há um consenso sobre a influência desses polimorfismos nos aspectos clínicos ou na evolução da doença (BERGAMASHI *et al.*, 2004; MACHADO-NETO *et al.*, 2012; MCGRAW *et al.*, 2015b).

Dentre as estratégias terapêuticas disponíveis na SMD, somente o transplante alogênico é considerado curativo, e uma das ferramentas de definição da elegibilidade dos pacientes é a classificação de risco dos sistemas de escores prognósticos IPSS, IPSS-R e WPSS. Entretanto, esses sistemas apresentam limitações como a não especificidade para o transplante e a não incorporação de fatores relevantes na indicação do TCTH, como mutações de impacto conhecido na doença (OTROCK *et al.*, 2013).

O estudo das mutações TET2, DNMT3, TP53, JAK2, RUNX1, SF3B1, AF1, ASXL1 tem se mostrado relevante, identificando a relação entre o perfil genômico da neoplasia e as características fenotípicas e clínicas da doença, tendo, portanto, um valor prognóstico significativo (PAPAEMMANUIL *et al.*, 2013).

A presença da mutação do gene p53 pode ser encontrada em torno de 8 a 12% (JADERSTEIN *et al.*, 2011; BEJAR *et al.*, 2012; KULASEKARARAJ *et al.*, 2013b) de todas as SMD e está associada independentemente a mau prognóstico, mais frequentemente em pacientes com cariótipo complexo e deleção do 5q (15 a 20%), podendo predizer resistência à lenalidomida ou associada à recidiva (KITA-SASAI *et al.*, 2001). A proteína codificada pelo gene de supressão tumoral TP53, é um fator

chave na regulação do ciclo celular e na patogênese das neoplasias. Sua expressão aumentada está relacionada à presença de mutações em TP53 e ambas têm sido associadas a um prognóstico desfavorável e menor sobrevida (BEJAR *et al*, 2014). A análise por imunohistoquímica da proteína p53 tem sido considerada uma ferramenta útil e de fácil aplicabilidade, tendo sido observada em até 34,4% de pacientes com SMD de baixo risco (DUARTE *et al.*, 2014; SAFT *et al*, 2014). Além de correlacionar-se com a presença da mutação e indicar mau prognóstico e sobrevida reduzida (SAFT *et al*, 2014), a proteína p53 tem sido apontada como um parâmetro que pode auxiliar na indicação e no desfecho do TCTH (HONKANIEMI *et al.*, 2014).

Nesse contexto o presente estudo se propõe a investigar o impacto da expressão da proteína p53, as mutações no gene TP53 e o polimorfismo R72P em pacientes com SMD de baixo risco, associando-os aos marcadores clínicos e com escores prognósticos e a sua aplicabilidade como critério adicional para auxiliar a indicação do TCTH. Os possíveis resultados desse estudo poderão contribuir para a melhor compreensão da patogênese da SMD e ser de fato um recurso útil no contexto clínico, auxiliando de forma complementar com as características já presentes nos escores prognósticos, refinando-os e colaborando na decisão terapêutica.

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

Avaliar o impacto da expressão da proteína p53, mutações no gene TP53 e do polimorfismo R72P em pacientes com SMD de baixo risco associando-os aos marcadores clínicos e com escores prognósticos e a sua aplicabilidade como critério adicional para auxiliar a indicação do TCTH.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a frequência da expressão da proteína p53 em pacientes com SMD de baixo risco ao diagnóstico;
- Associar a expressão da proteína p53 com: sexo, idade, valores de hemoglobina, hematócrito, volume corpuscular médio, leucócitos, plaquetas, cariótipo, Sistema Internacional de Escore Prognóstico (IPSS), Sistema Internacional de Escore Prognóstico Revisado (IPSS-R), fibrose medular e marcação para CD34 em megacariócitos ao diagnóstico;
 - Determinar a curva de sobrevida livre de eventos nos pacientes em estudo;
 - Identificar a frequência e os tipos de mutações no gene *TP53*;
 - Determinar a frequência dos genótipos do polimorfismo R72P na população em estudo;
- Associar os dados da análise molecular com os parâmetros clínicos e fatores prognósticos;
- Descrever dois casos de SMD de baixo risco submetidos ao TCTH, avaliando o perfil da proteína p53 no desfecho dos pacientes.

3. MÉTODO

3.1. Aspectos éticos

O projeto que resultou no presente trabalho está em conformidade com as orientações constantes da Resolução 466/12 do Conselho Nacional de Saúde e com parecer favorável do Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Ceará, sob protocolo nº129/12. Todos os participantes assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) para participar do estudo.

3.2. Delineamento do estudo

Trata-se de um estudo analítico e prospectivo de avaliação do impacto da expressão da proteína p53, mutações no gene TP53 e do polimorfismo R72P em pacientes com SMD de baixo risco associando-os aos marcadores clínicos e com escores prognósticos e a sua aplicabilidade como critério adicional para auxiliar a indicação do TCTH.

3.3. Casuística

Do total de 73 amostras de pacientes com SMD de baixo risco avaliadas para a expressão da proteína p53, 35 foram selecionadas ao acaso para o estudo molecular e dois casos relatados fazem parte da casuística do presente estudo receberam indicação clínica para o TCTH. Os pacientes foram atendidos no ambulatório do Serviço de Hematologia do Hospital Universitário Walter Cantídio (HUWC), no período de fevereiro de 2012 a agosto de 2016.

O diagnóstico foi realizado de acordo com os critérios mínimos estabelecidos na Conferência sobre SMD realizada em Viena, em 2006 (VALENT *et al.*, 2008): citopenia periférica, constante e significativa (> 6 meses) em pelo menos uma linhagem hematopoiética, medula óssea com características morfológicas relacionadas com SMD (um ou mais das seguintes alterações em pelo menos uma linhagem hematopoiética: displasia $\geq 10\%$, sideroblastos $\geq 15\%$, ou mieloblastos $\geq 5\%$), ou cariótipo com alterações características de SMD. Além disso, todos os

outros distúrbios hematopoiéticos e não-hematopoiéticos devem ser descartados como a razão principal para a displasia e/ou citopenia.

A classificação dos pacientes com SMD foi realizada de acordo com a OMS (2016) (ARBER; HARSSEJIAN, 2015) e a estratificação de risco foi baseada no Sistema Internacional de Escore Prognóstico (IPSS) e no Revisado (IPSS-R) (GREENBERG *et al.*, 2012). Há o que se considerar que existe uma grande linha divisória que separa os pacientes em baixo risco e alto risco, que tem como referência principal o comportamento clínico e o tipo de terapêutica que deverá ser instituída. Quando classificamos um paciente como Intermediário 1 pelo IPSS, isto significa dizer que esse paciente deve ser conduzido como de baixo risco, por outro lado quando o classificamos como intermediário pelo IPSS-R poderemos ter nesse grupo tanto pacientes com comportamento de baixo ou alto risco, pois essa condição permite que segundo Greenberg e colaboradores (2012) possa estar incluído 73% de Intermediário 1, 19% de Intermediário 2, 7% de baixo risco e 1% de alto risco da classificação anterior do IPSS. No presente estudo todos os pacientes intermediários do IPSS-R se correlacionam com o intermediário 1 do IPSS, continuando portanto com sua estratificação de baixo risco.

3.4. Critérios de seleção da amostra

3.4.1. Critérios de inclusão

- Pacientes com diagnóstico confirmado de SMD *de novo*;
- Pacientes com estratificação de risco classificada pelo IPSS (baixa risco e intermediário 1) e pelo IPSS-R (muito baixo, baixo e intermediário).
- Pacientes que concordaram em participar do estudo, assinando o TCLE.

3.4.1. Critérios de exclusão

- Pacientes sem diagnóstico confirmado de SMD;
- Pacientes com diagnóstico de SMD secundária;
- Pacientes com estratificação de risco classificados pelo IPSS (Intermediário 2 ou alta risco) e pelo IPSS-R (alto risco e muito alto risco).
- Pacientes que não concordaram em participar do estudo.

3.5. Coleta de dados e de material biológico

Os dados como idade, sexo, hemograma, mielograma, coloração para ferro, biópsia de medula óssea e classificação e estratificação de risco ao diagnóstico foram coletados por análise de prontuários médicos.

A biópsia de medula óssea foi realizada por punção do osso pélvico para posterior realização dos cortes histológicos, para a realização da imunohistoquímica. Aproximadamente 4mL de aspirado medular foram coletados por punção do aspirado medular em anticoagulantes EDTA para a extração de DNA genômico e posterior realização das técnicas moleculares.

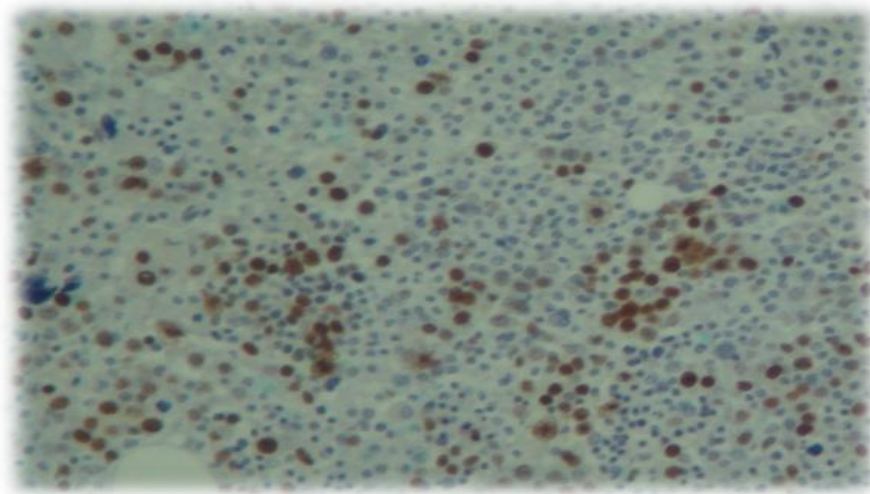
3.6. Análise imunohistoquímica da proteína p53

A análise imunohistoquímica da proteína p53 foi realizada de acordo com o procedimento descrito por Kitagawa e colaboradores (1994). Os cortes da biópsia de medula óssea de cada paciente foram descalcificados usando 10% de ácido nítrico e foram embebidos em parafina antes da análise imunohistoquímica. Em seguida, os cortes foram desparafinados, hidratados e lavados com solução salina tamponada (pH=7,0).

A recuperação antigênica foi então realizada utilizando um tampão de citrato 10 mM (pH 6,0) durante 30 minutos e os cortes foram subsequentemente bloqueados com dois ciclos de tratamento com uma solução de metanol contendo uma peroxidase endógena e 0,03% de peróxido de hidrogênio durante 5 minutos cada. Em seguida, os cortes foram incubados com um anticorpo monoclonal específico para p53 (DO-7 Clone; DAKO[®]) durante 12 h a 4°C e, após lavagem com solução salina tamponada, foram incubados durante 1 h com anticorpo IgG biotilado. Os cortes foram então incubados com o complexo ABC, que contém 5 uL de avidina e 5 mL de biotina em 5 mL de solução salina tamponada (DAKO[®]) durante 45 min. Para visualizar a reação, os cortes foram tratados com uma solução de 1 mg/mL de diaminobenzidina (DAKO[®]), seguido de contra-coloração com hematoxilina. As lâminas foram montadas em lamínulas com bálsamo do Canadá. Biópsia realizada em tecido de carcinoma mamário foi utilizado como controle positivo.

A expressão da proteína p53 foi definida como positiva para padrão forte de coloração nuclear em pelo menos 1% dos precursores granulocíticos analisados (SAFT *et al.*, 2014). A figura 4 apresenta o padrão de marcação nuclear considerado com forte para as análises do presente estudo.

Figura 4. Forte marcação para a proteína p53 ao diagnóstico em paciente com síndrome mielodisplásica de baixo risco.



Coloração: Avidina-biotina. Aumento: 400x.

Fonte: Própria.

3.7 Extração de DNA

O DNA foi isolado de leucócitos colhidos a partir de aspirado medular em tubos contendo o anticoagulante EDTA. Foram utilizados kits de extração da BIOPUR®. As amostras foram armazenadas a -20° C até o momento da análise.

3.8. Pesquisa de mutações no gene *TP53* e polimorfismo R72P

As pesquisas das mutações no gene *TP53* e do polimorfismo R72P foram realizadas no Laboratório de Biologia Molecular do Centro de Transplante de Medula Óssea (CEMO), do Instituto Nacional do Câncer (INCA), no Rio de Janeiro.

