



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

LEONARDO FEITOSA PINHEIRO

AVALIAÇÃO DAS ALTERAÇÕES CROMOSSÔMICAS ATRAVÉS DAS
TÉCNICAS DE CITOGENÉTICA CLÁSSICA E MOLECULAR EM
PACIENTES COM SINDROME MIELODISPLÁSICA

FORTALEZA

2014

LEONARDO FEITOSA PINHEIRO

**AVALIAÇÃO DAS ALTERAÇÕES CROMOSSÔMICAS ATRAVÉS DAS
TÉCNICAS DE CITOGENÉTICA CLÁSSICA E MOLECULAR EM
PACIENTES COM SINDROME MIELODISPLÁSICA**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Patologia da Universidade Federal do Ceará, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Patologia

Orientador: Prof. Dr. Ronald Feitosa Pinheiro

FORTALEZA

2014

LEONARDO FEITOSA PINHEIRO

FICHA CATALOGRÁFICA

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

P72a Pinheiro, Leonardo Feitosa.
Avaliação das alterações cromossômicas através das técnicas de citogenética clássica e molecular em pacientes com síndrome mielodisplásica/ Leonardo Feitosa Pinheiro. – 2014.
85 f. : il.

Tese (Doutorado) – Universidade Federal do Ceará. Faculdade de Medicina. Programa de Pós-Graduação em Patologia, Fortaleza, 2014.
Área de concentração: Patologia.
Orientação: Prof. Dr. Ronald Feitosa Pinheiro.

1. Síndromes Mielodisplásicas. 2. Bandejamento Cromossômico. 3. Aberrações Cromossômicas. I. Título.

CDD 616.07

LEONARDO FEITOSA PINHEIRO

**AVALIAÇÃO DAS ALTERAÇÕES CROMOSSÔMICAS ATRAVÉS DAS
TÉCNICAS DE CITOGENÉTICAS CLÁSSICA E MOLECULARE EM
PACIENTES COM SINDROME MIELODISPLÁSICA**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação
em Patologia da Universidade Federal do Ceará,
como parte dos requisitos para obtenção do título de
Mestre em Patologia.

Aprovada em: ____/____/____.

BANCA EXAMINADORA

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

Prof. Dr. Manoel Martins
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Dra. Fabíola Fernandes Heredia
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dr. Francisco Dário Rocha Filho
Universidade Federal do Ceará (UFC)

AGRADECIMENTOS

Em especial ao prof. Dr. Ronald Feitosa Pinheiro, pela abertura ao universo de uma pós-graduação, pelo direcionamento na minha carreira profissional, pela oportunidade e confiança

A Juliana Cordeiro, por total apoio na execução da técnica FISH, pela imprescindível ajuda e dedicação nos experimentos, por toda dedicação e amizade.

A Marília Braga que esteve ao meu lado ajudando na execução dos experimentos.

A todos os integrantes do laboratório de Citogenômica do Câncer: Onde tivemos uma convivência harmoniosa, leve e respeitosa.

A minha Mãe, Maria Irian Feitosa Pinheiro, exemplo de equilíbrio e pacemônia. Por toda dedicação, sempre incentivando e torcendo pelo meu sucesso profissional.

A meu Pai Edilson Diógenes Pinheiro, que sempre acreditou no trabalho como fator preponderante para o crescimento intelectual e moral do homem

A meu irmão Edilson Diógenes Pinheiro Junior, pela importância da família

A minha esposa Patrícia Moreira de Medeiros, que se encontra grávida do nosso primeiro filho Davi, dedico este trabalho a vocês, fontes da minha inspiração e energia diária.

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

RESUMO

A Síndrome Mielodisplásica (SMD) é uma doença hematopoética heterogênea clonal, originada a partir de uma mutação somática nas células progenitoras hematopoéticas. Nos pacientes com SMD, as alterações cromossômicas permitem confirmar a clonalidade da doença, identificar categorias clínicas e biológicas específicas, estratificar os pacientes em categorias de prognóstico, prever a probabilidade de progressão para leucemia mieloide aguda e a sobrevida global e selecionar os pacientes que podem beneficiar-se de terapias inovadoras. O presente estudo, de caráter retrospectivo, teve como principal objetivo avaliar as alterações citogenéticas clássicas e moleculares em pacientes com síndrome mielodisplásica. O estudo das alterações cromossômicas foi realizado por bandamento G, em 138 amostras de pacientes portadores de SMD. Foram detectadas alterações cromossômicas, ao diagnóstico, em 43/99 (43,4%) dos casos estudados. Avaliamos a eficácia da técnica de hibridação *in situ* com fluorescência, na detecção das anomalias cromossômicas mais comuns (-5/5q-, -7/7q-, +8,) em 30 pacientes portadores de SMD que apresentavam baixo índice mitótico (≤ 10 metáfase) à metodologia convencional. Com o painel de sondas de FISH utilizado, foi detectado benefício adicional de 2 casos (6,6%). Ao associarmos as variáveis clínico laboratoriais com o cariótipo, observou-se que os pacientes cujo cariótipo era normal, obtiveram maior sobrevida ($p < 0,05$) em relação aqueles que apresentavam cariótipo alterado. Os pacientes que pertenciam ao grupo de risco citogenético favorável também apresentaram maior sobrevida em comparação aos demais grupos ($p < 0,05$). A melhor estratégia de estudo genético dos doentes com SMD, visando a otimização da relação custo/benefício, consiste na aplicação sequencial das técnicas de citogenética convencional e molecular, devendo estas ser encaradas como complementares na caracterização genética das síndromes mielodisplásicas. A FISH, ainda que ofereça pouco acréscimo, deve ser usada nos casos que não apresentem metáfase ou baixo índice mitótico

Palavras-chave: Síndrome mielodisplásica. Banda G. Alteração Citogenética

ABSTRACT

Myelodysplastic syndrome (MDS) represents a heterogeneous group of hematopoietic disorders, originated from a somatic mutation in stem cells. In patients with myelodysplastic syndromes, the chromosomal abnormalities confirm the clonality of the disease, identify peculiar biological and clinical entities, allow stratification of prognosis, predicting the likelihood of progression into acute myeloid leukemia and overall survival, and provide fundamental help not only in making a differential diagnosis, but also in introducing patients to innovative therapeutic options. This study was retrospective, aimed to evaluate the classical and molecular cytogenetic abnormalities in patients with myelodysplastic syndrome. The study of chromosomal abnormalities by G-banding was performed in 138 samples of patients with MDS. Chromosomal abnormalities at diagnosis were detected in 43/99 (43.4%) of the cases studied. Evaluated the effectiveness of the technique of fluorescence in situ hybridization for detection of the most common chromosomal abnormalities (-5/5q-, -7/7q-, +8,) in 30 patients with MDS who had a low mitotic index (≤ 10 metaphase) to conventional methodology. With the panel of FISH probes used, additional benefit was detected in two cases (6.6%). By associating the clinical laboratory variables with the karyotype, it was observed that patients whose karyotype was normal type, had higher survival ($p < 0.05$) than those who had changed the type karyotype. Patients who belonged to the favorable cytogenetic risk group also had better survival rates compared to the other groups ($p < 0.05$). The best strategy for genetic study of patients with MDS, in order to optimize the cost / benefit consists in the sequential application of the techniques of conventional and molecular cytogenetics, which should be seen as complementary in the genetic characterization of myelodysplastic syndromes. FISH, yet offering little extra, should be used in cases that do not show metaphase or low mitotic index

Keywords: Myelodysplastic Syndrome. G-banding. Alteration Cytogenetics.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Protocolo de exclusão em Síndrome Mielodisplásica.	5
Figura 2- Mecanismos envolvidos na patogênese da SMD.	20
Figura 3- Sonda cromossomo 5 (5p15.31)/EGR1, CytoCELL Diagnostics.	30
Figura 4- Sonda cromossomo 7 (7q22/7q31), CytoCELL Diagnostics.	30
Figura 5- Distribuição dos pacientes portadores de SMD, segundo classificação da OMS (2008).	34
Figura 6- Distribuição dos pacientes portadores de SMD primária, segundo Sistema Internacional de Escore Prognóstico (IPSS-1997)	34
Figura 7- Distribuição dos pacientes portadores de SMD, segundo grupos citogenéticos utilizados pelo Sistema Internacional de Escore Prognóstico (IPSS-1997).	36
Figura 8- Distribuição dos pacientes portadores de SMD, de acordo com o resultado do cariótipo (banda G).	36
Figura 9 Cariótipo Normal: 46, XX .	37
Figura 10 - Caso 66. Citogenética Clássica (bandamento G). Cariótipo com alteração no cromossomo 8 (Trissomia do 8) 46, XY, +8.	38
Figura 11- Caso 66. Citogenética Clássica (bandamento G). Cariótipo com alteração em dois cromossomos: 46, XY, del (5) (q31), del (7) (q32).	39
Figura 12- Caso 17. Citogenética Clássica (bandamento G). Cariótipo com apenas uma alteração cromossomos: 46, XY, del (5) (q31).	40
Figura 13- Distribuição dos pacientes portadores de SMD segundo a presença ou não de aneuploidia.	41
Figura 14- Distribuição dos pacientes portadores de SMD segundo o cromossomo envolvido nas alterações citogenéticas apresentadas.	41
Figura 15- FISH para a região 5p15.31 normal.	42
Figura 16- FISH para a região 7q 22 (FISH normal).	43

Figura 17 - (Caso 78) FISH para o cromossomo 5 demonstrando deleção 5q	43
Figura 18 - (Caso 129) FISH para o cromossomo 5 demonstrando deleção 5q.	44
Figura 19 - Sonda com Hibridização Inespecífica.	44
Figura 20 - Sonda com Hibridização Inespecífica.	45
Figura 21 : Distribuição da variável (número de displasias) de acordo com o tipo de cariótipo.	46
Figura 22 : Distribuição da variável (número de displasias) de acordo com o tipo de cariótipo.	46
Figura 23 : Distribuição dos casos de dependência transfusional de acordo com o cariótipo.	47
Figura 24 : Distribuição da celularidade da medula óssea de acordo com o cariótipo.	48
Figura 25 : Distribuição dos casos de fibrose de acordo com o cariótipo .	48
Figura 26 : Curvas de sobrevida de acordo com o cariótipo.	49
Figura 27 : Curvas de sobrevida de acordo com o cariótipo.	49
Figura 28 : Curvas de sobrevida de acordo com o risco citogenético.	50
Figura 29 : Curva de sobrevida global.	50

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Sistema Internacional de Escore Prognóstico (IPSS) para SMD.	08
Tabela 2: Fatores prognósticos de acordo com a classificação WPSS – associação entre OMS, cariótipo e dependência transfusional.	09
Tabela 3: Taxa de sobrevida e transformação em leucemia mielóide aguda das SMD de acordo com os subtipos da classificação da OMS.	10
Tabela 4: Evolução na classificação da Síndrome Mielodisplásica.	11
Tabela 5a: IPSS Revisado.	15
Tabela 5b: IPSS-R – Classificação de risco e pontuação.	16
Tabela 6: Sistema de classificação de acordo com o risco citogenético.	16
Tabela 8: Sumário do Refinamento do IPSS-R.	17
Tabela 9: Frequência de alterações citogenéticas em pacientes com SMD <i>de novo</i> e SMD secundária.	21
Tabela 10: Critérios de Inclusão e Exclusão.	28
Tabela 11: Características dos pacientes portadores de SMD.	33
Tabela 12: Dados citogenéticos dos pacientes portadores de SMD.	35

LISTA DE QUADROS

Quadro 1- Nova proposta de estratificação citogenética. 13

Quadro-2- Protocolo de exclusão de causas não clonais que, com frequência, cursam 27 com citopenias e/ou dispoeses na médula. Protocolo aplicado a pacientes que encontram-se sob investigação de SMD.