As mutações no gene *TP53* foram analisadas por sequenciamento Sanger. Quatro pares de *primers* foram utilizados para a cobertura completa dos *exons* 3 a 9: *exon* 3-4, 5-6, *exon* 7 e *exon* 8-9. O sequenciamento do *exon* 4 permitiu a pesquisa dos polimorfismos R72P. Os *primers* e as condições de amplificação estão apresentados no anexo I.

Os *éxons* foram amplificados por reação em cadeia da polimerase (PCR) a partir do 100 ng de DNA extraído. Os *primers* e as condições de amplificação do DNA seguiram o protocolo determinado pela Agência Internacional de Pesquisa do Câncer (IARC). Os produtos de PCR foram sequenciados no aparelho ABI PRISM® 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems).

Os dados foram analisados usando o software Mutation Surveyor (SoftGenetics). Todas as variantes encontradas foram comparadas com as bases de dados: Cosmic, dbSNP e 1000 genomes UniProtKB.

3.9 Análise estatística

A análise dos dados foi realizada utilizando o programa GraphPad Prism 5.0. Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão da média. O teste Kolmogorov-Smirnov foi utilizado para verificar a distribuição normal dos dados e as diferenças estatísticas entre os grupos foram observadas utilizando o teste t-Student ou Mann-Whitney, para variáveis quantitativas, e o teste qui-quadrado para as variáveis qualitativas. A curva de Kaplan-Meier foi realizada para verificar diferenças estatísticas entre os tempos de sobrevida livre de eventos (progressão para LMA ou óbito). A sobrevida livre de eventos foi definida como o intervalo de tempo entre a data do diagnóstico e a data do primeiro evento negativo (morte relacionada com a progressão da doença ou progressão para LMA). O nível de significância estabelecido foi de $p < 0,05$ para todas as análises.

4. RESULTADOS

4.1. Características da população estudada

Dos 73 pacientes que participaram do estudo, sendo 27 (36,9%) do sexo masculino e 46 (63,1%) do sexo feminino. A mediana de idade foi de 65 anos, variando de 30 a 92 anos.

Durante o estudo, nenhum paciente realizou tratamento quimioterápico, exceto dois que evoluíram para LMA. Estes pacientes durante a progressão da doença foram tratados com agentes hipometilantes (azacitidina) e/ou imunomoduladores (lenalidomida). Apenas um paciente foi tratado com azacitidina sem indícios de progressão da doença em decorrência de trombocitopenia isolada grave.

A tabela 6 apresenta os valores de hemoglobina, hematócrito, volume corpuscular médio (VCM), leucócitos e plaquetas ao diagnóstico dos pacientes em estudo.

Tabela 6. Parâmetros do hemograma ao diagnóstico dos pacientes em estudo (n=73).

Parâmetros	Média ± erro padrão da média	Mínimo	Máximo
Hemoglobina (g/dL)	10,92 ± 0,33	4,84	17,00
Hematócrito (%)	32,78 ± 0,98	14,40	50,80
VCM (fL)	90,37 ± 1,32	63,65	115,9
Leucócitos (/mm³)	4.362 ± 336,5	1.380	15.400
Plaquetas (/mm³)	168.667 ± 18.111	100.000	949.000

VCM: volume corpuscular médio

Tabela 7: Classificação dos pacientes com SMD em estudo, em relação a OMS 2016 (n=73)

Tipos	n (%)
SMD com displasia em única linhagem	33 (45,21)
SMD com displasia em múltiplas linhagens	30 (41,09)
SMD com sideroblastos em anel	
SMD-SA com displasia em única linhagem	4(5,48)
SMD-SA com displasia em múltiplas linhagens	1(1,37)
SMD com del(5q) isolada	2(2,74)
SMD inclassificável	
com displasia em única linhagem citopenia	3(4,11)

Os dados da tabela 7 demonstram que a maioria dos pacientes foram classificados como SMD com displasia em única linhagem 33 (45,21%) e SMD com displasia em múltiplas linhagens 30 (41,09%), ao diagnóstico de acordo com a classificação da OMS (2016).

4.2. Frequência da expressão da proteína p53 e a associação com os marcadores de prognósticos de pacientes com SMD de baixo risco.

Em relação à expressão imunohistoquímica da proteína p53, 20 (27,4%) dos pacientes apresentaram forte marcação em mais de 1% das células nucleadas da medula óssea, enquanto 53 (72,6%) não apresentaram marcação.

A tabela 8 apresenta a influência da expressão imunohistoquímica da proteína p53 sobre as características clínicas de pacientes com síndrome mielodisplásica de baixo risco. Os valores de hemoglobina e hematócrito foram significativamente inferiores nos pacientes com positividade para a expressão da p53 (9,74 g/dL e 29,3%, respectivamente) do que em pacientes sem a expressão da p53 (11,72 g/dL e 33,9%, respectivamente) ($p < 0,05$).

Um percentual de 45% dos pacientes com expressão de p53 apresentou fibrose medular nos níveis mais avançados (II / III) ao diagnóstico. Para o grupo sem expressão de p53, a frequência desse achado foi de 13,3%. Esta diferença foi estatisticamente significativa ($p = 0,002$). Em relação a celularidade da medula óssea, 60% dos pacientes com expressão de p53 apresentaram medula óssea hiperclular, ao diagnóstico, enquanto somente 18,9% dos pacientes sem expressão de p53 apresentaram essa característica ($p = 0,002$).

Outro achado foi a imunorreatividade para CD34 em megacariócitos. Um percentual de 40% dos pacientes com a expressão de p53 apresentou reatividade para CD34 em megacariócitos, enquanto que para pacientes sem expressão de p53, a frequência para este achado foi de 15,1% ($p=0,029$).

No presente estudo, a expressão da proteína p53 não apresentou associação com as variáveis idade ao diagnóstico, sexo, número de leucócitos e de plaquetas, volume corpuscular médio (VCM), cariótipo e número de blastos na medula óssea ($p > 0,05$).

Em relação à estratificação de risco dos pacientes em estudo, não houve associação entre a expressão de p53 e os critérios IPSS. No entanto, para a estratificação IPSS-revisado, observou-se que 16(30,2%) dos pacientes com expressão negativa do p53 foram classificados como muito baixo risco pelo IPSS-R e que somente um (5%) positivo para p53% ($p = 0,049$) estava incluído nesse grupo.

Tabela 8. Influência da expressão imunohistoquímica da proteína p53 sobre as características clínicas de pacientes com SMD de baixo risco (n= 73).

Parâmetros	Expressão de p53		Valor de p
	Positiva (n=20)	Negativa (n=53)	
Mediana de idade, anos (intervalo)	69 (51-92)	64,5 (30-89)	0,246
Sexo			
Masculino	8 (40%)	19 (35,8%)	0,787
Feminino	12 (60%)	34 (64,2%)	
Mediana de duração da SMD (meses)	22,33±15,32	32,52± 24,49	>0,05
Citogenética, n (%)			
Cariótipo Normal	17 (85%)	47 (88,7%)	0,698
Aberrações Cromossômicas*	3 (15%)	6 (11,3%)	
IPSS			
Baixo, n (%)	17 (85%)	47 (88,7%)	0,698
Intermediário, n (%)	3 (15%)	6 (11,3%)	
IPSS Revisado			
Muito baixo, n (%)	1 (5%)	16 (30,2%)	0,049
Baixo, n (%)	16 (80%)	34 (64,1%)	p>0,05
Intermediário-1, n (%)	3 (15%)	3 (5,7%)	p>0,05
Hemograma			
Hemoglobina (g/dL)	9,744 ± 0,602	11,72 ± 0,377	0,044
Hematócrito (%)	29,3 ± 1,70	33,9 ± 1,10	0,040
VCM (fL)	87,89 ± 1,78	91,2 ± 1,64	0,281
Leucócitos (x10 ⁹ /L)	3,61 ± 0,394	4,58 ± 0,416	0,227
Plaquetas (x10 ⁹ /L)	173,1 ± 29,3	167,3 ± 21,9	0,894
Blastos na Medula Óssea, %	1,5 ± 0,73	0,655 ± 0,19	0,113
Celularidade da Medula Óssea			
Hipocelular, n (%)	3 (15%)	13 (24,5%)	p>0,05
Normocelular, n (%)	5 (25%)	30 (56,6%)	p>0,05
Hipercelular, n (%)	12 (60%)	10 (18,9%)	0,002
Fibrose Medular			
Sem Fibrose, n (%)	7 (35%)	37 (69,8%)	p>0,05
Grau I, n (%)	4 (20%)	9 (16,9%)	0,008
Graus II/III, n (%)	9 (45%)	7 (13,3%)	
Imunorreatividade para CD34 em megacariócitos			
Positivo, n (%)	8 (40%)	8 (15,1%)	0,029
Negativo, n (%)	12 (60%)	45 (84,9%)	p>0,05

* As alterações cromossômicas detectadas em pacientes com expressão de p53 e sem expressão de p53 foram: del 5q e i17 e del 5q, iso (17), -y e mar, respectivamente.

VCM: volume corpuscular médio; IPSS: Sistema Internacional de Escore Prognóstico

IPSS-R: Sistema Internacional de Escore Prognóstico Revisado; Os resultados foram expressos em média \pm erro padrão da média.

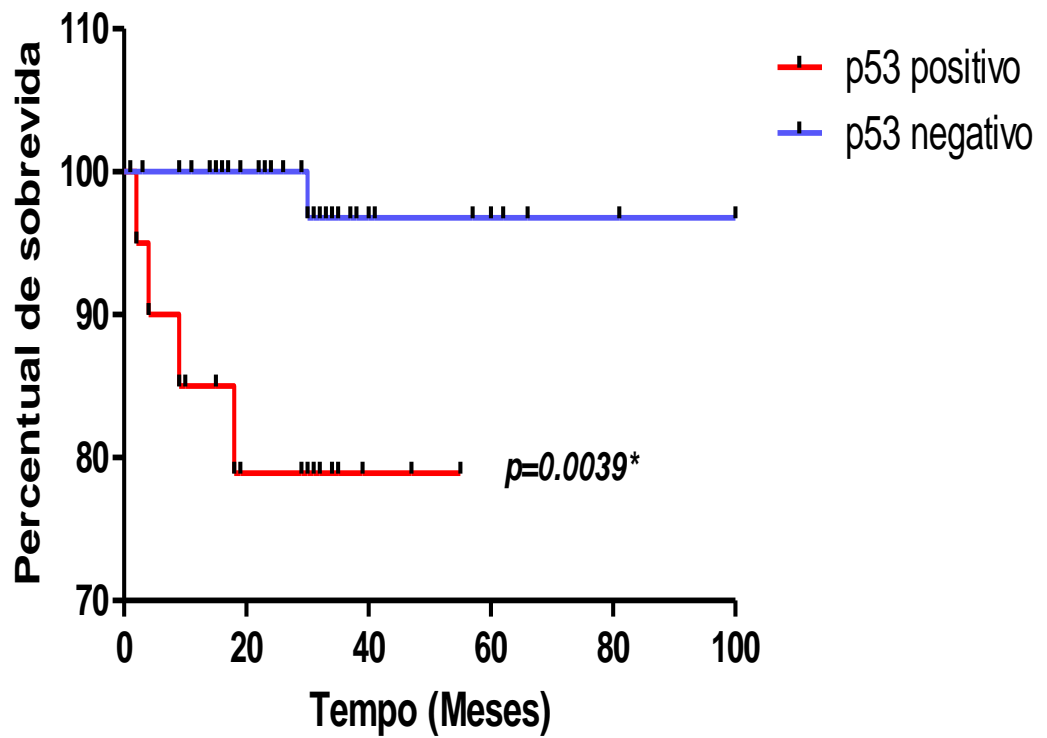
4.3. Influência da expressão de p53 sobre a sobrevida livre de eventos.

A análise de sobrevida livre de eventos combinados (óbito e progressão para LMA) demonstrou que os pacientes com expressão positiva para p53 apresentaram um tempo significativamente inferior de sobrevida livre de eventos quando comparados aos pacientes sem a expressão de p53 ($p=0,039$) (Figura 5). A mediana de seguimento foi de 31 meses, variando de 1 a 100 meses.

Dos 20 pacientes com expressão de p53, 4 (20%) evoluíram para óbito e um (5%) evoluiu para LMA. Destes, um paciente apresentou intensa marcação para p53 em 40% dos precursores granulocíticos e evoluiu para óbito seis meses após o diagnóstico. No grupo sem a expressão de p53, somente um (1,88%) paciente evoluiu para LMA, trinta meses após o diagnóstico.

Figura 5. Curva de sobrevida livre de eventos combinados (LMA ou óbito) para pacientes com síndrome mielodisplásica de baixo risco, de acordo com a expressão da proteína p53 (n=73).

Curva de sobrevida livre de eventos combinados (LMA ou óbito)



4.4. Avaliação do polimorfismo R72P em pacientes com SMD de baixo risco.

A tabela 9 apresenta as frequências genotípicas e alélicas para o polimorfismo R72P na população estudada. Em relação à frequência genotípica, houve maior prevalência do genótipo GG (54,3%) e menor prevalência do heterozigoto CG (14,3%). O alelo G (61,4%) foi mais frequente do que o alelo C (38,6%).

Tabela 9. Frequência genotípica e alélica nos pacientes em estudo (n=35).

	Número de pacientes (n)	Porcentagem (%)
<i>Frequência genotípica</i>		
CC	11	31,4
CG	5	14,3
GG	19	54,3
<i>Frequência alélica</i>		
C	27	38,6
G	43	61,4

A tabela 10 apresenta a influência do polimorfismo R72P sobre as características clínicas de pacientes com síndrome mielodisplásica de baixo risco. Não houve associação dos genótipos do polimorfismo R72P com as características clínicas de pacientes com SMD de baixo risco. Em relação ao gênero verificou-se que o grupo de heterozigotos (genótipo CG), todos os pacientes são do sexo masculino, enquanto nos grupos de homozigotos (genótipos CC e GG), houve predomínio do sexo feminino. Esta diferença foi estatisticamente significativa; no entanto, o pequeno tamanho da amostra do grupo heterozigoto deve ser considerado antes de qualquer inferência.

Tabela 10. Influência do polimorfismo R72P sobre as características clínicas de pacientes com síndrome mielodisplásica de baixo risco (n = 35).

Parameters	R72P polymorphism (n=35)			p value
	CC (n=11)	CG (n=5)	GG (n=19)	
Mediana de idade, anos (intervalo)	69 (34-82)	65 (45-88)	63 (44-77)	0,924
Sexo				
Masculino	4 (36,4%)	5 (100%)	7 (58,3%)	0,003*
Feminino	7 (63,6%)	0 (0%)	12 (41,7%)	
Mediana de duração da SMD meses	41,6 ± 8,28	58,2 ± 25,3	42,07 ± 8,56	0,651
Citogenética, n (%)				
Cariótipo Normal	10 (90,9%)	4 (80%)	16 (84,2%)	0,814
Aberrações Cromossômicas- del 5q (n=) i17 (n=); iso(17)-n=, -y(n=) e mar(n=),	1 (9,1%)	1 (20%)	3 (15,8%)	
IPSS				
Baixo, n (%)	9 (81,8%)	4 (80%)	13 (68,4%)	0,723
Intermediário, n (%)	2 (18,2%)	1 (20%)	6 (31,6%)	
IPSS Revisado				
Muito baixo, n (%)	10 (90,9%)	5 (100%)	16 (84,2%)	0,677
Baixo, n (%)	0 (0%)	0 (0%)	2 (10,5%)	
Intermediário-1, n (%)	1 (9,1%)	0 (0%)	1 (5,3%)	
Hemograma				
Hemoglobina (g/dL)	11,37 ± 0,76	12,98 ± 1,16	10,33 ± 0,66	0,167
Hematócrito (%)	34,11 ± 2,19	38,01 ± 3,88	31,34 ± 2,00	0,264
VCM (fL)	88,8 ± 2,69	97,18 ± 7,93	91,69 ± 2,92	0,450
Leucócitos (x10 ⁹ /L)	3,71 ± 0,381	0,349 ± 0,36	0,439 ± 0,773	0,700
Plaquetas (x10 ⁹ /L)	121,8 ± 24,3	136,9 ± 32,0	166,6 ± 16,6	0,689
Blastos na Medula Óssea, %	0,89 ± 0,39	0,30 ± 0,12	1,00 ± 0,39	0,613
Celularidade da Medula Óssea				
Hipocelular, n (%)	6 (54,5%)	1 (20%)	7 (36,8%)	0,583
Normocelular, n (%)	2 (18,2%)	1 (20%)	6 (%)	
Hiper celular, n (%)	3 (27,3%)	3 (60%)	6 (18,9%)	
Fibrose Medular				
Sem Fibrose, n (%)	9 (81,8%)	3 (60%)	13 (68,4%)	0,187
Grau I, n (%)	0 (0%)	2 (40%)	2 (10,5%)	
Graus II/III, n (%)	2 (18,2%)	0 (0%)	4 (21,1%)	
Imunorreatividade para CD34 em megacariócitos				
Positivo, n (%)	1 (27,3%)	0 (0%)	3 (15,8%)	0,625
Negativo, n (%)	8 (72,7%)	5 (100%)	16 (84,2%)	

* As alterações cromossômicas detectadas em pacientes com expressão de p53 e sem expressão de p53 foram: del 5q e i17 e del 5q, iso (17), -y e mar, respectivamente.

VCM: volume corpuscular médio

IPSS: Sistema Internacional de Escore Prognóstico

IPSS-R: Sistema Internacional de Escore Prognóstico Revisado

Os resultados foram expressos em média \pm erro padrão da média.

4.5 Pesquisa de mutações no gene *TP53* e impacto na evolução clínica

O sequenciamento dos exons 3 a 9 do gene *TP53* permitiu identificar na população estudada duas mutações: c.394A> T(pk132*) e c.783-1_784delGTG.

A mutação c.394A> T (pk132*) consiste na substituição do nucleotídeo A por T na posição 394 do gene, conduzindo à formação de um códon de parada prematuro, com formação de uma proteína não-funcional (pk132*). O paciente do sexo feminino em que essa mutação foi identificada, apresentou o padrão *wild-type* para o polimorfismo R72P. A segunda mutação consiste na deleção do códon GTG, localizado na posição 783 do gene (c.783-1_784delGTG), não havendo registros de sua ocorrência nas bases de dados analisadas. Não foi possível determinar o padrão polimórfico do R72P nesse caso.

Em relação ao impacto das mutações encontradas sobre a expressão imunohistoquímica de p53, foi possível observar que o paciente com a mutação c.394A> T(pk132*) não apresentou expressão de p53, enquanto que o paciente com a mutação c.783-1_784delGTG apresentou forte expressão de p53 em 2% dos precursores granulocíticos analisados. Adicionalmente, ao diagnóstico, ambos os pacientes apresentaram cariótipo normal, não apresentaram fibrose medular, não eram dependentes de transfusão e apresentaram evolução favorável durante o período do estudo, mantendo as mesmas características citadas. A tabela 11 apresenta as características clínicas ao diagnóstico dos pacientes com mutação no gene *TP53*.

Tabela 11. Características clínicas e laboratoriais ao diagnóstico de pacientes com mutação no gene *TP53* (n=2)

	Mutação	
	c.394A> T(pk132*)	c.783-1_784delGTG
Idade(anos)	79	82
Sexo	Feminino	Masculino
Hemograma		
Hemoglobina, g/dL	10,3	10,82
Hematócrito, %	30,0	33,0
VCM (fL)	88,08	92,5
Leucócitos (x10 ⁹ /L)	5,5	4,59
Plaquetas (x10 ⁹ /L)	208	113,2
Cariótipo	46,XX	46,XY
Blastos na medula óssea, %	0,5	2,2
Fibrose Medular	Ausência	Ausência
Celularidade da medulla óssea	Hipocelular	Hiper celular
Imunorreatividade para CD34	Positiva	Positiva
Imunohistoquímica para p53	Negativa	Positivo
Dependência transfusional	Não	Não

VCM: volume corpuscular médio

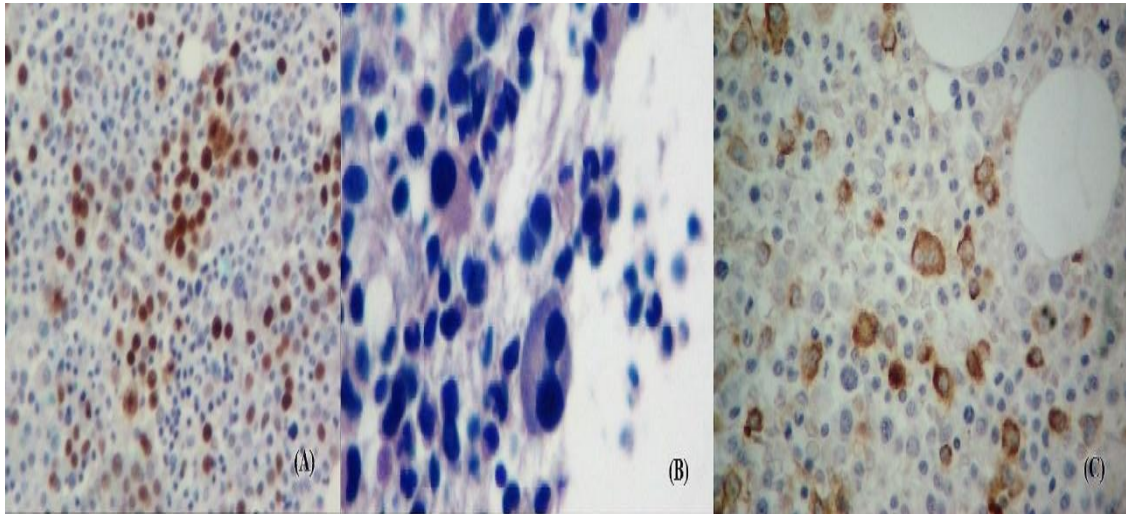
Apresentação dos casos clínicos dos pacientes elegíveis para o TCTH (n=2)

Caso 1

Paciente do sexo masculino de 70 anos de idade foi diagnosticado com SMD subtipo citopenia refratária com displasia de multilinhagens (CRDM), segundo OMS 2008, de risco intermediário-1, de acordo com IPSS e de muito baixo risco, segundo o IPSS-R, após avaliação do hemograma: hemoglobina-11.4 g/dL, hematócrito-34.4%, leucócitos- 3.030×10^9 /L, plaquetas- 9.13×10^9 /L; mielograma: hiper celular com displasia maior que 10% em todas as linhagens, 0,2% de blastos e ferro medular normal; biópsia: fibrose difusa de grau I/II; imunohistoquímica: marcação de CD34 em células precursoras e em alguns megacariócitos, presença de nódulos linfóides, com marcação para CD20. Foi observada uma coloração nuclear forte de 40% de p53 em precursores granulocíticos. O cariótipo foi normal (46, XY) (Figura 6).

O paciente não respondeu à terapia com eritropoietina e com fator estimulante de colônias granulocíticas (G-CSF). A doença evoluiu para leucemia aguda com pancitopenia: hemoglobina-9.91 g/dL, hematócrito-29.3%, leucócitos- 1.41×10^9 /L, plaquetas- 8.0×10^9 /L e 10% de blastos no sangue periférico. Seis meses após a primeira admissão, o paciente evoluiu para óbito.

Figura 6. Imagens referentes ao paciente do caso 1.



A-Forte marcação nuclear (40%) da proteína p53 em precursores granulocíticos. B-Mielograma apresentando celularidade de aproximadamente 70%. Megacariócitos displásicos, eritroblastos na posição peritrabecular (ALIP). Hematoxilina. Ampliação: 1000x. C-Marcação positiva para CD 34+ em células precursoras e em alguns megacariócitos. Avidina-Biotina. Ampliação: 400x

Caso 2

Paciente do sexo masculino, 56 anos, foi diagnosticado com SMD variante hipocelular, após exclusão de aplasia, pela presença de fibrose e de CD34 na MO (MARSH; KULASEKARARAJ, 2001). O hemograma revelou pancitopenia: hemoglobina:8,0 g/dL, Hematócrito:24.2%, leucócitos: 3.0×10^9 /L. O mielograma e a biópsia de medula óssea demonstraram medula hipocelular, com coloração para reticulina, indicando presença de fibrose medular de grau II (MF-2). A citogenética não apresentou metáfases suficientes para análise. A imunohistoquímica da biópsia óssea foi positiva para CD34, com marcação em megacariócitos; observou-se presença de nódulos linfóides, com marcação para CD20. A expressão da proteína p53 e a pesquisa da mutação foram negativas.

O paciente foi encaminhado para TCTH com doador aparentado. O regime de condicionamento mieloablativo utilizado foi Fludarabina 120mg/m^2 e Melfalam 180mg/m^2 . Seis meses após o transplante, o paciente se encontra estável e em remissão completa.

Os dados dos pacientes estão resumidos na tabela 12:

Tabela 12. Características laboratoriais dos pacientes submetidos ao TCTH com SMD (n=2).