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

SMD	<i>Síndrome Mielodisplásica</i>
SMD/NMP	<i>SMD/ Neoplasias mieloproliferativas</i>
SMD-U	<i>SMD inclassificável</i>
t-LMA	<i>Leucemia mielóide secundária ou relacionada à terapia</i>
t-SMD	<i>Síndrome Mielodisplásica secundária ou relacionada à terapia</i>
AR	<i>Anemia refratária</i>
AREB	<i>Anemia refratária com excesso de blastos</i>
AREB-t	<i>AREB em transformação</i>
ARSA	<i>Anemia refratária com sideroblastos em anel</i>
ARSA-t	<i>ARSA em transformação</i>
CRDM	<i>Citopenia refratária com dysplasia multilinhagem</i>
CRDM-AS	<i>CRDM com sideroblastos em anel</i>
CRDU	<i>Citopenia refratária com displasia unilinhagem</i>
DAPI	<i>4', 6-diamidino-2-phenylindole</i>
HIPER	<i>Hiper celular</i>
HIPO	<i>Hipo celular</i>
IPI	<i>Índice prognóstico internacional</i>
IPSS	<i>International prognostic score system</i>
ISCN	<i>International system for human cytogenetic nomenclature</i>
LA	<i>Leucemia aguda</i>
DEL	<i>Deleção</i>
FISH	<i>Fluorescent in situ hybridization</i>
FITC	<i>Fluorescein isothiocyanate</i>
FAB	<i>Franco-Americano-Britânico</i>
IL	<i>Interleucina</i>
INS	<i>Inserção</i>
INV	<i>Inversão</i>
OMS	<i>Organização Mundial de Saúde</i>
p	<i>Braço curto do cromossomo</i>
q	<i>Braço longo do cromossomo</i>
t	<i>Translocação</i>

SSC	<i>Saline sodium citrate</i>
ISO	<i>Isocromossomo</i>
LMA	<i>Leucemia mielóide aguda</i>
LMC	<i>Leucemia mielóide crônica</i>
SIDA	<i>Síndrome da imunodeficiência adquirida</i>
TR	<i>Trombocitopenia refratária</i>

ÍNDICE

1	INTRODUÇÃO	01
1.1	Síndrome Mielodisplásica	01
1.1.1	Aspectos Gerais	01
1.1.2	Epidemiologia e Etiologia	02
1.2	Protocolo de exclusão	04
1.3	Patogênese da Síndrome mielodisplásica	06
1.4	Classificação da SMD	13
1.4.1	IPSS	17
1.5	Citogenética Clássica (Cariótipo por banda G) em Síndrome Mielodisplásica	20
1.6	Citogenética Molecular (FISH) em Síndrome Mielodisplásica	23
2	OBJETIVOS	26
2.1	Objetivo geral	26
2.2	Objetivos específicos	26
3	PACIENTES, MATERIAIS E MÉTODOS	27
3.1	Pacientes	27
3.2	Coleta das amostras	28
3.3	Citogenética clássica	28
3.4	Hibridização <i>in situ</i> por fluorescência	29
3.5	Análise estatística	32
3.6	Aspectos éticos	32
4	RESULTADOS	33
4.1	Características epidemiológicas dos pacientes	33
4.2	Resultados Citogenéticos	36
4.2.1	Citogenética Clássica (banda G)	36

4.2.2	Citogenética Molecular (FISH)	43
4.3	Associação das alterações cromossômicas	46
5	DISCUSSÃO	53
6	CONCLUSÕES	59
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	60
8	APÊNDICE	

1. INTRODUÇÃO

1.1 Síndrome mielodisplásica (SMD)

1.1.1 Aspectos Gerais

Síndrome mielodisplásica (SMD) representa um grupo de doenças clonais hematopoéticas heterogêneas, que se caracterizam por alterações morfológicas de dispoese em uma ou mais linhagens, medula óssea hiperproliferativa, citopenias no sangue periférico e risco aumentado para transformação leucêmica (SWERDLOW et al., 2008). A SMD consiste na neoplasia primária da médula óssea mais comum do mundo ocidental. (MUFTI et al., 2008).

Acomete habitualmente idosos com idade, ao diagnóstico, entre 60 e 75 anos. A incidência em pacientes acima de 70 anos é maior que 40 casos por 100.000 pessoas/ano, sendo, portanto incidente e prevalente em nosso meio devido ao aumento da expectativa de vida da população mundial, (incluindo-se a população brasileira). (MAGALHÃES et al., 2010) Acredita-se que, com o aumento da incidência de neoplasias malignas e o uso de radioterapia, e quimioterapia em pacientes cada vez mais jovens poderá ocorrer aumento de incidência neste grupo. (BEJAR, 2013).

Uma sequência de alterações genéticas oriundas de radioterapia, assim como quimioterapia, resultam no desenvolvimento de um clone anômalo e geneticamente instável das células progenitoras da médula óssea, causando hematopoese ineficaz. (BEJAR, 2013). As citopenias, que ocorrem por consequência da hematopoese displásica, são as principais complicações relacionadas a esta doença. Podem levar à dependência transfusional e aumento à susceptibilidade a infecções e hemorragias. Citopenias no sangue periférico em combinação com médula óssea (MO) hiperclular e displasia são achados característicos da SMD. (JÄDERSTEN M et al, 2008).

1.1.2 Epidemiologia e Etiologia

A SMD é uma doença comum em indivíduos idosos, pois aproximadamente 80% dos pacientes possuem mais de 60 anos ao diagnóstico (STROM et al., 2008). São raros os casos na infância, sendo observadas em menos de 5% das neoplasias hematológicas que acometem pacientes com menos de 14 anos de idade (HASLE et al., 2003).

A incidência anual é de aproximadamente 7 - 15/100.000 pessoas e aumenta com a idade (JÄDERSTEN M et al., 2008).

Desde 2001, a SMD tem sido reportada no programa norte-americano *Surveillance, Epidemiology, and End Results* (SEER) do Instituto Nacional do Câncer. De acordo com os dados do SEER, aproximadamente 12.000 pacientes são diagnosticados com SMD por ano nos Estados Unidos e aproximadamente 20.000 na comunidade européia (SEER, 2012). Estes dados indicam que existe um número significativamente maior de casos de SMD do que de leucemias agudas e de doenças mieloproliferativas (GARCIA-MANERO, 2011).

As características dos pacientes com SMD no Brasil foram apresentada pela primeira vez por Magalhães et al., (2010). Neste estudo, foi apresentado o Registro Brasileiro de Síndrome Mielodisplásica em centros de atenção terciária, avaliando 476 pacientes de 12 centros das regiões Nordeste, Sudeste, Sul e Centro-Oeste do Brasil, diagnosticados no período de 1º de janeiro de 2003 e 31 de dezembro de 2007 (MAGALHÃES et al., 2010). Um dos principais pontos abordados no estudo mostrou que a idade mediana do diagnóstico dos pacientes com SMD foi de 68,3 anos, número menor que observado nos EUA e Europa, mas muito similar a Japão e Coréia. Destes, 50,8% eram mulheres e 86,6% residentes em zona urbana (MAGALHÃES et al., 2010).

O envelhecimento da população e uma maior sensibilização para o diagnóstico desta doença, bem como a sobrevida mais prolongada dos pacientes submetidos a tratamentos de quimioterapia de uma neoplasia primária, contribuem para o aumento significativo da frequência das SMD (CHAUFFAILLE, 2009)

Quanto à sua etiologia a SMD é classificada como primária ou *de novo* e secundária ou relacionada com a terapia (t-SMD). A SMD primária constitui a maioria dos casos e ocorre sem um evento prévio, enquanto a SMD secundária desenvolvem-se após exposição à quimioterapia e/ou radioterapia (LI et al., 2009).

A doença primária não possui uma etiologia totalmente elucidada, no entanto estudos epidemiológicos têm identificado consistentemente diversos fatores de risco para o acometimento da SMD tais como o tabaco, exposição ao benzeno e outros solventes orgânicos, agentes químicos agrícolas (pesticidas, herbicidas e fertilizantes), radiações ionizantes, sexo masculino e história familiar de neoplasias hematológicas (LUKACKOVA et al., 2013; MUFTI, 2004; PEDERSEN-BJERGAARD; ANDERSEN; ANDERSEN, 2007).

A SMD secundária acomete pacientes mais jovens, há maior incidência de transformação para LMA, as citopenias são mais severas e geralmente acomete as 3 linhagens. A t-SMD pode surgir em qualquer idade, geralmente 4-5 anos após realização de tratamento quimioterápico ou com uso de radioterapia. A percentagem de anomalias citogenéticas assim como o aumento do risco de transformação em clone leucêmico são significativamente maiores nas t-SMD do que nas SMD primárias. (BOWEN, D. T., 2010; NAEIM et al., 2008)

Algumas doenças hematológicas, tais como anemia de Fanconi, disqueratose congênita, síndrome de Shwachmann-Diamond e síndrome de Diamond-Blackfan estão também associadas a um risco aumentado de SMD (DE SOUZA FERNANDEZ et al., 2000) Adicionalmente, exposição a agentes alquilantes, inibidores da topoisomerase II, ou a radiações terapêuticas, assim como exposição a drogas citotóxicas, está associado a um risco aumentado de desenvolvimento de t-SMD.

Uma pequena proporção de doentes com SMD, cerca de 4-5%, pode desenvolver transformação blástica em locais extramedulares (sarcoma granulocítico), particularmente na pele, estando esta evolução associada a mau prognóstico (NAEIM et al., 2008)

1.2 Protocolo de exclusão

Com o envelhecimento ocorre diminuição da reserva medular, mas não é normal o aparecimento de taxas de hemoglobina abaixo de 13,0 g/dL para homens e de 12,0 g/dL em mulheres. (LORAND-METZE, 2004).