Parâmetros	Pacientes	
	Caso 1	Caso 2
Idade (anos)	70	56
Sexo	Masculino	Masculino
Hemograma		
Hb, g/dL	11,4	8,0
Ht, %	34,4	24,2
VCM (fL)		
Leucócitos ($\times 10^9/L$)	3,03	3,0
Plaquetas ($\times 10^9/L$)	9.13	17.0
Cariótipo	46,XY	46,XY
Blastos na medula óssea, %	0,2	0
Fibrose Medular	I/II	II
Celularidade da medula óssea	Hiper celular	Hipo celular
Imunorreatividade para CD34	Positiva	Positiva
Imunohistoquímica para p53	40%	Negativa
TCTH alogênico	Não	Sim

5. DISCUSSÃO

Apesar da extensa utilização dos sistemas de escores prognósticos para a SMD na prática clínica, algumas variáveis importantes associadas à sobrevida desses pacientes ainda não foram contempladas, como a presença de comorbidades e valores séricos de ferritina, β 2-microglobulina e albumina (GARCIA-MANERO *et al.*, 2008; KOMROKJI; ZHANG; BENNETT, 2010). Os indicadores mais notadamente não contemplados nos escores de estratificação de risco para SMD são as alterações moleculares, particularmente as mutações de genes individuais.

O significado prognóstico de algumas mutações, tais como TET2, EZH2, SF3B1 (MALCOVATI *et al.*, 2011), IDH1 / IDH2 e DNMT3A na SMD tem sido descrito. As mutações no gene *TP53* têm sido consistentemente mais associadas com fatores de prognósticos na SMD. Estudos têm demonstrado que mutações no gene *TP53* estão associados com cariótipo complexo, fibrose medular, pior prognóstico e estratificação de alto risco em pacientes com SMD (LOGHAVI *et al.*, 2015; PAPAEMMANUIL *et al.*, 2013).

No presente estudo foi verificada uma frequência de 27,4% de positividade da expressão da proteína p53 nos pacientes com SMD de baixo risco. Estudo realizado por Jädersten e colaboradores (2011) em pacientes com SMD de baixo risco demonstrou que 47,5% apresentaram expressão imunohistoquímica de p53. Porém há o que se considerar que esse estudo se restringia a paciente com 5q- onde frequentemente temos mais positividade da expressão da p53. O grupo demonstrou também que os pacientes com expressão para p53 evoluíram mais rapidamente para LMA do que os sem expressão da proteína p53. Saft e colaboradores (2014), em estudo realizado com pacientes com SMD de baixo risco e deleção do cromossomo 5, verificou frequência de 35% para a expressão imunohistoquímica de p53. Esse dado deve ser interpretado com cautela, uma vez que estudos associam fortemente as mutações no gene *TP53* com anormalidades no cromossomo 5 (HORIIKE *et al.*, 2003).

Os pacientes com expressão da proteína p53 do presente estudo apresentaram características clínicas e laboratoriais que indicam um pior prognóstico em relação aos pacientes sem expressão da proteína, tais como 1) valores inferiores de hemoglobina e hematócrito; 2) fibrose medular em graus mais avançados (II/III);

3) marcação para CD34 em megacariócitos. Além disso, a incidência de transformação leucêmica e evolução para óbito foi significativamente mais elevada em pacientes com a expressão de p53. Os resultados corroboram com os achados de estudos anteriores que verificaram que a expressão de p53, ao diagnóstico, sinaliza como um fator de mau prognóstico para a sobrevida dos pacientes e transformação leucêmica (KUROTAKI *et al.*, 2000). Poucos estudos na literatura associam características clínicas e laboratoriais, tais como hemoglobina, hematócrito, fibrose medular e marcação para CD34 em megacariócitos, em pacientes com SMD de baixo risco ao diagnóstico com a expressão de p53 (SAFT *et al.*, 2014).

A associação da expressão imunohistoquímica de p53 com a presença de fibrose medular em graus avançados e com a marcação para CD34 em megacariócitos no presente estudo corrobora com dados da literatura (DELLA PORTA *et al.*, 2016; LOGHAVI *et al.*, 2015), uma vez que estes são considerados fatores de mau prognóstico independentes, associados com menor sobrevida e maior incidência de transformação leucêmica, e que podem atuar com ferramenta auxiliar na tomada de decisão clínica.

A imunohistoquímica para p53 não é considerada como fator de risco nos escores de prognóstico para SMD, mas o presente estudo observou que, embora todos os pacientes tenham sido classificados como de baixo risco, a expressão de p53 ao diagnóstico foi capaz de identificar perfis clínicos e laboratoriais distintos nesse grupo, indicando que a utilização dessa técnica pode ter um importante papel como fator de prognóstico e como uma ferramenta auxiliar na escolha terapêutica.

Em relação a avaliação da curva de sobrevida livre (SLE) de eventos no presente estudo podemos observar que houve uma diminuição significativa na SLE nos pacientes com positividade para expressão da p53, com alguns casos tendo óbito com menos de um ano de diagnóstico e a sua grande maioria com progressão com menos de dois anos. Este achado é relevante considerando que a população de estudo é de SMD *de novo* sem seleção baseada em citogenética.

A estratificação de risco pelos Sistemas de Escores de Prognóstico (IPSS, WPSS e IPSS-R) é essencial para um manejo clínico adequado dos pacientes com SMD. Apesar de incorporarem informações fundamentais como citopenias, número

de blastos, dependência transfusional, dentre outros, não contemplam a pesquisa de alterações moleculares (RAZA; GALILI, 2008). Pacientes estratificados como baixo ou muito baixo risco podem demonstrar uma evolução mais agressiva da doença, a despeito das características clínicas, morfológicas e da citogenética. A busca por fatores preditivos da doença ainda não contemplados na estratificação do risco, como mutações em genes envolvidos no desenvolvimento e na progressão das neoplasias hematológicas faz-se necessário (BEJAR *et al.*, 2012; KULASEKARARAJ *et al.*, 2013a).

No presente estudo, foram identificados 2/35 pacientes com mutação, sendo a frequência de 5,7% da população em estudo. O resultado encontra-se abaixo do relatado na literatura, onde a incidência geral é de 8-12% (KULASEKARARAJ *et al.*, 2013a). As mutações são mais frequentes nos casos de deleção do 5q, SMD de alto risco, SMD relacionada à terapia, leucemia secundária à SMD e no contexto do cariótipo complexo, incluindo a deleção do 17p (CAZZOLA; DELTA PORTA; MALCOVATI, 2013; JONVEAUX *et al.*, 2000; KITAGAWA *et al.*, 1994; KANEKO *et al.*, 1995; PADUA *et al.*, 1998; KUROTAKI *et al.*, 2000; KITA-SASAI *et al.*, 2001; HORIIKE *et al.*, 2003; HAFERLACH *et al.*, 2008)

Uma das mutações descritas foi a c.394A>T (pk132*), que corresponde ao tipo *nonsense*, em que uma lisina (K) é substituída por um códon de parada, gerando uma proteína não-funcional. Sua presença em pacientes com neoplasias de tumores sólidos têm sido identificada, como no câncer de células do trato urinário e no carcinoma de esôfago, (TANIÉRE *et al.*, 2001). Fallows e colaboradores (2001) descreveram a presença de diversas mutações no gene TP53, como a c.394A>T (pk132*), em pacientes com câncer de ovário, avaliando o impacto na sobrevida global, sobrevida livre de doença e resposta à terapia. Os resultados demonstraram que a expressão da proteína p53 correlacionou-se melhor com a presença de mutações do tipo *missense* do que com as do tipo *nonsense* ou *frameshift*. Além disso, observou-se que pacientes com mutações do tipo *missense* apresentavam uma tendência para sobrevida livre de doença menor do que aqueles com mutações *nonsense*. Na SMD, não há registro dessa mutação, sendo descrita pela primeira vez no presente estudo, de acordo com pesquisa na plataforma COSMIC. Associada a esse achado, observou-se uma expressão da proteína p53 por imunohistoquímica negativa, e um padrão do polimorfismo *wild-type*.

As mutações no gene *TP53* encontradas nos pacientes com SMD são divididas em quatro categorias: a mais comum é a *missense*, em que ocorre a substituição de apenas um códon. Nos demais casos, pode ocorrer a *nonsense*, onde a mudança de um aminoácido no códon levando à formação de um códon de parada prematura, além da *frameshift*, em que ocorrem deleções ou inserções de pares de bases, ocasionando uma mudança no quadro (*frame*) de leitura e produção dos aminoácidos e Splice Site uma mutação que altera as primeiras ou segundas bases imediatamente antes ou após um exon (NCCN, 2017).

Apesar de células normais geralmente apresentarem baixos níveis da proteína p53, devido à meia vida curta da isoforma *wild-type*, uma mutação *missense* normalmente codifica uma proteína resistente à degradação, acumulando-se no interior do núcleo, sendo então detectável por imunohistoquímica (HAVRILESKY, *et al.*, 2003). Algumas formas truncadas, resultam de uma inserção, uma mutação *nonsense*, que gera um códon de parada, ou uma deleção no gene, e essas mutações truncadas codificam proteínas com atividades distintas ou sem atividade, comparada à forma *wild-type*. Diferentemente da mutação *missense*, a mutação truncada não parece aumentar a estabilidade da proteína (CASEY; LOPEZ; RAMOS, 1996; SKILLING, SOOD; NIEMANN, 1996). Portanto, a ausência da expressão da proteína observada na paciente com a mutação c.394A>T (pK132*) (*nonsense*), corrobora com a informação acima, e com achados do estudo de Jaderstein e colaboradores, 2011.

Com relação à segunda mutação encontrada, trata-se de uma deleção de três pares de bases, c.783-1_784delGTG. Diferentemente da c.394A>T (pK132*), essa mutação não está descrita na literatura, em nenhuma doença, sendo portanto um achado inédito na plataforma do COSMIC (2016). A imunohistoquímica revelou forte expressão de p53 em 2% dos precursores granulocíticos analisados. Ao diagnóstico, ambos os pacientes apresentaram cariótipo normal, sem fibrose medular. Apesar das mutações no gene *TP53* estarem associadas a pior prognóstico, não houve associação entre as mutações identificadas e os dados clínicos ou prognósticos dos pacientes. Ambos apresentaram evolução favorável durante cinco anos de acompanhamento, mantendo as mesmas características citadas.

Quanto ao polimorfismo R72P, observou-se uma predominância do genótipo GG. Entretanto, não houve diferença estatística entre os parâmetros epidemiológicos, clínicos ou de prognóstico avaliados, com exceção do sexo, em que houve um predomínio do sexo masculino no grupo heterozigoto. Nas neoplasias hematológicas, diferentes resultados têm sido demonstrados, não havendo consenso sobre o papel desse polimorfismo. Na leucemia mielóide aguda, Nakano e colaboradores (2000), não observaram associação entre os diferentes genótipos, entretanto, na LMC, o alelo C em homozigose, foi associado a menor sobrevida global e livre de progressão (BERGAMASCHI *et al.*,2004).

A relevância clínica deste polimorfismo na SMD ainda não está esclarecida. Em um trabalho realizado por Machado-Neto e colaboradores (2012) que avaliou 77 pacientes com SMD, esse polimorfismo não foi significativamente associado a variáveis clínicas, como IPSS, citogenética, idade, progressão da doença e sobrevida global. No entanto, em estudo mais recente, McGraw e colaboradores (2015b) ao avaliar mais de 705 pacientes, observou que houve uma tendência de o alelo C em homozigose estar associado à maior sobrevida global e livre de progressão, o que pode ser justificado pelo fato de o genótipo CC ser considerado mais eficiente na indução do bloqueio do ciclo celular e no reparo do *DNA*. Entretanto, no grupo sem deleção do 5q houve uma tendência de piores resultados de sobrevida global e livre de progressão na presença do alelo C.

Baseado nesses resultados, o mesmo grupo de McGraw e colaboradores (2015a) analisou, através de sequenciamento direto (Sanger) a interação entre o *TP53* SNP R72P e o *MDM2* SNP309. O *MDM2* é um gene que codifica uma proteína reguladora da função da p53. A interação entre *MDM2-TP53* forma um circuito de retroalimentação negativo, no qual as duas proteínas limitam a atividade uma da outra, além de ser responsável pela exportação da p53 do núcleo ao citoplasma. Os autores propuseram um sistema de escores prognósticos baseado nos dois polimorfismos e na marcação da proteína p53. Ao avaliar amostras de 208 pacientes, observaram diferenças estatisticamente significantes nos dados de sobrevida global e livre de progressão naqueles sem deleção do 5q, que apresentaram menores escores (MCGRAW *et al.* 2015a).

O TCTH alogênico ainda é o único procedimento curativo, porém algumas questões se impõem diante desta afirmativa: quem e quando. Uma vez que a

maioria desses pacientes são idosos e com comorbidades, muitos são inelegíveis para o TCTH. O índice de comorbidades HCT-CI (CUTLER *et al.*, 2004; LIM, 2010 MCCLUME *et al.*, 2010) que avaliam doença cardíaca, alterações hepáticas, pulmonar, renal e antecedente de tumor sólido juntamente com a estratificação prognóstica podem auxiliar nessa difícil decisão. Cutler e colaboradores (2004) através da análise de Markov determinou que devem ser considerados elegíveis ao TCTH alogênico precocemente os pacientes classificados como alto risco, se utilizado o IPSS como instrumento prognóstico.

Além da classificação de risco, a presença de outros fatores de mau prognóstico, tais como fibrose medular, positividade do CD34 na imunohistoquímica ou presença de mutações de mau prognóstico, podem ser consideradas no momento da decisão clínica para a opção de uma terapêutica mais agressiva como o uso de agentes hipometilantes e o TCTH alogênico (MCCLUME *et al.*, 2010).

O TCTH alogênico mieloablativo deve ser considerado para pacientes com idade inferior a 60 anos que possuam um doador aparentado HLA idêntico. Nos pacientes idosos, com idade superior a 60 anos, o TCTH alogênico com condicionamento de intensidade reduzida (CIR) torna-se uma alternativa, pois os estudos demonstram que a idade isoladamente não deve ser considerada uma contraindicação. Com a possibilidade do CIR e a incapacidade de cura com quimioterápicos a despeito do aumento de sobrevida (FENAUX *et al.*, 2009) cada vez mais, a indicação do TCTH alogênico em idosos se torna uma questão relevante.

Nos pacientes de alto risco, a terapia hipometilante deve ser considerada na primeira abordagem, sendo a azacitidina o fármaco de escolha com nível de evidência 1A segundo o Guidelines NCCN versão 1.2017 (NCCN, 2017). Este fármaco pode ser utilizada no pré-TCTH enquanto se busca um doador compatível.

Nos pacientes com indicação incontestável de TCTH alogênico e ausência de um doador aparentado, a busca por doadores não aparentados deve ser iniciada. Conforme dados retrospectivos do CIBMTR (ATALLAH *et al.*, 2014; PASQUINI; ZHU, 2014) corroborados pelos dados do EBMT (EUROPEAN GROUP FOR BLOOD AND MARROW TRANSPLANTATION, 2015), este procedimento não deve ser

desconsiderado, visto que a análise de sobrevida em 4 anos é semelhante aos dos pacientes submetidos ao TCTH com doador aparentado.

A possibilidade de utilização de células do cordão umbilical deve ser considerada principalmente em pacientes pediátricos. Além da recidiva de doença, o elevado índice de falha de enxertia deve ser ponderado, sendo mais recentemente proposto uma monitorização precoce do quimerismo como forma de melhor acompanhamento desta complicação (BEJANYAN, 2014).

A recaída da SMD pós TCTH alogênico é uma preocupação, principalmente, nos pacientes submetidos ao TCTH com CIR, que tem sido associada a uma sobrevida diminuída em 2 anos, tendo como fatores prognósticos a presença de DECH aguda e a recaída nos primeiros 6 meses pós TCTH. A infusão de linfócitos do doador e um segundo TCTH alogênico são opções neste contexto, quando possíveis (GUIÈZE *et al.*, 2016).

A azacitidina passou a ter importante papel no pós-TCTH por sua ação imunomoduladora e pela capacidade de elevar os Linfócitos T-reg (GOODYEAR *et al.*, 2012), com o intuito de manter a remissão. Alguns trabalhos propõem que quando houver indício de perda de quimerismo, a azacitidina possa ser iniciada de forma precoce sendo capaz de evitar a recaída de doença. O uso da azacitidina pós-TCTH pode ser uma alternativa para aumentar a ação do enxerto versus leucemia, sem aumentar a DECH (TESSOULIN *et al.*, 2014)

O curso crônico de alguns pacientes com SMD e a mortalidade relacionada ao transplante (TRM) levam à relutância em oferecer tal procedimento mais precocemente, porém este retardo pode comprometer as chances de sucesso. Esta decisão deve ser baseada em critérios relevantes, como a utilização do índice de comorbidade (DELLA PORTA *et al.*, 2011) específico para o TCTH e a estratificação de risco. A possibilidade da utilização de condicionamento de intensidade reduzida diminuiu a TRM, permitindo que se possa vislumbrar este procedimento para pacientes antes considerados inelegíveis. O IPSS e o IPSS-R são parâmetros úteis para guiar a decisão clínica para se decidir o TCTH alogênico, principalmente em pacientes com doador HLA compatível. Segundo dados do NCCN, nos pacientes de alto risco a sobrevida é melhor se o transplante for precocemente realizado.

Nos pacientes de baixo risco, como os casos descritos nesse estudo, deve ser feito uma avaliação prognóstica criteriosa para a tomada de decisão quanto ao transplante. O caso 1 foi estratificado como uma SMD de baixo risco pelo IPSS e muito baixo pelo IPPS-R, porém com forte positividade para a expressão da proteína p53. Esse achado reforça a hipótese do valor preditivo do p53 na evolução agressiva da doença, em casos de forte positividade e na indicação do TCTH.

O caso 2 refere-se a um paciente diagnosticado como SMD variante hipocelular, SMD-NC (OMS, 2016) após exclusão de anemia aplástica (AA), devido à presença de fibrose medular e de positividade para CD34. O mesmo foi negativo para a expressão de p53 e, após o TCTH, mantém-se estável e em remissão completa. Em contrapartida, no mesmo serviço de hematologia, um paciente diagnosticado como AREB-1, classificado como alto risco e com expressão de p53 de 4%, foi submetido ao TCTH; no entanto, evoluiu para óbito seis semanas após o procedimento. Esse achado reforça a relevância da estratificação de risco e da expressão da proteína p53 como fatores preditivos para evolução pós transplante.

A valorização das mutações gênicas, especialmente p53, TET2, DNMT3, ASXL1 e da expressão da proteína p53 têm sido cada vez mais relevante como fatores de prognóstico para o tratamento, indicação de transplante e por vezes seguimento de doença residual mínima. A mutação do gene p53 especificamente confere fator prognóstico independente. Associada ao cariótipo complexo e quando presente conjuntamente com a deleção do 5q, tem sido relacionada à perda de resposta a lenalidomida e confere mau prognóstico mesmo com o transplante (DELLA PORTA *et al.*, 2016).

Os achados obtidos no presente estudo são inéditos e relevantes refletindo a complexidade do papel exercido pelo gene *TP53* na SMD de baixo risco. Toda a interrelação dos achados clínicos e laboratoriais, especificamente fibrose medular, positividade de CD34 em megacariócitos, padrão e percentual da proteína p53 na imunohistoquímica, presença de mutações no gene p53 e em outras também conhecidas relacionadas a SMD desenham um cenário extremamente complexo o qual diante dos últimos achados da patogênese da doença, tais como a piroptose e a autofagia necessitam de uma correlação e por que não dizer de um contra ponto com as estratificações de risco disponíveis atualmente.

Considerando que a única terapêutica curativa é o TCTH na SMD todas essas alterações encontradas no presente estudo podem ser de grande auxílio na tomada dessa difícil decisão, pois como relatado anteriormente muitos desses pacientes são classificados como de baixo risco, porém tem um comportamento clínico de alto risco podendo ter rápida evolução para LMA. É necessário citar que diante de pacientes com fibrose medular, cariótipo complexo e a mutação do p53 na maioria das vezes nem o TCTH pode ser curativo, sendo necessário o aprofundamento desse estudo e a fisiopatologia da doença e como recurso mais concreto nos dias de hoje, não esquecer que a imunomodulação pós transplante, pode ser etapa essencial no sucesso desse tratamento.

A questão que se impõe é como a mediação inflamatória na morte celular, denominada de piroptose, pode ser integrada no processo de clonalidade da SMD, estabelecendo uma inter-relação com as mutações somáticas as quais ativam o NF- κ B e NLRP3, ativando o ROS via NOX e com os padrões de danos moleculares principalmente S100A8/S100A9 que levam a ativação de ROS e inflamasoma, resultando na produção de citocinas pro-inflamatórias (1 β e a IL-18) e ativando a caspase 1 e consequente a lise celular.

Em suma esse estudo abre perspectivas com o conhecimento da relevância do p53, das mutações no gene TP53 e o conhecimento dos novos mecanismos inflamatórios, estabelecendo perspectivas futuras de estudos que possam associar esses conhecimentos com fatores de prognósticos conhecidos e as mutações.

6. CONCLUSÃO

- O presente estudo demonstra que o aumento da expressão imunohistoquímica para p53, ao diagnóstico, em pacientes com SMD de baixo risco está associado a mau prognóstico, com elevação da mortalidade;
- Dois pacientes apresentam mutações. Um paciente com uma mutação *nonsense* do gene TP53, com expressão negativa da proteína p53 na imunohistoquímica, e com um polimorfismo R72P *wide type* com boa evolução clínica. No segundo paciente com uma mutação *missense*, com significativa expressão da proteína p53 na imunohistoquímica, sem polimorfismo R72P também apresenta boa evolução clínica;
- Em dois pacientes selecionados para o TCTH alogênico, com SMD de baixo risco, o paciente com expressão negativa para a proteína p53 apresenta boa evolução, enquanto em outro paciente selecionado com fibrose e elevada expressão da proteína p53 foi a óbito.

REFERÊNCIAS

- ABDEL-WAHAB, O.; FIGUEROA, M.E. Interpreting new molecular genetics in myelodysplastic syndromes. **Hematology Am Soc Hematol Educ Program** , v.2012, p. 56–64, 2012.
- ARBER, D.A.; HARSSEJIAN, R.P. Reclassifying myelodysplastic syndromes: what's where in the new WHO and why. **Hematology Am Soc Hematol Educ Program** , vol. 2015, p. 294-298, 2015.
- ATALLAH, E.; BYLOW, K.; TROY, J.; SABER, W. Treatment of older patients with high-risk myelodysplastic syndromes (MDS): the emerging role of allogeneic hematopoietic stem cell transplantation (Allo HSCT). **Curr Hematol Malig Rep** , v. 9, n. 1, p. 57-65, 2014.
- BARZI, A.; SEKERES, M. A. Myelodysplastic syndromes: a practical approach to diagnosis and treatment. **Cleveland Clin N J Med.**, v.77, n.1, p.37-44, 2010.
- BEJANYAN, N.Chimerism is a critical prognostic factor for graft failure and survival in recipients of myeloablative conditioning and umbilical cord blood (UCB) transplantation. **Blood**, v. 124, n. 21, p. 3867-3867, 2014.
- BEJAR, R.; LEVINE, R.; EBERT, B.L. Unraveling the molecular pathophysiology of myelodysplastic syndromes. **J Clin Oncol**, vol. 29, n.5, p. 504-515, 2011.
- BEJAR, R.; STEENSMA, D. P. Recent developments in myelodysplastic syndromes. **Blood**, v. 124, n. 18, p.2793-2803, 2014.
- BEJAR, R.; STEVENSON, K.; ABDEL-WAHAB, O.; GALILI, N.; NILSSON, B.; GARCIA-MANERO, G.; KANTARJIAN, H.; RAZA, A.; LEVINE, R.L.; NEUBERG, D.; EBERT, B.L. Clinical effect of point mutations in myelodysplastic syndromes. **N Engl J Med**, v.364, n.26, p. 2496–2506, 2011.
- BEJAR, R.; STEVENSON, K.E.; CAUGHEY, B.A.; EBERT, B.L. Validation of a prognostic model and the impact of mutations in patients with lower-risk myelodysplastic syndromes. **J Clin Oncol**, vol.30, p.3376–3382, 2012.
- BEJAR, R.; STEVENSON, K.E.; CAUGHEY, B. Somatic mutations predict poor outcome in patients with myelodysplastic syndrome after hematopoietic stem cell transplantation. **J Clin Oncol.**, vol.32, p. 2691–2698, 2014.
- BEJAR, R; EBERT, B.L. The genetic basis of myelodysplastic syndromes. **Hematol Oncol Clin North Am**, vol.24, n.2, p. 295-315, 2010.
- BELLI, C. B.; PINHEIRO, R. F.; BESTACH, Y.; LARRIPA, I. B.; DA SILVA TANIZAWA, R. S.; ALFONSO, G.; GONZALEZ, J., *et al.* Myelodysplastic syndromes in South America: A multinational study of 1080 patients. **Am J Hematol**, v. 90, n. 10, p.851-858, 2015.

BENNETT, J. M.; CATOVSKY, D.; DANIEL, M. T.; GALTON, D. A.; GRALNICK, H. R.; SULTAN, C. Proposals for the classification of the myelodysplastic syndromes. **Br J Haematol.**, v.51, n.2, p.198-199, 1982.