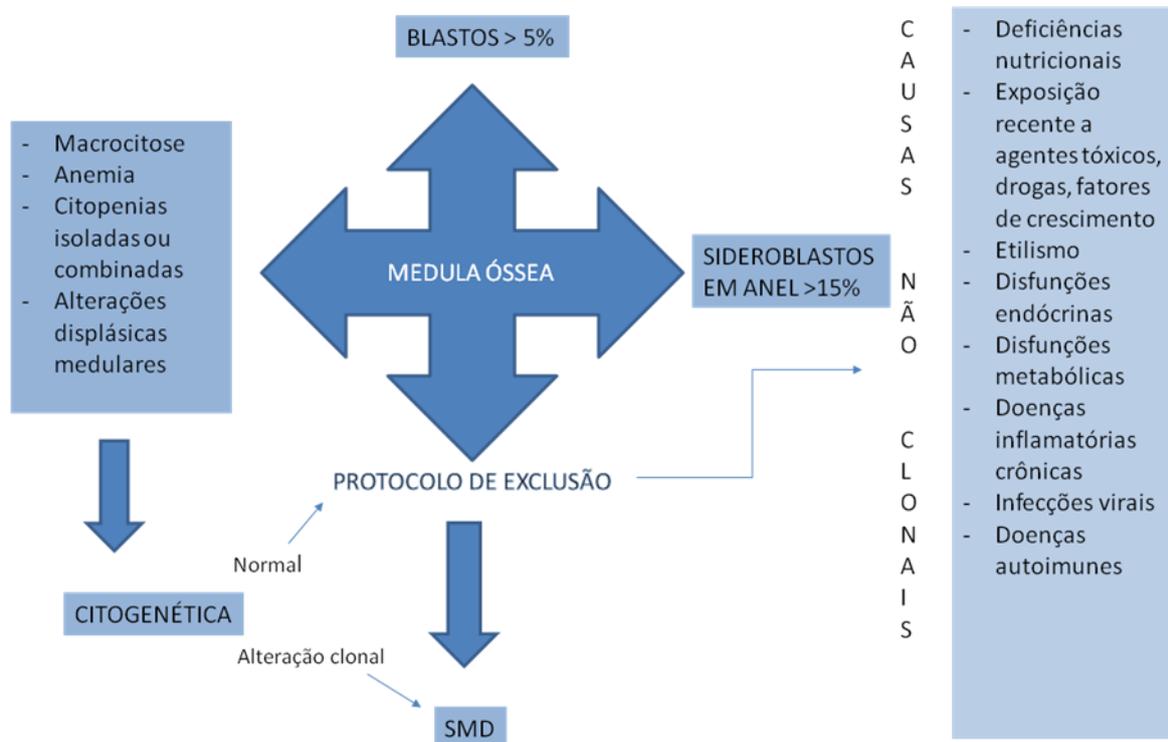
A anemia nesta faixa da população (idosos >60 anos) pode ter múltiplas causas. A deficiência de vitamina B12, ácido fólico (VCM aumentado), de ferro (VCM e HbCM diminuído), devido à carência alimentar e causadas por patologias gástricas

são as causas mais frequentes. Também são causas importantes o hipotireoidismo, o uso de bebidas alcoólicas, as infecções virais (principalmente o HIV) e exposição a metais pesados, particularmente arsênio.

Algumas doenças hematológicas congênitas, tais como anemia diseritropoiética congênita, podem provocar displasia nas células eritróides; a infecção pelo parvovírus B19 pode estar associada à presença de eritroblastos megaloblastóides; alguns agentes quimioterápicos podem provocar displasia marcada nas células da linhagem mielóide; o fator de crescimento granulocitário induz alterações morfológicas nos neutrófilos, tais como hipergranularidade e hipolobulação nuclear. A hemoglobinúria paroxística noturna pode também apresentar características semelhantes às SMD; os casos de SMD com medula óssea hipocelular podem constituir dificuldades no diagnóstico diferencial com a anemia aplásica. (DAYYANI et al., 2010)

Magalhães (2004), relata que em idosos a anemia é um problema clínico comum. As alterações próprias da hematopoese do idoso tornam o ambiente medular especialmente favorável à emergência de clones anormais e mielodisplásicos, favorecendo assim o aparecimento da patologia.

Nas fases mais precoces da doença, caracterizadas por ausência de excesso de blastos, as alterações podem ser sutis, com graus mínimos de displasia. Nesses casos, portanto, onde se tem apenas macrocitose isolada, anemia ou citopenias isoladas ou combinadas, persistentes, não responsivas a tratamentos, ausência de sideroblastos em anel, assim como ausência de alteração citogenética clonal, o diagnóstico de SMD deve ser de exclusão. Esse protocolo de investigação consta de alguns critérios de exclusão considerados absolutos: as deficiências nutricionais de vitamina B12 e ácido fólico, a exposição recente nas últimas três a quatro semanas as substâncias tóxicas ou drogas tais como: agentes citotóxicos e fatores de crescimento (LORAND-METZE, 2004). (Figura 1).

Figura 1: Protocolo de exclusão em Síndrome Mielodisplásica

Fonte: Adaptado de MAGALHÃES e LORAND-METZE (2004)

Magalhães e Lorand-Metze (2004), relataram que quando no mielograma não se encontra um número aumentado de blastos e atipias importantes dos precursores hemopoiéticos, o diagnóstico de mielodisplasia (SMD) é um diagnóstico de exclusão.

A avaliação inicial desses pacientes requer anamnese, exame físico, exames laboratoriais (hemograma e contagem de reticulócitos), análise citológica, citoquímica e histopatológica da medula óssea, incluindo a avaliação da rede de reticulina, o estudo citogenético, a dosagem de eritropoetina endógena e a exclusão de causas não clonais que, com frequência, cursam com citopenias e/ou dispoeses. A determinação de um clone citogeneticamente alterado pode constituir uma informação determinante no estabelecimento do diagnóstico de SMD (AGGARWAL et al., 2011; KITAGAWA et al., 2011). A medula óssea desses pacientes é geralmente hiper-ou normocelular, e numa minoria dos casos, aproximadamente 10%, hipocelular. Nos aspirados de medula óssea dos doentes com SMD é observada displasia uni- ou multilinhagem, a qual é

definida como a presença de alterações displásicas em pelo menos 10% dos precursores de uma linhagem celular (AGGARWAL et al., 2011; KITAGAWA et al., 2011).

1.3 Patogênese

A patogênese desta doença é complexa e envolve mecanismos genéticos, epigenéticos e imunomediados. Caracteriza-se por doença clonal das células progenitoras hematopoiéticas iniciais ou células estaminais, caracterizada por hematopoese displásica. (AGGARWAL et al., 2011; KITAGAWA et al., 2011.)

Segundo um dos modelos da patogênese molecular das SMD propostos, a hematopoese displásica, ineficaz deve-se aparentemente a um microambiente medular anormal que induz à morte precoce das células progenitoras hematopoéticas (CPH) por apoptose, enquanto a proliferação clonal se dá em consequência a mutações somáticas que conferem vantagem proliferativa às células. Ao contrário de outras neoplasias hematológicas caracterizadas por alterações cromossômicas equilibradas, tais como translocações recíprocas e inversões, as quais resultam em mutações dominantes e ativação de oncogenes, a SMD está geralmente associada à anomalia cromossômica desequilibrada. (BEJAR; LEVINE; EBERT, 2011; MUFTI, 2004)

Muitas das anomalias cromossômicas recorrentes nas SMD levam à perda de material genético e consequente inativação de genes supressores tumorais. Estes genes são responsáveis pelo controle, crescimento celular e/ou morte celular programada através da regulação do ciclo celular, reparação de danos no DNA e apoptose. (OLNEY E LE BEAU, 2002).

A perda de função do gene pode ocorrer por perda ou deleção, mutações pontuais ou pelo silenciamento transcripcional via metilação dos elementos controladores do gene. Os fatores que contribuem para o aumento da apoptose nos estágios iniciais de desenvolvimento das SMD podem ser alterações genéticas e/ou alterações no microambiente da medula (NAEIM et al., 2008). Talvez, seja preciso à combinação de duas ou mais mutações, juntamente com mudanças no status epigenético e no ambiente medular para favorecer o desenvolvimento da SMD.

Hoje existem dois modelos para explicar a carcinogênese envolvendo genes supressores tumorais. O primeiro e mais difundido é a hipótese de Knudson ou “teoria dos dois eventos”, em que mutações devem provocar perda de função dos dois alelos.

Essas mutações têm caráter recessivo, uma vez que um único alelo mutado não é capaz de induzir uma neoplasia. Um exemplo clínico que ilustra esse princípio é o desenvolvimento de SMD após terapia citotóxica (t-SMD). O período de latência relativamente longo entre o tempo de exposição e a disfunção medular é compatível com o mecanismo dos dois eventos. Estes doentes podem ter inicialmente dois alelos normais no *locus* do gene supressor tumoral, um dos quais é mutado em resultado da terapia. Subsequentemente, a perda do segundo alelo pode levar ao desenvolvimento de leucemia (OLNEY E LE BEAU, 2002; LI et al., 2009). O segundo modelo, ou modelo alternativo é o da Haploinsuficiência, em que apenas um alelo mutado, associado a eventos adicionais promotores de tumor, seria capaz de induzir a carcinogênese, mesmo com o outro alelo expressando-se normalmente.