BENSAAD, K.; VOUSDEN, K.H. p53: new roles in metabolism. **Trends Cell Biol.** v.17, n.6, p.286-291, 2007.

BERGAMASCHI, G.; MERANTE, S.; ORLANDI, E.; GALLI, A.; BERNASCONI, P.; CAZZOLA, M. TP53 codon 72 polymorphism in patients with chronic myeloid leukemia. **Haematologica**, v.89, p. 868–869, 2004.

BORTOLHEIRO, T. C. Classificações morfológicas das síndromes mielodisplásicas: da classificação Franco-Americana-Britânica (FAB) à classificação da Organização Mundial da Saúde (OMS). **Rev Bras Hematol Hemoter**, v. 3, n. 28, p.194-197, 2006.

BRUNNING, N. *et al.* Myelodysplastic Syndromes/Neoplasms, overview. In: **SWERDLOW, S.H.** *et al.* **Who classification of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues.** Lyon: IARC, p. 88-93, 2008. **Cancer Invest.** v.18, n.2, p148-155, 2000.

CANIZO, D. M.; AMIGO, M.; HERNADEZ, J. M.; SANZ, G.; NUNEZ, R.; CARRERAS, E.; ALEGRE, A.; CUESTA, B.; MATAIX, R. Incidence and characterization of secondary myelodysplastic syndromes following autologous transplantation. **Haematologica**, v. 85, p. 403-409, 2000.

CASEY, G.; LOPEZ, M.E.; RAMOS, J.C. DNA sequence analysis of éxons 2 through 11 and immunohistochemical staining are required to detect all known p53 alterations in human malignancies. **Oncogene**, v.13, p.1971-1981, 1996.

CAZZOLA, M.; DELLA PORTA, M.G.; MALCOVATI, L. The genetic basis of myelodysplasia and its clinical relevance. **Blood**, v.12, n.122, p.4021-4034, 2013.

CCN Clinical Practice Guidelines in Oncology (NCCN Guidelines). myelodysplastic syndromes. NCCN.org. 2017

CHAN, Y.W.; ON, K.F.; CHAN, W.M.; WONG, W.; SIU, H.O.; HAU, P.M.; POON, R.Y. The kinetics of p53 activation versus cyclin E accumulation underlies the relationship between the spindle-assembly checkpoint and the postmitotic checkpoint. **J Biol Chem.** v.283, n.23, p.15716-15723, 2008

CHAUFFAILLE, M.L.F. Alterações cromossômicas em síndrome mielodisplásica. **Rev Bras Hematol Hemoter**, v. 28, n. 3, p.182-187, 2006.

CHAUFFAILLE, M.L.F. Diagnóstico Citogenético da Síndrome Mielodisplásica. In: MALUF, Sharbel Weidner *et al.* **Citogenética Humana.** Porto Alegre: Artmed, 2011. Cap. 21. p. 213-218.

CHEUNG, E.C.; VOUSDEN, K.H. The role of p53 in glucose metabolism. **Curr Opin Cell Biol.** v.22, n.2, p.186-191, 2010.

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

DELLA PORTA, M.G.; GALLÌ, A.; BACIGALUPO, A.; ZIBELLINI, S.; BERNARDI, M.; RIZZO, E.; ALLIONE, B.; VAN LINT, M.T.; PIOLTELLI, P.; MARENCO, P.; BOSI, A.; VOSO, M.T.; SICA, S.; CUZZOLA, M.; ANGELUCCI, E.; ROSSI, M.; UBEZIO, M.; MALOVINI, A.; LIMONGELLI, I.; FERRETTI, V.V.; SPINELLI, O.; CAZZOLA M. Clinical Effects of Driver Somatic Mutations on the Outcomes of Patients With Myelodysplastic Syndromes Treated With Allogeneic Hematopoietic Stem-Cell Transplantation. **J Clin Oncol.**, vol.6, 2016.

DELLA PORTA, M.G.; MALCOVATI, L.; STRUPP, C. et al. Risk stratification based on both disease status and extra-hematologic comorbidities in patients with Myelodysplastic Syndromes. **Haematologica**, v.96, n. 3, p.441-445, 2011.

DUARTE, F.D.; GONÇALVES, R.P.; BARBOSA, M.C.; ROCHA FILHO, F. D.; SANTOS, T.E.J.; SANTOS, T.N.; VASCONCELOS, P.R.L. Tumor suppressor p53 protein expression.: prognostic significance in patients with low-risk myelodysplastic syndrome. **Rev. Bras. Hematol. Hemoter.**, v. 36, n. 3, p. 196-201, 2014.

EUROPEAN GROUP FOR BLOOD AND MARROW TRANSPLANTATION. Dose-reduced versus standard conditioning in MDS/SAML (RICMAC). , 2015. Disponível em: <<http://https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01203228>>. Acesso em: 21 ago. 2015.

FALLOWS, S.; PRICE, J.; ATKINSON, R.J.; JOHNSTON PG, HICKEY I, RUSSELL SE. P53 mutation does not affect prognosis in ovarian epithelial malignancies. **J Pathol**, vol.194, n.1, p.68-75, 2001.

FENAUX, P.; MUFTI, G.J.; HELLSTROM-LINDBERG, E.; SANTINI, V. et al. Efficacy of azacitidine compared with that of conventional care regimens in the treatment of higher-risk myelodysplastic syndromes: a randomised, open-label, phase III study. **Lancet Oncol**, v. 10, n. 3, p. 223-232, 2009.

GANGAT, N.; PATNAIK, M.M.; TEFFERI, A. Myelodysplastic syndromes: Contemporary review and how we treat. **Am J Hematol** , v.91, n.1, p.76-89, 2016.

GARCIA-MANERO, G.; SHAN, J.; FADERL, S.; CORTES, J.; RAVANDI, F., et al. A prognostic score for patients with lower risk myelodysplastic syndrome. **Leukemia**. v.22, n.3, p.538-543, 2008

GOODYEAR, O. C.; DENNIS, M.; JILANI, N.Y.; LOKE, J.; SIDDIQUE, S.; RYAN, G.; NUNNICK, J. et al. Azacitidine augments expansion of regulatory T cells after

allogeneic stem cell transplantation in patients with acute myeloid leukemia (AML). **Blood**, v. 119, n. 14, p. 3361-3369, 2012

GREENBERG, P. L.; TUECHLER, H.; SCHANZ, J.; SANZ, G.; GARCIA-MANERO, G.; SOLÉ, F.; BENNETT, J.M. *et al.* Revised International Prognostic Scoring System for Myelodysplastic Syndromes. **Blood**, v. 120, n. 12, p.2454-2465, 2012.

GREENBERG, P; COX, C.; LEBEAU, M.M.; FENAUX, P.; MOREL, P. *et al.* International scoring system for evaluating prognosis in myelodysplastic syndromes. **Blood**, v.89, p. 2079-2088, 1997.

GUIÈZE, R. ; DAMAJ, G.; PEREIRA, B.; ROBIN, M.; CHEVALLIER, P.; MICHALLET, M.; VIGOUROUX, S. *et al.* Management of Myelodysplastic Syndrome Relapsing after Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation: A Study by the French Society of Bone Marrow Transplantation and Cell Therapies. **Biol Blood Marrow Transplant.** ,v. 22, n. 2, p. 240-247, 2016.

HAASE D. Cytogenetics features in myelodysplastic syndromes. **Annals of Hematology**, v. 87, p.515-26, 2008.

HAFERLACH, C.; BACHER, U.; TIU, R.; MACIEJEWSKI, J.P.; LIST, A. Myelodysplastic syndromes with del(5q): indications and strategies for cytogenetic testing. **Cancer Genet Cytogenet.**, v.187, n.2, p.101–111, 2008.

HAFERLACH, T.; NAGATA, Y.; GROSSMANN, V.; OKUNO, Y.; BACHER, U.; NAGAE, G. *et al.* Landscape of genetic lesions in 944 patients with myelodysplastic syndromes. **Leukemia.** v.28, n.2, p.241-247, 2014.

HAMBLIN, T. **Epidemiology of myelodysplastic syndromes.** In: STEENSMA, D. P. (editor). Myelodysplastic syndromes: pathobiology and clinical management. 2nd Edition. New York: Informa Healthcare, 2009. p.29-47.

HANAHAAN, D.; WEINBERG, R.A. Hallmarks of cancer: the next generation. **Cell**, v.144, n.5, p. 646-74, 2011.

HANAHAAN, D.; WEINBERG, R.A. The hallmarks of cancer. **Cell**, v.100, n.1, p. 57-70, 2000.

HAVRILESKY, L.; KATHLEEN, M.; HASNAH HAMDAN, D.; PRIORE, R.L.; LEON, J.; BELL, J.; BERCHUCK, A. Prognostic Significance of p53 Mutation and p53. Overexpression in Advanced Epithelial Ovarian Cancer: A Gynecologic Oncology Group Study. **J Clin Oncol**, v.21, n.20, p. 3814-3825, 2003.

HE, R. WIKTOR AE, DURNICK DK, KURTIN PJ, VAN DYKE DL, TEFFERI A, PATNAIK MS, KETTERLING RP, HANSON CA. Bone Marrow Conventional Karyotyping and Fluorescence In Situ Hybridization. **Am J Clin Pathol**, v. 146, n. 1, p.86-94, 2016.

HONKANIEMI, E.; MATTSSON, K.; BARBANY, G.; SANDER, B.; GUSTAFSSON, B. Elevated p53 protein expression; a predictor of relapse in rare chronic myeloid malignancies in children? **Pediatr Hematol Oncol.** v.31, n.4, p.327-339, 2014.

HORIIKE, S.; KITA-SASAI, Y.; NAKAO, M.; TANIWAKI, M. Configuration of the TP53 gene as an independent prognostic parameter of myelodysplastic syndrome. **Leuk Lymphoma**, v.44, n.6, p.915–922, 2003.

IMAMURA, N; ABE, K; OGUMA, N. High incidence of point mutations of p53 suppressor oncogene in patients with myelodysplastic syndrome among atomic-bomb survivors: a 10-year follow-up. **Leukemia**. v.16, n.1, p.154-156, 2002.

ISSA, J.P. The myelodysplastic syndrome as a prototypical epigenetic disease. **Blood**, v. 121, n.19, p. 3811-3817, 2013.

JÄDERSTEN M, SAFT L, SMITH A, KULASEKARARAJ A, POMPLUN S, GÖHRING G, HEDLUND A, HAST R, SCHLEGELBERGER B, PORWIT A, HELLSTRÖM-LINDBERG E, MUFTI GJ. TP53 mutations in low-risk myelodysplastic syndromes with del(5q) predict disease progression. **J Clin Oncol.** v.29, n. 15, p.1971-1979, 2011.

JÄDERSTEN, M.; HELLSTRÖM-LINDBERG, E. Myelodysplastic syndromes: biology and treatment. **J Intern Med.** v.265, n.3, p.307-328, 2009.

JONVEAUX, P.; FENAUX, P.; QUIQUANDON, I.; PIGNON, J.M.; LAÏ, J.L.; LOUCHEUX-LEFEBVRE, M.H. Mutations in the p53 gene in myelodysplastic syndromes. **Oncogene**, v..6, n.12, p.2243–2247, 2000.

KANEKO, H.; MISAWA, S.; HORIIKE, S.; NAKAI, H.; KASHIMA, K. TP53 mutations emerge at early phase of myelodysplastic syndrome and are associated with complex chromosomal abnormalities. **Blood**, v..85, n.9, p.2189–2193, 1995.

KETTERLING, R.P; WYATT, W.A.; VANWIER, S.A.; LAW, M.; HODNEFIELD, J.M.; HANSON, C.A.; DEWALD, G.W. Primary myelodysplastic syndrome with normal cytogenetics: utility of ‘FISH panel testing’ and M-FISH. **Leuk Res**, v. 26, n. 3, p.235-240, 2002.

KITAGAWA, M.; YOSHIDA, S.; KUWATA, T.; TANIZAWA, T.; KAMIYAMA, R. p53 expression in myeloid cells of myelodysplastic syndromes. Association with evolution of overt leukemia. **Am J Pathol**, v.145, n.2, p.338–344, 1994.

KITA-SASAI, Y.; HORIIKE, S.; MISAWA, S.; KANEKO, H.; KOBAYASHI, M.; NAKAO, M.; NAKAGAWA, H.; FUJII, H.; TANIWAKI, M. International prognostic scoring system and TP53 mutations are independent prognostic indicators for

- patients with myelodysplastic syndrome. **Br J Haematol**, v.115, n.2, p.309-312, 2001.
- KLEIN, K.O.; OUALKACHA, K.; LAFOND, M.H.; BHATNAGAR, S.; TONIN, P.N.; GREENWOOD, C.M.T. Gene Coexpression Analyses Differentiate Networks Associated with Diverse Cancers Harboring *TP53* Missense or Null Mutations. **Front Genet.**, v.7, p.137, 2016.
- KOMROKJI, R. Myelodysplastic syndromes: a view from where the sun rises and where the sun sets. **Leuk Res.**, v.30, n.9, p.1067-68, 2006.
- KOMROKJI, R.; ZHANG, L.; BENNETT, J. M. Myelodysplastic syndromes classification and risk stratification. **Hematol Oncol Clin North Am.**, v.24, n. 2., p.443-457, 2010.
- KULASEKARARAJ, A.G.; MOHAMEDALI, A.M.; MUFTI, G.J. Recent advances in understanding the molecular pathogenesis of myelodysplastic syndromes. **B J Haematol.**, v.162, n. 5, p. 587–605, 2013a.
- KULASEKARARAJ, A.G.; SMITH, A.E.; MIAN, S.A.; MOHAMEDALI, A.M.; KRISHNAMURTHY, P.; LEA, N.C. *TP53* mutations in myelodysplastic syndrome are strongly correlated with aberrations of chromosome 5, and correlate with adverse prognosis. **Br J Haematol.**, v.160, n.5, p.660–672, 2013b.
- KUROTAKI, H.; TSUSHIMA, Y.; NAGAI, K.; YAGIHASHI, S. Apoptosis, bcl-2 expression and p53 accumulation in myelodysplastic syndrome, myelodysplastic-syndrome-derived acute myelogenous leukemia and de novo acute myelogenous leukemia. **Acta Haematol.**, v.102, n. 3, p.115–123, 2000.
- LIM, Z. Allogeneic hematopoietic stem-cell transplantation for patients 50 years or older with myelodysplastic syndromes or secondary acute myeloid leukemia. **J Clin Oncol**, v. 28, n. 3, p. 405-411, 2010.
- LOGHAVI, S.; AL-IBRAHEEMI, A.; ZUO, Z.; GARCIA-MANERO, G.; YABE, M.; WANG, S.A.; KANTARJIAN, H.M.; YIN, C.C.; MIRANDA, R.N.; LUTHRA, R.; MEDEIROS, L.J.; BUESO-RAMOS, C.E.; KHOURY, J.D. *TP53* overexpression is an independent adverse prognostic factor in de novo myelodysplastic syndromes with fibrosis. **Br J Haematol.**, v.171, n.1, p.91-99, 2015.
- LORAND-METZE, I. PINHEIRO, M.P.; RIBEIRO, E.; DE PAULA, E.V.; METZE, K. Factors influencing survival in myelodysplastic syndromes in a Brazilian population: comparison of FAB and WHO classifications. **Leuk Res**, v. 28, n. 6, p.587-594, 2004.
- LOUNNAS, N.; FRELIN, C.; GONTHIER, N.; COLOSETTI, P.; SIRVENT, A.; CASSUTO, J.P.; BERTHIER, F.; SIRVENT, N.; ROUSSELOT, P.; DREANO, M.; PEYRON, J.F.; IMBERT, V. NF-kappaB inhibition triggers death of imatinib-sensitive and imatinib-resistant chronic myeloid leukemia cells including T3151 Bcr-Abl mutants. **Int J Cancer**. v.125, n.2, p.:308-317, 2009.

MA, X. Epidemiology of Myelodysplastic Syndromes. *The American J Medicine*, v. 125, n. 7, p.2-5, 2012.

MA, X.; DOES, M.; RAZA, A.; MAYNE, S. T. Myelodysplastic syndromes: incidence and survival in the United States. *Cancer*, v.109, n.8, p.1536-42, 2007

MACHADO-NETO, JÁ.; TRAINA, F.; DE MELO CAMPOS, P.; ANDREOLI-RISSO, M.F.; COSTA, F.F.; OLALLA SAAD, S.T. Lack of association between MDM2SNP309 and *TP53* Arg72Pro polymorphisms with clinical outcomes in myelodysplastic syndrome. *Neoplasma*, v.59, n.5, p.530-535, 2012.

MALCOVATI L, PAPAEMMANUIL E, BOWEN DT, BOULTWOOD J, DELLA PORTA MG, PASCUTTO C, TRAVAGLINO E, GROVES MJ, GODFREY AL, AMBAGLIO I, GALLÌ A, DA VIÀ MC, CONTE S, TAURO S, KEENAN N, HYSLOP A, HINTON J, MUDIE LJ, WAINSCOAT JS, FUTREAL PA, STRATTON MR, CAMPBELL PJ, HELLSTRÖM-LINDBERG E, CAZZOLA M. Clinical significance of SF3B1 mutations in myelodysplastic syndromes and myelodysplastic/myeloproliferative neoplasms. *Blood*, v.118, n.24, p. 6239-6246, 2011 .

MALCOVATI, L.; HELLSTRÖM-LINDBERG, E.; BOWEN, D.; ADÈS, L.; CERMAK ,J.; DEL CAÑIZO, C.; DELLA PORTA, M.G. et al. Diagnosis and treatment of primary myelodysplastic syndromes in adults: recommendations from the European Leukemia Net. *Blood*, v. 122, n. 17, p.2943-2964, 2013.

MALCOVATI, L.; CAZZOLA, M. The shadowlands of MDS: idiopathic cytopenias of undetermined significance (ICUS) and clonal hematopoiesis of indeterminate potential (CHIP). *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. v.2015, p.299-307, 2015.

MARSH, J.C.; KULASEKARARAJ, A.G. Management of the refractory aplastic anemia patient: what are the options? *Blood*, v.122, n.22, p.3561-3567, 2011.

MATSUDA, A.; GERMING, U.; JINNAI, I.; MISUMI, M.; KUENDGEN, A., et al. Difference in clinical features between Japanese and German patients with refractory anemia in myelodysplastic syndromes. *Blood*, v.106, n.8, p.2633-2640, 2005.

MCCLUNE, B.L.; WEISDORF, D.J.; PEDERSEN, T.L. et al. Effect of age on outcome of reduced-intensity hematopoietic cell transplantation for older patients with acute myeloid leukemia in first complete remission or with myelodysplastic syndrome. *J Clin Oncol*, v.28, n.11, p.1878-1887, 2010.

MCGRAW, K.L.; CLUZEAU, T.; SALLMAN, D.A.; BASIORKA, A.A.; IRVINE, B.A.;

ZHANG, L.; EPLING-BURNETTE, P.K.; MACIEJEWSKI, J.; LIST, A.F. *TP53* and *MDM2* single nucleotide polymorphisms influence survival in non-del(5q) myelodysplastic syndromes. *Oncotarget*, v.27, n.6, p.34437–34445, 2015a.

MCGRAW, K.L.; ZHANG, L.M.; ROLLISON, D.E.; BASIORKA, A.A.; FULP, W.; RAWAL, B.; JEREZ, A.; BILLINGSLEY, D.L.; LIN, H.Y.; KURTIN, S.E.; YODER, S.; ZHANG, Y.; GUINTA, K.; MALLO, M.; SOLÉ, F.; CALASANZ, M.J.; CERVERA, J.; SUCH, E.; GONZÁLEZ, T.; NEVILL, T.J.; HAFERLACH, T.; SMITH, A.E.; KULASEKARARAJ, A.; MUFTI, G.; KARSAN, A.; MACIEJEWSKI, J.P.; SOKOL, L.; EPLING-BURNETTE, P.K.; WEI, S.; LIST, A.F. The relationship of *TP53* R72P polymorphism to disease outcome and *TP53* mutation in myelodysplastic syndromes. **Blood Cancer J.**, v.5:e291, 2015b.

MILNER, J. Structures and functions of the tumor suppressor p53. **Pathol Biol (Paris)**. v.45, n.10,p.797-803, 1997.

MISGELD, E., GERMING, U.; AUL, C.; GATTERMANN, N. Secondary myelodysplastic syndrome after fludarabine therapy of a low-grade non-Hodgkin's lymphoma. **Leuk Res**, v. 25, n. 1, p.95-98, 2001.

MORAES, A.C.R.; LICÍNIO, M.A.; PAGNUSSAT, L.; DEL MORAL, J.A. G; SANTOS-SILVA, M. C. Síndromes mielodisplásicas: aspectos moleculares, laboratoriais e a classificação OMS 2008. **Rev Bras Hematol Hemoter**, v. 31, n. 6, p.463-470, 2009.

NAKANO, Y.; NAOE, T.; KIYOI, H.; KUNISHIMA, S.; MINAMI, S.; MIYAWAKI, S. Poor clinical significance of p53 gene polymorphism in acute myeloid leukemia. **Leuk Res.**, v.24, n.4, p.349–352, 2000.

NEUKIRCHEN, J.; SCHOONEN, W. M.; STRUPP, C.; GATTERMANN, N.; AUL, C.; HAAS, R.; GERMING, U. Incidence and prevalence of myelodysplastic syndromes: Data from the Düsseldorf MDS-registry. **Leuk Res.**, v.35, n.12, p.1591-96, 2011.

NIERO-MELO, L.; RESENDE, L.S.R.; GAIOLLA, R.D.; OLIVEIRA, C.T.; DOMINGUES, M.A.C.; MORAES NETO, F.A. Diretrizes para diagnóstico morfológico em síndromes mielodisplásicas. **Rev Bras Hematol Hemoter**, v. 3, n. 28, p.167-174, 2006.

NIMER, S. D. Myelodysplastic syndromes. **Blood**, v. 111, n. 10, p.4841-4851, 2008.

OLNEY, H. J.; LE BEAU, M. M. The cytogenetics and molecular biology of myelodysplastic syndromes. In: BENNETT JM (Editor). **Myelodysplastic syndromes: pathobiology and clinical management**. New York: Marcel Dekker, 2002, p.89-119.

OTROCK, Z.K.; TIU, R.V.; MACIEJEWSKI, J.P.; SEKERES, M.A. The need for additional genetic markers for myelodysplastic syndrome stratification: what does the future hold for prognostication? **Expert Rev Hematol**. v.6, n.1, p.59-68,2013.

PADUA, R.A.; GUINN, B.A.; AL-SABAH, A.I.; SMITH, M.; TAYLOR, C.; PETTERSSON, T. RAS, FMS and p53 mutations and poor clinical outcome in myelodysplasias: a 10-year follow-up. **Leukemia**, v..12, n.6, p.887–892, 1998.

PAPAEMMANUIL, E.; GERSTUNG, M.; MALCOVATI, L.; TAURO, S.; GUNDEM, G.; VAN LOO, P.; YOON, C. J.; ELLIS, P.; WEDGE, D. C.; PELLAGATTI, A.; SHLIEN, A.; GROVES, M. J., et al. Clinical and biological implications of driver mutations in myelodysplastic syndromes. **Blood**, v. 122, n. 22, p. 3616-3627, 2013.

PASQUINI, M. C.; ZHU, X. Current uses and outcomes of hematopoietic stem cell transplantation: 2014 CIBMTR Summary Slides.

Pathol Biol (Paris). v.45, n.10, p.797-803, 1997.

PROKOCIMER, M.; ROTTER, V. Structure and function of p53 in normal cells and their aberrations in cancer cells: projection on the hematologic cell lineages. **Blood**. v.84, n.8, p.:2391-2411, 1994.

RAZA, A.; GALILI, N. The genetic basis of phenotypic heterogeneity in Myelodysplastic Syndromes. **Cancer**, v. 113, n.12, p.3331-3340,2008.

RIBEIRO, E. **Detecção das anormalidades hemopoéticas por citometria de fluxo e sua utilidade no diagnóstico das síndromes mielodisplásicas**. 2005. 102 f. Tese (Doutorado em Medicina Experimental) – Universidade Estadual de São Paulo, Campinas, 2005.

RIBIZZI, L. DARNOWSKI, W.; GOULETT, F. A. Amifostine cytotoxicity and reduction of apoptosis in a human myelodysplastic cell line. **Leuk Res.**, v.24, p.519-25, 2001.

ROTTER, V.; PROKOCIMER, M. p53 and human malignancies. **Adv Cancer Res**. v.57, p.257-272, 1991.

SAFT, L.; KARIMI, M.; GHADERI, M.; MATOLCSY, A.; MUFTI, G.J.; KULASEKARARAJ, A.; GÖHRING, G.; GIAGOUNIDIS, A.; SELLESLAG, D.; MUUS, P.; SANZ, G.; MITTELMAN, M.; BOWEN, D.; PORWIT, A.; FU, T.; BACKSTROM, J.; FENAUX, P.; MACBETH, K.J.; HELLSTRÖM-LINDBERG, E. p53 protein expression independently predicts outcome in patients with lower-risk myelodysplastic syndromes with del(5q). **Haematologica**. v.99, n.6, p.1041-1049, 2014.