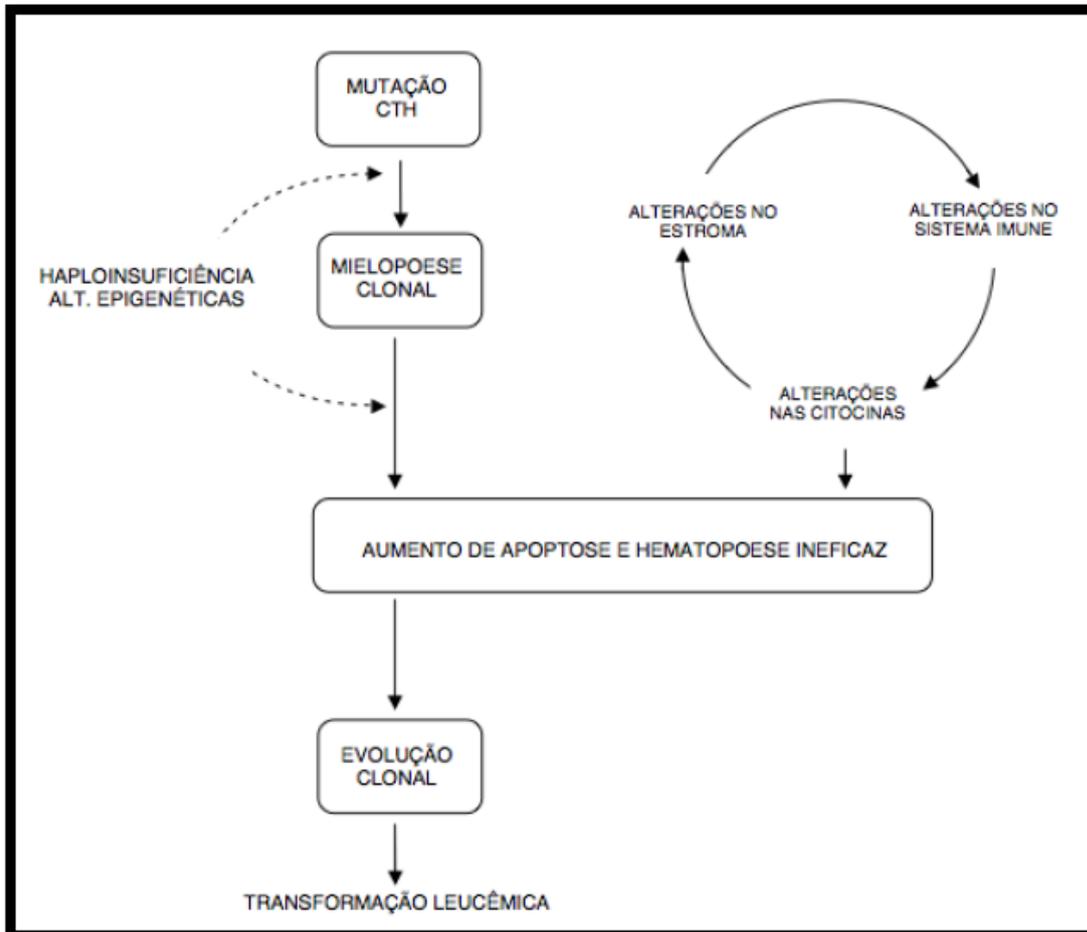
Podemos citar alguns passos associados à patogênese da SMD: 1. auto-renovação da célula-tronco hematopoética ou aquisição desta propriedade numa célula progenitora; 2. aumento da capacidade proliferativa no clone neoplásico e/ou em sua progênie mais diferenciada; 3. comprometimento ou bloqueio da diferenciação celular; 4. instabilidade genética e epigenética; 5. presença de mecanismos antiapoptóticos no clone neoplásico; 6. evasão ao sistema imune; 7. supressão da hematopoese normal (BEJAR; LEVINE; EBERT, 2011; MUFTI, 2004) (Figura 2)

Um dos paradoxos associado às SMD consiste na presença simultânea de citopenias periféricas, das três linhagens celulares (granulocítica, eritróide e megacariocítica) e medula óssea hiperclular. No entanto, não se sabe se o defeito que produz a hiperproliferação e displasia das células hematopoiéticas resulta diretamente na apoptose ou se a apoptose é a resposta homeostática compensatória a esta hiperproliferação. De acordo com alguns investigadores, a progressão da doença é acompanhada por um declínio na apoptose e aumento dos níveis da proteína anti-apoptótica BCL-2 nas células progenitoras da medula óssea em subtipos de SMD mais avançados, tais como AREB (anemia refractária com excesso de blastos) (NAEIM et al., 2008)

A evolução natural das SMD caracteriza-se geralmente por um de três cenários clínicos: (1) agravamento progressivo da pancitopenia com aumento do número de blastos na medula (o cariótipo permanece estável); (2) curso clínico relativamente estável seguido de uma mudança abrupta com transformação leucémica evidente, tipicamente com alteração do cariótipo com ganho de clones secundários e cariótipos

complexos; ou (3) curso clínico estável durante muitos anos sem alterações significativas no número de blastos e cariótipo estável (OLNEY E LE BEAU, 2009)

Figura 2: Mecanismos envolvidos na patogênese da SMD



Legenda: CTH: células-tronco hematopoéticas. **Fonte:** Adaptado de TEFFERI E VARDIMAN (2009)

1.4 Classificação da SMD

A complexidade da patogênese e a heterogeneidade do prognóstico das SMD acentuam a importância da existência de um sistema de classificação da doença que permita prever a sobrevivência dos doentes e a probabilidade de transformação em LMA (MUFTI et al., 2008). Além disso, os sistemas de estadiamento são fundamentais para a precisão do diagnóstico e subsequente seleção da terapia.

A classificação inicial das SMD foi realizada em 1976, pelo grupo cooperativo Franco/Americano/Britânico (FAB), e era baseada em parâmetros morfológicos observados no sangue periférico e na medula óssea. O grupo FAB adotou critérios diagnósticos para as síndromes pré-leucêmicas de anemia refratária com excesso de blastos (AREB) e leucemia mielomonocítica crônica (LMMC). Seis anos após a classificação inicial, foram adicionados três novos subtipos, completando a classificação FAB para SMD que contempla: Anemia Refratária, Anemia Refratária com Sideroblastos em anel, Anemia Refratária com excesso de blastos, Leucemia Mielomonocítica Crônica e Anemia Refratária com Excesso de blastos em transformação. (MUFTI et al., 2008; TEFFERI, VARDIMAN, 2009).

Outra classificação de SMD, patrocinada pela Organização Mundial de Saúde (OMS) contempla oito subtipos: Anemia Refratária (AR), Síndrome do 5q-, Anemia Refratária com Sideroblastos em Anel (ARSA), Citopenia Refratária com Displasia de Multilinhagens (CRDM), Citopenia Refratária com Displasia de Multilinhagens com Sideroblastos em anel (CRDM-AS), Anemia Refratária com Excesso de Blastos I (AREB-I) e Anemia Refratária com Excesso de Blastos II (AREB-II) e SMD Inclassificável. (MALCOVATI, 2005; NIMER, 2008),

A classificação do OMS dividiu o grupo AREB em dois subgrupos: O grupo AREB I apresenta contagem de blastos entre 6 a 9%, o AREB II de 10 a 19%, sendo o valor maior ou igual a 20% critério diagnóstico para leucemia aguda. (SCOTT; DEGG, 2010).

Foram criados os subtipos de Citopenia Refratária com Displasia de Multilinhagens com sideroblastos em anel, Síndrome do 5q- e Inclassificável. Os casos de CRDM são definidos pela presença de duas ou mais citopenias no sangue periférico e medula óssea com displasia em duas linhagens em dez por cento ou mais das células. A síndrome do 5q- caracteriza-se por anemia macrocítica que pode ou não ser acompanhada de plaquetose com cariótipo com deleção isolada do braço longo do

cromossomo 5. O subtipo inclassificável é definido pela presença de leucopenia ou plaquetopenia isoladas. (SWERDLOW et al., 2008)

O estudo multicêntrico internacional realizado pelo grupo IMRAW (do inglês International MDS Risk Assessment Working) com 816 pacientes, resultou na elaboração do IPSS (do inglês International Prognostic Score System, publicado por GREENBERG et al, em 1997, onde permite prever o risco de transformação leucêmica assim como a mediana de sobrevida esperada para cada caso. Os pacientes são estratificados, de acordo com este índice, em grupos de risco baseados no número de citopenias, porcentagem de blastos na medula óssea e alteração de cariótipo. GREENBERG e colaboradores demonstraram a importância das alterações citogenéticas na evolução dos pacientes ao dividirem essas alterações em grupos. Os casos de carótipo indicativo de bom prognóstico (del (20q), del (5q), -Y e normal), cariótipo desfavorável (alterações no cromossomo 7 e cariótipo complexo) e cariótipo intermediário (outras alterações) possuem sobrevida média de 3.8, 0.8 e 2.4 anos, respectivamente

O IPSS é o sistema de classificação e estratificação de risco mais usado, porém possui algumas limitações. O sistema de escore foi desenvolvido baseado em uma corte de pacientes não tratados, para ser aplicado no momento do diagnóstico e não foi validado para ser um modelo flexível que pudesse ser aplicado em diferentes momentos. O sistema de pontuação considera para valor prognóstico o número de citopenias, e não leva em consideração a severidade da citopenia, (KOMROKJL et al. 2010) (Tabela 1)

O IPSS classifica os doentes em 3 categorias citogenéticas: 1) os doentes com cariótipo normal, perda do cromossoma Y, 5q- ou 20q- como anomalias isoladas são classificados na categoria de baixo risco; 2) os doentes que apresentam anomalias estruturais ou perda do cromossoma 7 e/ou cariótipos complexos com 3 ou mais anomalias são classificados na categoria de alto risco; e 3) os doentes que apresentam outras anomalias, tais como trissomia 8, são incluídos no grupo de risco intermediário. O IPSS inclui apenas um número limitado de alterações citogenéticas, incluindo apenas as 5 alterações citogenéticas mais comuns associadas à SMD. (APA; GUTZ, 2006; TEFFERI; VARDIMAN, 2009)

Tabela 1: Sistema Internacional de Escore Prognóstico (IPSS) para SMD.

Variáveis de prognóstico	Escore			
	0,0	0,5	1,0	1,5
Número de citopenias	0-1	1-2	-	-
Cariótipo	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 I	3,5
1,5-2,0	Intermediário II	1,2
≥2,5	Alto	0,4

Legenda: Citopenias nível de hemoglobina <10,0g/L, contagens de plaquetas <100X10⁹ e contagens absoluta de neutrófilos <1,8x10⁹L. Cariótipo: Bom-normal, anomalias isoladas: -Y, del (5q), del (20q); , Intermediário – outras alterações, Desfavorável-complexo ou anomalias cromossômicas 7. **Fonte:** (adaptado de JÄDERSTEN E HELLSTRÖM-LINDBERG, 2008)

Em 2005, Solé et al criaram após avaliação de uma série de marcadores prognósticos em 968 pacientes com SMD o Sistema de Escore do Grupo Cooperativo Espanhol de Citogenética Humana (Escore CGECGH). Nesse sistema de escore, foram considerados importantes preditores da sobrevida: idade (> ou < 60 anos), nível sérico da hemoglobina (> ou < 10g/dL), número de citopenias, subtipo FAB e citogenética. A grande contribuição deste sistema de escore CGECGH foi o refinamento da divisão de grupos citogenéticos propostos pelo IPSS (Greenberg et al, 1997). Foram adicionadas a del (11q) e del (12p) às alterações consideradas de bom prognóstico e o grupo intermediário passou a ser composto por pacientes com trissomia do cromossomo 8 (+8), rearranjos envolvendo a região 3q21q26, t(11q) e del (17p). No grupo de cariótipo desfavorável foi incluído o i(17q), o que costuma apresentar características de mieloproliferação com eosinofilia, basofilia e rápida transformação para LMA. Foi criado um grupo novo, composto por anormalidades isoladas e cariótipo com duas alterações na mesma metáfase.

Em 2005 foi criado sistema de escore em que a classificação da OMS foi considerada importante marcador de prognóstico (WPSS). Malcovati et al (2005) demonstraram que o subtipo da OMS (AR, ARSA, Sd.5q- x CRDM, CRDM-AS x AREB 1 x AREB II), a dependência transfusional e a citogenética (subgrupos do IPSS) eram capazes de prever a sobrevida e a probabilidade de transformação leucêmica de pacientes com SMD. (Tabela 2 e 3)

A tabela 4 traz de forma evolutiva toda classificação que envolve a Síndrome Mielodisplásica..

Tabela 2 - Fatores prognósticos de acordo com a classificação WPSS – associação entre OMS, cariótipo e dependência transfusional.

Variáveis	Escore			
	0	1	2	3
Classificação OMS^I	AR, ARSA, 5q-	CRDM, CRDM-SA	AREB-1	AREB-2
Cariótipo^{II}	Favorável	Intermediário	Desfavorável	-
Dependência Transfusional^{III}	Não	Regular	-	-
Escore total	Grupo de Risco			
0	Muito baixo			
1	Baixo			
2	Intermediário			
3-4	Alto			
5-6	Muito alto			

^I **Legenda:** AR = anemia refratária; ARSA = anemia refratária com sideroblastos em anel; 5q- = síndrome mielodisplásica com deleção 5q isolada e blastos na medula <5%; CRMD-SA, citopenia refratária com displasia multilineagem e sideroblastos em anel; AREB-1 = anemia refratária com excesso de blastos-1; AREB-2= anemia refratária com excesso de blastos-2.

^{II} Cariótipo: bom= normal, -Y, del(5q), del(20q); desfavorável= complexo (≥ 3 alterações), alterações do cromossomo 7; e intermediário= demais alterações.

^{III} Dependência transfusional foi definida como havendo pelo menos uma transfusão de hemácias a cada 8 semanas num período de 4 meses.

(adaptado de SCOTT;DEGG 2010)

Tabela 3: Taxa de sobrevida e transformação em leucemia mielóide aguda das SMD de acordo com os subtipos da classificação da OMS

Subtipos de SMD	Sobrevida média (anos)	Evolução para LMA (%)	Índice IPSS (% em cada categoria)
AR	5,7	7,5	Baixo (57) Intermediário -1 (33) Intermediário-2 (10) Alto (0)
ARSA	5,7	1,4	Baixo (96) Intermediário-1 (4) Intermediário-2 (0) Alto (0)
Síndrome 5q-	9,7	8	Baixo (61) Intermediário- 1 (30) Intermediário-2 (9) Alto (0)
CRDM	2,7	10	Baixo (55) Intermediário-1 (40) Intermediário-2 (5) Alto-(0)
CRDM-SA	2,6	13	Baixo (58) Intermediário-1 (36) Intermediário-2 (8) Alto (0)
AREB-1	1,5	21	Baixo- (0) Intermediário-1 (33) Intermediário-2 (55) Alto- (12)
AREB-2	0,8	34,5	Baixo- (0) Intermediário-1 (0) Intermediário-2 (25) Alto- (75)

Fonte: Adaptado de NAEIM et al, 2008

Tabela 4 – Evolução na classificação da Síndrome Mielodisplásica

FAB (1982)	OMS (2001)	OMS (2008)	Displasia-Linhagem (OMS 2008)	% Blastos MO	% Blastos SP
AR	AR	CRDU			
	SMD-U	AR	Eritróide	< 5	< 1
	CRDM	NR / TR	Não Eritróide	< 5	< 1
	del 5q-	CRDM	Eritróide + outra	< 5	< 1
		del 5q isolada	Eritróide + mega	< 5	< 1
		SMD-U	Unilinhagem + pancito ou CRDM/CRDU com 1% de blastos no SP	< 5	< 1
ARSA	ARSA	ARSA	Eritróide*	< 5	< 1
	CRDM-SA		*>15% sideroblastos em anel	< 5	< 1
AREB	AREB-I	AREB-I	≥ 1 linhagem	5-9	2-4
	AREB-II	AREB-II	≥ 1 linhagem	10-19	5-19
AREB-t	LMA	LMA	Mielóide + outra	≥20	
LMMC	SMD/DMP	SMD/NMP	Variável (monocitose >1 x 10 ⁹ /L)	<20	
	LMMC	LMMC			
	LMMJ	LMMJ			
	LMCa	LMC BCR/abl			
	SMD/DMP-U	neg			
		SMD/NMP-U			

Legenda: AR (Anemia Refratária), ARSA (Anemia refratária com sideroblastos em anel), AREB (Anemia refratária com excesso de blastos), AREB-t (AREB em transformação), LMMC (Leucemia Mielomonocítica Crônica), SMD-U (SMD inclassificável), CRDM (citopenia refratária com displasia de multilinhagem), del 5q (deleção 5q isolada), CRDM-AS (CRDM com sideroblastos em anel), LMA (Leucemia mielóide aguda), SMD/DMP (SMD/doenças mieloproliferativas), LMMJ (Leucemia mielomonocítica juvenil), LMCa (Leucemia mielóide crônica atípica), SMD/DMP-U (SMD/ doenças mieloproliferativas inclassificáveis), CRDU (citopenias refratárias com displasia unilinhagem), NR (neutropenia refratária), TR (trombocitopenia refratária), SMD/NMP (SMD/neoplasias mieloproliferativas), SMD/NMP-U (SMD/neoplasias mieloproliferativas inclassificáveis).

Fonte: Adaptado de Komrokji, Zhang e Bennett (2010).

Uma série de outros marcadores de evolução têm sido apresentados em SMD como dosagem da enzima desidrogenase láctica (Mufti et al, 2005), a dependência transfusional (Malcovati et al, 2005) e o grau de apoptose (Shimazaki et al, 2002), porém o cariótipo tem sido considerado o marcador isolado de maior valor preditivo da evolução clínica dos pacientes com SMD (GREENBERG et al, 1997; MUFTI et al, 2005).

Recentemente, SCHANZ et al (2012) refinaram a estratificação citogenética, criando novos grupos de impacto prognóstico. Nesse estudo foram incluídos 2902 pacientes oriundos de quatro centros de referência internacionais (grupo alemão-austríaco de estudo em SMD, grupo espanhol de citogenética em SMD, IMRAW e o grupo internacional de citogenética em SMD). A nova proposta foi validada pelo Centro de Câncer MD Anderson (Texas-EUA) em um estudo coorte com 1632 pacientes portadores de SMD primária não tratados.

Shanz e colaboradores (2012), demonstraram a importância das alterações citogenéticas encontradas e classificaram essas alterações em 5 subgrupos: muito bom prognóstico (del(11q), -Y); bom prognóstico (normal, del(12p), del(20q), del(5q) isolada ou com 1 alteração adicional); cariótipo intermediário (del(7q), +8, i(17q), +19, +21, clones com 1 alteração (exceto as mencionadas como bom prognóstico), clones com 2 alterações (exceto del(5q)+1; cariótipo desfavorável (inv(3)/t(3q)/del(3q), monossomia do cromossomo 7, -7/del(7q) com 1 alteração adicional, cariótipo complexo com 3 alterações) e muito desfavorável (cariótipo complexo >3 alterações), com sobrevida média de 60.8, 48.6, 26, 15.8 e 5.9 meses, respectivamente(Quadro 1)

Os dados deste estudo mostraram que a deleção da região 7q é mais favorável, quando comparada com perda de todo o cromossomo 7, no que diz respeito à sobrevida média e ao risco de transformação para LMA. SHANZ et al (2012) demonstraram que os cariótipos complexos com 3 alterações apresentaram diferença significativa em relação ao prognóstico quando comparados com os casos com mais de 3 alterações.

Este novo modelo de prognóstico, noventa e um por cento de todos os pacientes podem ser estratificados, aumentando o poder de predição do risco citogenético.

Quadro 1: Nova proposta de estratificação citogenética.

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

Legenda: NA= não alcançado

Fonte: Adaptado de SCHANZ et al (2012)

1.3.1 Índice Internacional de Escore Prognóstico Revisado (IPSS-R)

O Sistema de Escore de Prognóstico Internacional (IPSS), tem sido importante na avaliação prognóstica de pacientes adultos, virgem de tratamento e com SMD primária. No entanto, uma vez publicado no ano de 1997, modificações em parâmetros existentes e uma melhor avaliação prognóstica e estratificação dos pacientes tem sido sugerido e motivo de pesquisa no meio científico.

Para avaliar o impacto dessas novas variáveis clínicas e citogenéticas no prognóstico dos pacientes com SMD, objetivando o refinamento desse escore, um grupo de investigadores de várias instituições, incluindo aí o Brasil, intitulado por Grupo de Trabalho Internacional para Prognóstico em SMD, (GTI-PM) forneceram uma base de dados combinada com um número substancialmente maior de pacientes em comparação ao IPSS primário. (GREENBERG, P. L. et al., 2012)

Os objetivos do Grupo de Trabalho foi refinar o IPSS através da reavaliação das características clínicas principais desse escore, determinando o impacto clínico no valor prognóstico e incorporar um número maior e mais diferenciado de subgrupos citogenéticos. (GREENBERG, P. L. et al., 2012)

Esta maior base de dados combinada permitiu uma melhor análise específica das variáveis existentes no escore como: porcentagem de blastos na medula óssea, número, quantidade de citopenias e estudo de subgrupos citogenéticos raros.

Um número total de 7012 pacientes de múltiplas instituições foram avaliados pelo grupo de trabalho (GTI-PM). A média de idade foi de 71 anos, 77% eram maiores de 60 anos, a taxa de masculino sobre feminino era de 1.5:1 e o seguimento foi de 3.9 anos. Os 7012 pacientes obtidos foram avaliados e classificados pela FAB (n=7000, 99,8%) e adicionalmente pela OMS. Como no IPSS primário, o estudo citogenético medular, a porcentagem de blastos na medula, e o número de citopenias foram consideradas como base desse novo sistema prognóstico (IPSS-R), visto o peso estatístico dessas variáveis no desfecho ou evolução clínica dos pacientes, quando comparadas com outras. (GREENBERG, P. L. et al., 2012)

Em ordem decrescente a cinco principais variáveis que fazem parte deste revisado índice prognóstico são: Grupo de risco Citogenético, Porcentagem de blastos em Médula e a quantidade de Citopenias (Hemoglobina, Plaquetas e Quantidade de Neutrófilos). Os novos componentes inclusos são: 5 em vez de 3 na Categoria/Escore de Risco Prognóstico. Na variável clínica Porcentagem de Blastos Medular houve

modificação na categoria menos de 5% de Blasto Medular, onde a mesma foi subdividida entre 0-2, maior que 2 e menor que 5%. Pacientes que apresentavam 10% de Blastos continuaram pertencentes à mesma categoria. Outra variável reavaliada foi a Citopenias, onde foram criados pontos de corte com relevância clínica e avaliados não somente a quantidade de citopenias observadas. (Tabela 5a e Tabela 5b) (GREENBERG, P. L. et al., 2012)

Quanto à classificação Citogenética dos subgrupos recentemente introduzidos, foi demonstrado boa correlação entre a taxa de risco versus sobrevida global e evolução para LMA. Devido ao maior número de pacientes foi possível analisar uma maior quantidade de subtipos citogenéticos em comparação ao IPSS primário (15 X 6) (Tabela 6).

O IPSS revisado traz alterações importantes com diferenças significativas em relação a variável prognóstico: Esse novo modelo reclassifica o achado de cariótipo complexo e do cromossomo 7. O IPSS-R acrescentou à inclusão de novas alterações citogenéticas específicas em diferentes subgrupos incluindo: inversão do cromossomo 3, translocação do 3q, deleção do 3q, deleção 11q, deleção 12p, inversão do 17q, duas alterações incluindo a del (5q), duas alterações incluindo del (7q) ou monossomia do 7.

Tabela 5ª: IPSS REVISADO

Variável/ pontuação	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		5 a 10	> 10	
Hb (g/dL)	≥ 10		8 as < 10	< 8			
Neutrófilos (cél/mm³)	≥ 800	< 800					
Plaquetas (cél/mm³)	≥ 100.000	50.000 a 100.000	< 50.000				

Legenda: * 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 anormalidade

Tabela 5b: IPSS-R – Classificação de risco e pontuação

Classificação de risco	Pontuação	Sobrevida Média (anos)	Tempo médio para evolução para LMA (anos)
Muito baixo	≤ 1,5	8,8	> 14,5
Bom	> 1,5 a 3,0	5,3	10,8
Intermediário	> 3,0 a 4,5	3,0	3,2
Alto	> 4,5 a 6	1,6	1,4
Muito alto	> 6	0,8	0,7

Tabela 6: Sistema de classificação de acordo com o risco citogenético.

Prognóstico Grupos % Pacientes	Alteração Citogenética	Sobrevida Anos	Evolução Para LMA	Taxa Hazard OS/LMA
Muito Bom (4%/3%)	-Y, del (11q)	5.4	NR	0.7/0.4
Bom (72%/66%)	Normal, del (5q), del(12p), del (20q), duas alterações incluindo del (5q)	4.8	9.4	1/1
Intermediário (13%/19%)	del(7q), +8, +19 i(17q), e outro....	2.7	2.5	1.5/1.8
Ruim (4%/5%)	-7, inv(3)/t(3q)/del(3q) Complexo: 3 alterações	1.5	1.7	2.3/2.3
Muito Ruim (7%/7%)	Complexo: > 3 alterações	0.7	0.7	3.8/3.6

Legenda: NR- Não alcançado

Análise Multivariada com (n =7012 pacientes)

Análise do ponto de corte na quantidade de blasto medular é outra diferença importante, essa variável apresentou diferenças significativas em relação a sobrevida e a evolução para LMA. Um dado importante é que aqueles pacientes que apresentam uma quantidade de blastos > 10 e ≤ 20 e >20 e ≤30 apresentaram uma taxa de risco similar em relação a sobrevida e evolução para LMA. Assim, o grupo de trabalho associou essas duas categorias. Outra alteração importante ocorreu na variável citopenias. Os

relevantes pontos de corte foram: Valor da hemoglobina <8 , $8-10$ e ≥ 10 , plaquetas com valores <50 , $50-100$ e ≥ 100 e a quantidade de neutrófilos de <800 e ≥ 800 .

Outros marcadores prognóstico já foram estudados, apesar de o seu impacto no escore prognóstico comparado com a cinco maiores variáveis, assim como a idade foram considerados relativamente baixo, entre estes podemos citar: Ferritina, LDH, B2-Microglobulina e Estados Performance. Nenhum desses marcadores foi estatisticamente significativos em prever evolução para LMA. (BEJAR, 2013)

Um sumário do refinamento do IPSS é mostrado na tabela abaixo. (Tabela 7).

Tabela 7: Sumário do Refinamento do IPSS-R

1. Quantidade de Blastos em Médula Óssea
$\leq 2\%$, $>2\%$ - $<5\%$, $5\%-10\%$ $>10\%-30\%$
2. Alterações Citogenéticas e Grupos de Risco
16 versus 6 alterações específicas, 5 versus 3 subgrupos
3. Avaliação da quantidade de Citopenias
Clinicamente e estatisticamente usado relevantes pontos de corte
4. Inclusão de diferentes Marcadores Prognóstico
Idade, Ferritina Sérica, LDH, Estados Performance, B2- Microglobulina
5. Categorias/Escore de Risco Prognóstico com 5 categorias
Maior valor preditivo

1.5 Citogenética clássica (cariótipo por banda-G) em síndrome mielodisplásica.

O câncer é uma doença genética caracterizada por alterações genômicas, ao nível gênico, cromossômico, ou de ambos. As neoplasias podem desenvolver-se a partir de uma predisposição genética constitucional seguida de mutações somáticas adquiridas ou de um acúmulo de mutações somáticas que levam ao desenvolvimento do fenótipo neoplásico. As alterações cromossômicas características fornecem informação quanto ao diagnóstico, prognóstico e/ou tratamento para muitos cânceres sendo por isso verdadeiros biomarcadores do câncer humano. Malcovati e Nimer, 2011)

Nas SMD têm sido descritas diversas alterações citogenéticas recorrentes, cuja detecção pode facilitar o diagnóstico, prognóstico, seguimento e tratamento dos doentes,

no entanto, nenhuma anomalia cromossômica é patognomônica destas doenças (MALCOVATI e NIMER, 2008) A presença de alteração citogenética caracteriza um clone e ajuda na definição de SMD em oposição a outros quadros de displasias medulares não clonais.

As anormalidades cromossômicas são observadas em 15% a 60% dos casos de SMD primária. As alterações numéricas são as mais frequentes e os cromossomos 5,7 e 8 são envolvidos em 50% dos casos anormais, enquanto nas SMD secundárias estas alterações são observadas em cerca de 95% dos casos. (Tabela 8). As alterações cromossômicas mais comuns associadas à SMD incluem deleção do braço longo do cromossomo 5 [del(5q) ou 5q-], monossomia 5 (-5), deleção do braço longo do cromossomo 7 [del(7q) ou 7q-], monossomia 7 (-7), trissomia 8 (+8), deleção do braço curto do cromossoma 20 [del (20q) ou 20q-] e nulissomia do Y (-Y). (Keen-Kim *et al.*, 2008; Haase, 2008)

Deleções cromossômicas são as anomalias mais comuns nas SMD primárias ou secundárias, sendo observadas em quase 50% dos casos. As deleções são geralmente intersticiais e ocorrem frequentemente nos cromossomas 5q, 7q, 20q, 11q, 13q, 12p e 17p. As monossomias mais comuns nas SMD envolvem os cromossomas 5, 7 e Y. Embora as translocações equilibradas sejam alterações relativamente comuns em doenças mielóides, notadamente na LMA, são muito raras nas SMD. (Cherry *et al.*, 2003; Keen-Kim *et al.*, 2008; Skonieczka *et al.*, 2009)

A frequência das anomalias citogenéticas aumenta com a gravidade e risco de transformação leucêmica, sendo de 15-20% nos subtipos de iniciais e de 75% nos subtipos avançados (Anemia Refratária com Excessos de Blastos (AREB)).

Tabela 8: Frequência de alterações citogenéticas em pacientes com SMD *de novo* e SMD secundária.

	Anomalia	Frequência
SMD primárias	-5/5q-	10-20%
	+8	10%
	-7/7q-	5-10%
	-Y	10%
	17p-	7%
	20q-	5%
	t(11q23)	5-6%
	Cariótipos Complexos	10-20%
SMD secundárias	-5/5q- ou -7/7q-	90%
	+8	10%
	t(11q23)	3%
		Cariótipos complexos

Fonte: Adaptado de Pedrsen- Bjergaard et al (2007)

Ficou evidente que a incidência de anormalidades cromossômicas em pacientes com SMD é variável a depender do grupo de indivíduos sob estudo (alto risco X baixo risco), possivelmente com influência da etnia e distribuição geográfica.

Pouca atenção tem sido dada ao papel das alterações citogenéticas durante o seguimento de pacientes com SMD. MICHALOVA et al (2002) realizaram estudos consecutivos de cariótipo (média de três estudos por caso) em 77 pacientes e encontraram novas anormalidades cromossômicas em 36 (46%) dos pacientes durante o curso da doença. STEIDL et al (2005) avaliaram por meio de um estudo retrospectivo, as alterações citogenéticas em 557 pacientes que possuíam pelo menos duas a oito avaliações de cariótipo realizados durante o seguimento. Foi encontrada evolução de cariótipo em 27% dos casos (evolução de cariótipo = a presença de alterações citogenéticas adicionais ao clone inicial e/ou aumento de clone em mais de 20% das metáfases e/ou desenvolvimento de um clone aberrante após um mosaico inicial. Dentre as alterações adicionais encontradas, as mais frequentes foram relacionadas à -7del (7q).

Uma importante conclusão obtida neste trabalho foi o achado de que pacientes com evolução de cariótipo apresentaram menor sobrevida.

SMD é geralmente diagnosticada através de técnica envolvendo citogenética tais como a citogenética clássica (bandamento G). Esta técnica está baseada na necessidade de análise de metáfases. Alguns investigadores supõem que a frequência de anormalidades cromossômicas em SMDs é subestimado devido à não proliferação de clones em meios de cultura, reduzindo-se assim, a possibilidade de se detectarem anormalidades pela banda G. Tem sido proposto que clone oculto não detectado por citogenética convencional podem está envolvido na progressão para leucemia aguda em casos de SMD com cariótipo normal. Baseando-se nessa idéia, pesquisadores têm utilizado a técnica FISH para pesquisar lesões oculta, alterações cromossômicas em interfase com sondas específicas para determinadas regiões dos cromossomos mais comumente envolvidos em SMD. (GRAUBERT; WALTER, 2011; HIRAI, 2003; MUFTI, 2004)

1.6 Citogenética molecular (FISH) em Síndrome mielodisplásica

Hibridização *in situ* por fluorescência (FISH) é a técnica citogenético-molecular que utiliza sondas, ou seja, seqüências de DNA, complementares ao que se pretende estudar. Através da FISH, sondas marcadas com fluorocromos possibilitam a detecção de *loci* ou translocações tanto no cromossomo metafásico quanto interfásico.

A criação de sondas de DNA marcadas com fluorocromos e visíveis à imunofluorescência foi um importante passo para o desenvolvimento da citogenética molecular. Desde então, uma série de sondas de DNA de hélice única ou dupla têm sido utilizadas para a pesquisa de alterações citogenéticas pela técnica (FISH).

Tem sido proposto que clones ocultos não detectados pela citogenética convencional podem estar envolvidos na progressão à leucemia aguda em casos de SMD com cariótipo normal, e que outras técnicas mais sensíveis, tal como hibridização *in situ* por fluorescência seria necessária para a detecção de tais lesões.

O uso desta técnica em SMD tem um papel complementar ao bandamento G no que tange à detecção das anormalidades cromossômicas. O resultado de FISH deve ser expresso de acordo com a nomenclatura estabelecida, isto é, a International System for Chromosome Nomenclature (ISCN).

Vários estudos comparativos, nesses últimos anos, tem sido realizados entre a citogenética convencional e FISH durante o desenvolvimento da doença. ROMEO et al avaliaram 40 pacientes com SMD analisando o cariótipo pela banda G e simultaneamente por FISH com sondas para as seguintes regiões: -5/5q-, -7/7q-, +8, 11q23 e -Y. Ao compararem os resultados alcançados pelas duas técnicas, as anormalidades citogenéticas foram encontradas pelos dois métodos em dez casos, somente pelo cariótipo em dois e apenas pela técnica FISH em quatro. A hibridização *in situ* por fluorescência apresentou-se como benefício para 10% dos pacientes, pois permitiu a detecção de clone anormal em 3/22 casos que apresentavam cariótipo normal pela banda G e em 1/6 casos que se apresentaram sem metáfases. (ROMEO et al, 2002, LEVSKY et al, 2003, YILMAZ et al, 2005)

Um estudo bastante similar foi realizado posteriormente pelo Grupo Cooperativo de Oncologia do Leste dos Estados Unidos da América (Eastern Cooperative Oncology Group- ECOG) (CHERRY et al, 2003), no qual foram avaliados 48 pacientes com SMD, sendo (43 de baixo risco e cinco de alto risco) como o mesmo painel de sondas utilizado por Romeo et al (2002) , mais adicionado da pesquisa de del(13q). A FISH só permitiu benefício adicional para um caso, sendo uma deleção oculta no cromossomo 11, cujo cariótipo por banda G se apresentava normal.

Panani et al (2008) estudaram a incidência da trissomia do cromossomo 8 em 30 pacientes com SMD primária usando a FISH e bandamento G. A superioridade da citogenética Molecular sobre a citogenética Clássica foi detectada em somente 3 (10%) dos casos.

Chen (2003) e colaboradores observaram que a FISH foi superior sendo capaz de detectar -5/5q- em 5 de 30 casos, -7/7q- em 3 casos e trissomia do 8 em 5 casos.

Rigolin et al (2001) avaliaram a combinação de banda G e FISH (sondas para -5/5q-, -7/7q-, +8 e 17p-) em 101 pacientes com SMD, estudo esse que permitiu detectar alterações em 18 casos, cujos cariótipos por banda G se apresentavam normais. Nesse trabalho, a FISH resultou em um benefício adicional de 17%, dado bem superior aqueles publicados por ROMEO et al e CHERRY et al (2003). A diferença encontrada no benefício da FISH nesses trabalhos pode estar relacionada ao maior número de pacientes na categoria de alto risco estudada por RIGOLIN et al (2001), o que explicaria a presença de um maior número de alterações citogenéticas nesse grupo.

Ylmaaz et al (2005) utilizaram um painel de sondas para a detecção de 5/5q- e -7/7q- em 26 pacientes (24 de baixo risco e dois de alto risco) com SMD, demonstrando

que pela FISH foram detectadas alterações em 23% dos casos cuja banda G se encontrava normal.

Com base no exposto acima, as pesquisas demonstram a amplitude de variação do benefício da FISH nos casos de SMD, onde o uso desta técnica deve ser empregada principalmente em casos selecionados onde opções terapêuticas específicas devem ser consideradas.

Foi postulado que os clones detectados através da hibridização *in situ* por fluorescência, em pacientes com cariótipo normal, poderiam ser responsáveis pela rápida evolução para LMA. Trost et al (2004), avaliaram 31 pacientes com SMD de alto risco com cariótipo normal e em diferentes estágios da doença. Um total de 44 amostras foram avaliadas e assim distribuídas: 11 no diagnóstico de SMD, duas (duas vezes) durante o acompanhamento da SMD, oito amostras ao diagnóstico de SMD e LMA, oito na transformação em LMA/SMD e sete amostras (duas vezes) durante tratamento da LMA. Foram utilizadas sondas para -5/5q-, -7/7q- e +8. Encontraram no grupo de pacientes de alto risco, (5/31) 16% de alterações cromossômicas. Deleção do cromossomo 5 foi detectada em um caso de LMA após recaída. A monossomia do cromossomo 7 esteve presente em quatro amostras (dois casos de SMD testados só após a transformação para LMA). Diante do baixo número de detecções neste grupo de pacientes de alto risco, o significado clínico da monossomia do cromossomo 7 pelo uso da FISH (em interfase) permaneceu indeterminado.

Resultado bastante similar foi anteriormente apresentado pela pesquisa de Ketterling et al (2002) que encontraram em quatro pacientes com SMD a monossomia do cromossomo 7 dentre os 123 casos estudados. O valor prognóstico desta alteração também ficou indeterminado.

Trost et al (2004) sugeriram que um estudo evolutivo feito com amostras de medula óssea coletadas em prazos previamente determinados poderia caracterizar melhor o papel destas alterações (só detectadas através da FISH) no prognóstico de pacientes com SMD e cariótipo normal.

A importância das alterações cromossômicas como fator prognóstico em SMD já está bem estabelecida, porém atualmente não se sabe se as alterações cromossômicas detectadas em SMD são eventos iniciais que levam ao desenvolvimento da doença (causa) ou se são apenas fenômenos secundários (consequência), de qualquer forma, elas apontam que, em nível molecular, há uma série de aspectos ainda por serem entendidos. (BEJAR, 2013)

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Estudar as alterações citogenéticas clássicas e moleculares em pacientes com Síndrome Mielodisplásica (SMD)

2.2 Objetivos específicos

- 1) Detectar as alterações cromossômicas pelo estudo do cariótipo por banda G em pacientes com SMD;
- 2) Avaliar o efeito adicional da Citogenética molecular (Hibridização in situ por Fluorescência- FISH) em relação à citogenética clássica com baixo índice mitótico
- 3) Avaliar a associação das alterações cromossômicas com as características clínicas/laboratoriais (número de displasias, dependência transfusional, celularidade, fibrose e sobrevida) da doença.

3. PACIENTES, MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Pacientes

Foram incluídos no estudo um total de 138 pacientes, de ambos os sexos, com diagnóstico de Síndrome Mielodisplásica (SMD), segundo os critérios da OMS, recentemente diagnosticados e regularmente inscritos no ambulatório de Hematologia do Hospital Walter Cantídeo/Universidade Federal do Ceará e do Hospital Geral de Fortaleza, no período de março de 2008 a junho de 2014. Todos os pacientes foram previamente submetidos ao protocolo de exclusão durante investigação da doença. (Quadro 2)

Quadro 2- Protocolo de exclusão de causas não clonais que, com frequência, cursam com citopenias e/ou dispoeses na médula. Protocolo aplicado a pacientes que encontram-se sob investigação de SMD

Deficiências nutricionais: vitamina B12 e ácido fólico

Exposição recente a agentes tóxicos: metais pesados, benzeno e derivados do petróleo

Exposição recente a drogas citotóxicas e fatores de crescimento

Disfunções endócrinas

Etilismo

Disfunções metabólicas: doença hepática crônica e insuficiência renal

Doenças inflamatórias crônicas

Infecções virais: SIDA, hepatites, CMV, toxoplasmose, parvovírus B19

Doenças auto-ímmunes

Fonte: Magalhães e Lorand-metze (2004)

Todos os indivíduos incluídos neste estudo foram informados sobre os objetivos e metodologia da pesquisa, e aqueles que concordaram em participar assinaram o termo de consentimento livre-esclarecido.

3.2 Coleta das amostras

As amostras de medula para avaliação do cariótipo por banda G e FISH, foram coletadas em tubos 15x75 mm, após consentimento informado. O estudo do cariótipo por banda G foi realizado à época das coletas. As amostras para realização da FISH foram estocadas em solução de Carnoy, a -20°C.

Os critérios de inclusão e exclusão utilizados no presente estudo estão descritos na Tabela abaixo.

Tabela 9: Critérios de inclusão e exclusão

Critérios de Inclusão	Critérios de exclusão
Ter realizado os exames investigativos Amostras de pacientes com idade menor na medula óssea (mielograma, bópsia de medula óssea e citogenética).	Amostras de pacientes com idade menor do que 18 anos
Ter diagnóstico confirmado de SMD	Amostras de pacientes que apresentem alguma condição clínica presente ao protocolo de exclusão

3.3 Citogenética clássica

A citogenética clássica por banda G foi realizada no Laboratório de Citogenômica do Câncer (Universidade Federal do Ceará – UFC). O bandamento G foi realizado de forma habitual (CHAUFFAILLE e cols. 1997), isto é a medula óssea foi colhida em heparina e de forma estéril foi dividida em dois frascos contendo 7 mL de meio RPMI 1640 (pH 7,0) suplementado com L-glutamina e 3 mL de soro fetal bovino. As culturas foram incubadas em atmosfera umidificada a 5% de CO₂ a 37°C durante 24hs. Uma hora antes do término da cultura foram adicionados 70 uL de colchicina (Colcemid®), por 30 minutos. Em seguida, o material foi centrifugado e ressuspensão em solução hipotônica de KCl 0,075 M e lavado com solução fixadora (solução de ácido acético e metanol, proporção 3:1), por 4 vezes. Para confecção das lâminas para análise, o material foi gotejado em lâminas de microscopia e secado ao ar. O

bandamento foi realizado pela técnica de tripsina-Giemsa (GTG) com kit Panótico. Foram analisadas pelo menos 20 mitoses e os cromossomos classificados de acordo com o Sistema Internacional de Nomenclatura Citogenética Humana (ISCN). As metáfases foram capturadas e analisadas em sistema computadorizado (Cytovision ®) com software para cariotipagem e o cariótipo digitalizado.

3.4 Hibridização *in situ* por fluorescência (FISH)

A citogenética molecular pela técnica de FISH foi realizada no Laboratório de Citogenômica do Câncer da Universidade Federal do Ceará-UFC.

Essa técnica foi aplicada especificamente para casos selecionados que apresentavam baixo índice mitótico à metodologia convencional. Considerou-se como baixo índice mitótico o valor de pelo menos 10 interfases ao bandamento G.

Para a FISH foram utilizadas sondas para centrômero do 8 (p11.1-q11.1) (SE8 LTE 008 - Aquarius, Cytocell Ltd, Cambridge United Kingdom), regiões p15.31 e q31 do cromossomo 5 (del(5q) Deletion LPH 024, Aquarius, Cytocell Ltd, Cambridge United Kingdom), e para as regiões q22-q31 do cromossomo 7 (del(7q) Deletion LPH 025, Aquarius, Cytocell Ltd, Cambridge United Kingdom) seguindo-se as instruções do fabricante.

As lâminas foram preparadas 24h antes para o envelhecimento. O material fixado em solução de Carnoy e mantido a -20°C foi retirado do congelador e deixado em temperatura ambiente por três minutos e posteriormente gotejado nas lâminas de vidro com pipeta de ponta fina e secado ao ar ambiente. Quando necessário, foi realizada previamente nova lavagem com solução fixadora (solução de Carnoy). Após confecção das lâminas, a celularidade do material foi verificada em microscópio óptico, tomando-se o cuidado com a concentração da amostra para que as células não formassem grumos, o que prejudicaria a análise dos sinais fluorescentes.

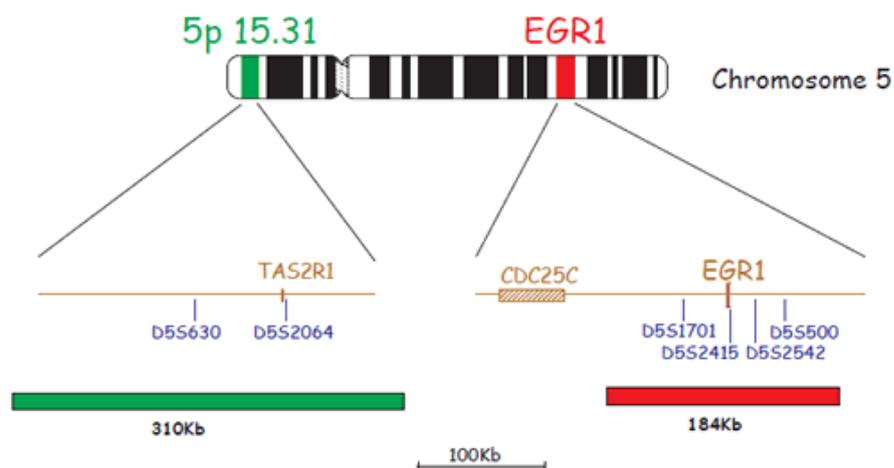
Inicialmente na etapa de Pré-tratamento, as lâminas foram submersas em solução SSC 2X por 15 minutos a 37° C. Em seguidas foram desidratadas em etanol (70%, 85% e 100%) e secadas por 1 minuto a temperatura ambiente. Para a desnaturação do DNA tumoral, as lâminas foram incubadas em solução de formamida 70% /SSC 2X, a 73°C, por dois minutos. A sonda a ser utilizada também passou por processo de desnaturação, sendo aquecida em banho-maria a 37°C por 10 minutos. Após a desnaturação,

adicionou-se 5 uL da sonda sobre a lâmina com DNA tumoral, cobrindo-o com lamínula. A lâmina foi então aquecida em uma placa aquecedora por 2 minutos a 75°C, e em seguida transferidas para câmara úmida e incubadas a 37°C, por 12 horas.

Após a hibridização da sonda com o DNA tumoral, as lamínulas foram removidas e as lâminas lavadas em solução de NP40 0,3%/SSC 0,4X a 72°C, por dois minutos, em seguida foram desidratadas novamente em etanol (70%, 85% e 100%). Depois de secadas à temperatura ambiente, adicionou-se 15 uL de contra-corante DAPI (4,6 diamidino-2-phenylindone-dihydrochloride).

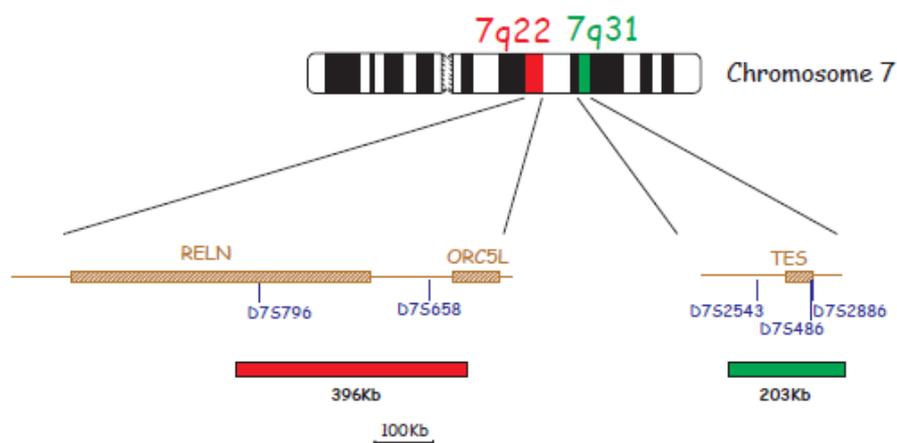
A sonda para a região 5q liga-se a duas regiões do cromossomo 5: região 5p15.31 (sinal verde) e a região EGR1 (sinal vermelho) (Figura 3). Utilizou-se os filtros verdes (FITC), vermelho (Texas Red), azul (DAPI) e triplo para visualização dos sinais e da célula.

Figura 3: Sonda cromossomo 5 (5p15.31)/EGR1, Cytocell Diagnostics. Região alvo 5p15.31 (sinal verde) e região controle EGR1 (sinal vermelho)



A sonda para a região 7q liga-se a duas regiões do cromossomo 7: região 7q31 (sinal verde), a região 7q22 (sinal vermelho) (Figura 4). Utilizou-se os filtros verde (FITC), vermelho (Texas Red), azul (DAPI) e triplo para visualização dos sinais e da célula

Figura 4: Sonda cromossomo 7 (7q22/7q31), CytoCELL Diagnostics.
Região alvo 7q22 (sinal vermelho) e região controle 7q31



As células avaliadas foram divididas em:

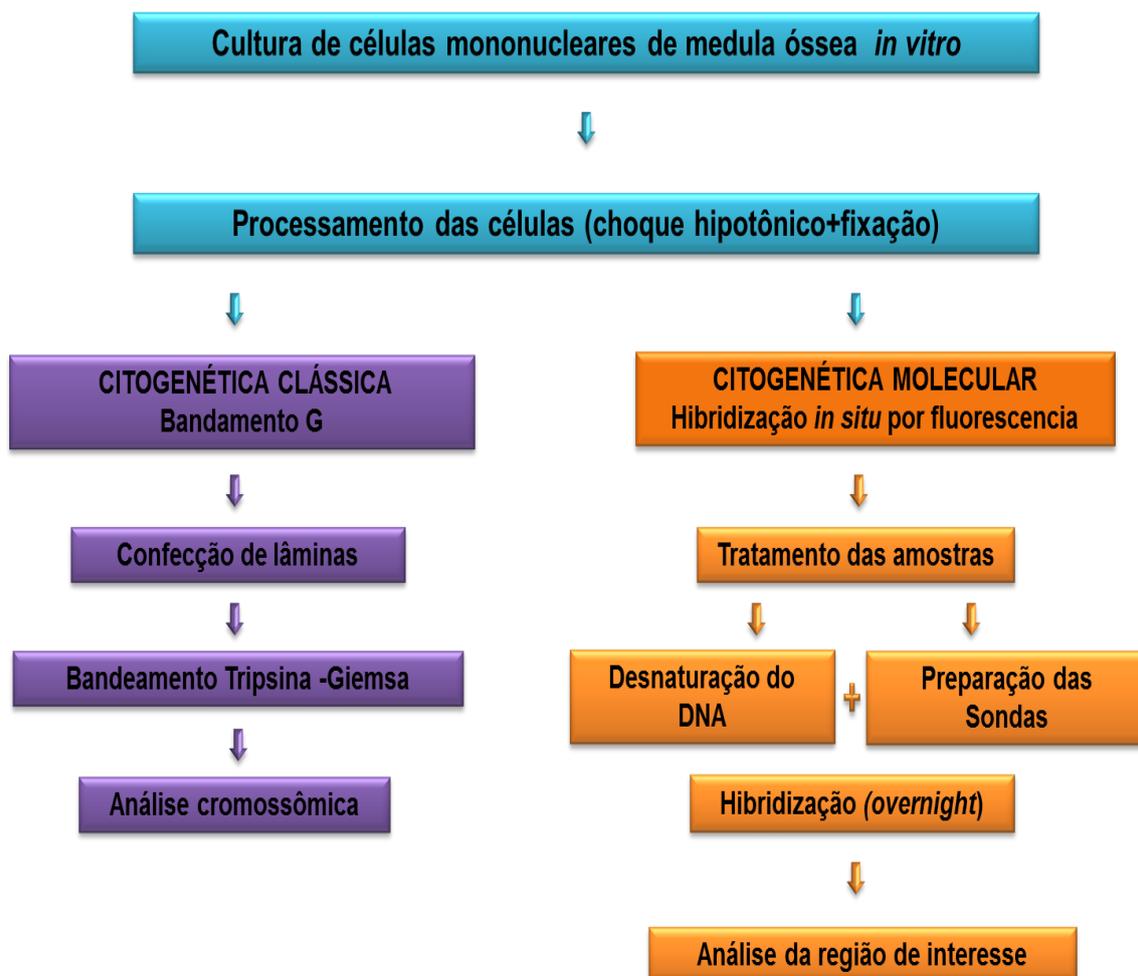
- 2 sinais vermelhos e 2 sinais verdes = normal
- ≥ 3 sinais vermelhos e o mesmo número de sinais verdes = polissomia do cromossomo em estudo
- ≥ 3 sinais verdes e 2 sinais vermelhos = amplificação
- 1 verde e/ou 1 vermelho = monossomia
- Ausência de sinal = falha de hibridização

A sonda 8q liga-se a região alfa satélite do cromossomo 8 (sinal vermelho). As células avaliadas foram divididas e realizado leitura da mesma forma anterior. Utilizou-se o filtro vermelho (Texas Red) para visualização dos sinais e da célula

Para todas as reações de FISH foi realizado controle normal proveniente de doadores de medula, após consentimento informado, cujos cariótipos, por banda G, foram normais. Estes mesmos controles foram utilizados para a definição de valores de normalidade, calculados a partir da média da soma de 200 células contadas. A média de cada alteração com dois DPs determinou os valores de normalidade.

A análise das lâminas foi feita em microscópio de epifluorescência da marca NIKON com os seguintes filtros: FITC, Texas red, DAPI e triplo. Este microscópio está acoplado a um sistema de captura de imagem (CytoVision®).

Figura 5: Representação esquemática da Metodologia



3.5 Análise estatística

Para avaliar o número de displasia, dependência transfusional, celularidade da médula óssea, subtipo de SMD primária, evolução para Leucemia Aguda, sobrevida baseada nos grupos citogenéticos, assim como sobrevida global é dependente do tipo de cariótipo (normal, alterado e sem metáfase), recorreu-se ao teste qui-quadrado de

independência, implementado no software de análise estatística SPSS, versão 17.0. Considerou-se uma probabilidade de erro de tipo I (α) de 0,05 em todas as análises inferenciais.

3.6 Aspectos éticos

O presente estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Universitário Walter Cantídio. CEP N° 10794913.2.0000.5045.

4 RESULTADOS

4.1 Características epidemiológicas dos pacientes

Dos 138 pacientes incluídos neste estudo, 4 (3%) foram classificados como SMD secundária