SALLMAN, D.A.; CLUZEAU, T.; BASIORKA, A.A.; LIST, A. Unraveling the Pathogenesis of MDS: The NLRP3 Inflammasome and Pyroptosis Drive the MDS Phenotype. **Front Oncol**. v.16, p.6:151, 2016.

SANTOS, TEJ; GONÇALVES, RP; DUARTE, FB. Myelodysplastic syndrome versus idiopathic cytopenia of undetermined significance: therole of morphology in distinguishing between these entities. **Rev Bras Hematol Hemoter**.v.35, n.6, p. 438–439, 2013.

SCHROEDER, T.; RUF, L.; BERNHARDT, A.; HILDEBRANDT, B.; AIVADO, M.; AUL, C.; GATTERMANN, N.; HAAS, R.; GERMING, U. Distinguishing myelodysplastic syndromes (MDS) from idiopathic cytopenia of undetermined

significance (ICUS): HUMARA unravels clonality in a subgroup of patients. **Ann Oncol**.v.21, n.11, p.2267-2271, 2010.

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

SKILLING, J.S.; SOOD, A.; NIEMANN, T. An abundance of p53 null mutations in ovarian carcinoma. **Oncogene**, v.13, p.117-123, 1996.

STEENSMA, D.P.; BEJAR, R.; JAISWAL, S.; LINDSLEY, R.C.; SEKERES, M.A.; HASSERJIAN, R.P.; EBERT, B.L. Clonal hematopoiesis of indeterminate potential and its distinction from myelodysplastic syndromes. **Blood**.v.126, n.1, p.9-16, 2015.

TANIÈRE, P.; MARTEL-PLANCHE, G.; SAURIN, J.C.; LOMBARD-BOHAS, C.; BERGER, F.; SCOAZEC, J.Y.; HAINAUT, P. TP53 mutations, amplification of P63 and expression of cell cycle proteins in squamous cell carcinoma of the oesophagus from a low incidence area in Western Europe. **Br J Cancer**. v.85, n.5, p.721-726, 2001.

TARAPORE, P.; FUKASAWA, K. p53 mutation and mitotic infidelity. **Cancer Invest**. v.18, n.2, p.148-155, 2000.

TEFFERI, A.; VARDIMAN, J.W. Myelodysplastic syndromes. **N Engl J Med**. 2009 v.361, n.19, p.:1872-1885, 2009.

TESSOULIN, B.; DELAUNAY, J.; CHEVALLIER, P.; LOIRAT, M. et al. Azacitidine salvage therapy for relapse of myeloid malignancies following allogeneic hematopoietic SCT. **Bone marrow transplant**, v. 49, n.4, p. 567-571, 2014.

VALENCIA, A.; MASALA, E.; ROSSI, A.et. al. Expression of nucleoside-metabolizing enzymes in myelodysplastic syndromes and modulation of response to azacitidine. **Leukemia**, v..28, n.3, p. 621–628, 2014.

VALENT, P.; KRIEGER, O.; STAUDER, R.; WIMAZAL, F.et al. Iron overload in myelodysplastic syndromes (MDS) – diagnosis, management, and response criteria: a proposal of the Austrian MDS platform. **Eur J Clin Invest**, v. 38, n. 3, p.143-149, 2008.

VALENT, P.; BAIN, B.J.; BENNETT, J.M.; WIMAZAL, F.; SPERR, W.R.; MUFTI, G.; HORNY, H.P. Idiopathic cytopenia of undetermined significance (ICUS) and idiopathic dysplasia of uncertain significance (IDUS), and their distinction from low risk MDS. **Leuk Res**.v.36, n.1, p.1-5, 2012.

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.

YONISH-ROUACH E A question of life or death: the p53 tumor suppressor gene. **Pathol Biol (Paris)**., v.45, n.10, p.815-823, 1997.

ZEIDMAN, A.; DAYAN, D. B.; MITTELMAN, M. Secondary myelodysplastic syndrome and acute leucemias. **Haematologia**, v. 27, n. 1, p. 23-28, 1995.

APÊNDICES



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
FACULDADE DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE CIRURGIA**

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO PARA PARTICIPAÇÃO EM PESQUISA

Você está sendo convidado (a) a participar de uma pesquisa intitulada como **“O Impacto da Expressão da Proteína p53 nas características fenotípicas em pacientes com Síndrome Mielodisplásica (SMD)”**, que tem como objetivo principal pesquisar a presença de uma alteração das células do sangue que pode estar relacionada com uma doença que muda a forma das hemácias, pesquisando na célula qual a causa desta modificação.

Convido o Sr(a), participar da pesquisa, em caso de dúvida, poderá comunicar-se com a pesquisadora Dr. Fernando Barroso Duarte, que reside na rua Canuto de Aguiar, 600, Apt. 1500, Meireles, Fortaleza, CE. Fone: (85)- 3242-9052. Para tanto, necessitamos que a Senhora autorize a obtenção da coleta de sangue e das informações para que seja realizada a pesquisa. A coleta de sangue será realizada nos Hemocentros do Estado do Ceará, localizado na Rua Capitão Francisco Pedro, 1210, Rodolfo Teófilo.

A participação do(a) senhor(a) na pesquisa será plenamente voluntária e consciente, não havendo qualquer forma de pagamento ou compensação material, sendo que, ao participar da pesquisa, não ficará exposto(a) a nenhum risco, podendo desistir de participar, a qualquer momento, sem prejuízo de sua assistência médica. Sua identidade será mantida em sigilo absoluto, sendo a divulgação dos resultados totalmente proibida a terceiros, ficando restrita à discussão acadêmica de âmbito científico e, ainda assim, sem qualquer possibilidade de identificação dos pacientes. Será, no entanto, permitido o acesso às informações sobre procedimentos relacionados à pesquisa.

Esse documento será impresso em duas vias, ficando uma com o entrevistado e a outra com a pesquisadora.

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

Fortaleza, ____ de _____ de _____.

Assinatura do participante da pesquisa

Assinatura de quem obteve o termo



Universidade Federal do Ceará
Comitê de Ética em Pesquisa

Of. Nº 181/12

Fortaleza, 01 de junho de 2012.

Protocolo COMEPE nº: 129/12

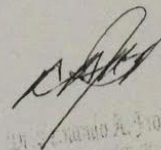
Pesquisador Responsável: Fernando Barroso Duarte.

Título do Projeto: O Impacto da expressão da proteína P53 nas características fenotípicas em pacientes com síndrome mielodisplásica (SMD).

Levamos ao conhecimento de V.S^a que o Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Ceará – COMEPE, dentro das normas que regulamentam a pesquisa em seres humanos, do Conselho Nacional de Saúde – Ministério da Saúde, Resolução nº 196 de 10 de outubro de 1996 e complementares, aprovou o protocolo e o TCLE do projeto supracitado na reunião do dia 31 de maio de 2012.

Outrossim, informamos que o pesquisador deverá se comprometer a enviar o relatório final do referido projeto.

Atenciosamente,


Dr. Fernando Barroso Duarte
Coordenador do Comitê
de Ética em Pesquisa
UFCE

ANEXOS

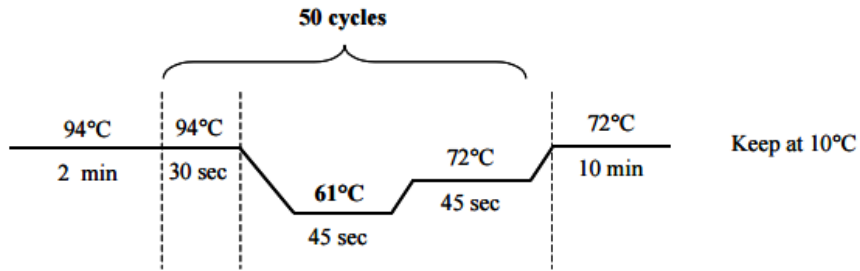
Anexo I – Detecção de mutações no gene *TP53* por sequenciamento direto

xon	Pares de <i>primers</i> 5' → 3'	Direção	Tamanho do fragmento	Programa da PCR	Mix da PCR
2-3	TTCATGCTGGATCCCCACT AGTCAGAGGACCAGGTCCTC	F R	344 bp	A ou B	1
4	TGCTCTTTTCACCCATCTAC ATACGGCCAGGCATTGAAGT	F R	353 bp	B	1
4	TGAGGACCTGGTCCTCTGAC AGAGGAATCCCAAAGTTCCA	F R	413 bp	B	1
5	TTCAACTCTGTCTCCTTCT CAGCCCTGTCGTCTCTCCAG	F R	248 bp	B	1
6	GCCTCTGATTCCTCACTGAT TTAACCCCTCCTCCCAGAGA	F R	181 bp	B	1
5-6	TGTTCACTTGTGCCCTGACT TTAACCCCTCCTCCCAGAGA	F R	467 bp	B	1
7	CTTGCCACAGGTCTCCCCAA AGGGGTCAGAGGCAAGCAGA	F R	237 bp	C	2
7	AGGCGCACTGGCCTCATCTT TGTGCAGGGTGGCAAGTGGC	F R	177 bp	B	1
8	TTCCTTACTGCCTCTTGCTT AGGCATAACTGCACCCTTGG	F R	231 bp	B	1
8-9	TTGGGAGTAGATGGAGCCT AGTGTTAGACTGGAACTTT	F R	445 bp	B	1
9	GACAAGAAGCGGTGGAG CGGCATTTTGAGTGTTAGAC	F R	215 bp	E	1
10	CAATTGTAACCTTGAACCATC GGATGAGAATGGAATCCTAT	F R	260 bp	D	1
11	AGACCCTCTCACTCATGTGA TGACGCACACCTATTGCAAG	F R	245 bp	B	1

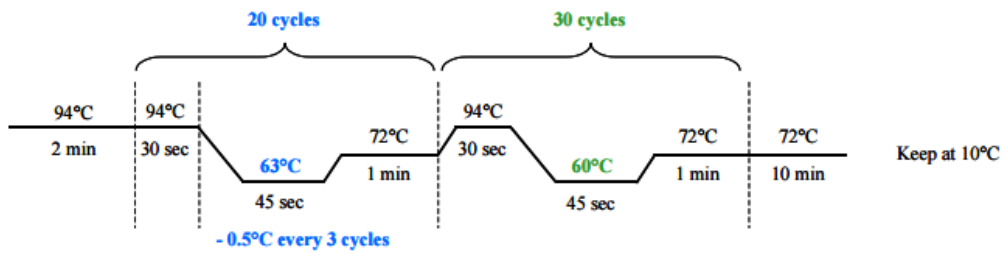
Mix para PCR		
1. GoTaq Hot Start Polymerase (Promega)		
Componentes	Volume	Concentração final
- 5X tampão com MgCl ₂	4 µL	1 X
- 25mM MgCl ₂	1,2 µL	1,5 mM
- dNTP mix (5mM each)	0,8 µL	0,2 mM
- Primer 10µM	0,8 µL	0,4 µM
- Primer 10 µM	0,8 µL	0,4 µM
- GoTaq DNA polimerase (5U/ul)	0,1 µL	0,5 U
- DNA	50 ng	
- Água	Qsp 20 µL	
2. HotStarTaq (Qiagen)		
Componentes	Volume	Concentração final
- 10X tampão com MgCl ₂	2 µL	1 X
- 5X Q-Solution	4 µL	1X
- dNTP mix (5mM cada)	0,8 µL	0,2 mM
- Primer 10uM	0,8 µL	0,4 µM
- Primer 10 uM	0,8 µL	0,4 µM
- HotStarTaq DNA polimerase (5U/µl)	0,1 µL	0,5 U
- DNA	50 ng	
- Água	Qsp 20 µL	

Programação da PCR

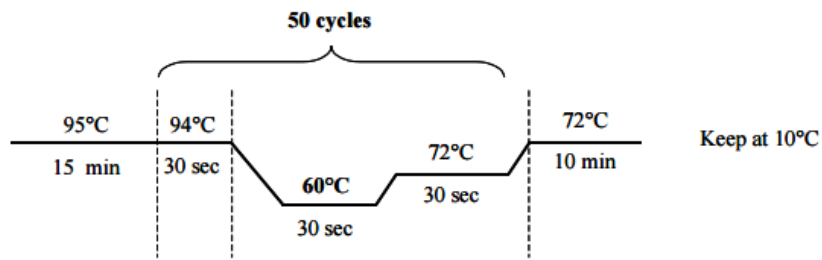
A:



B:



C:



D:

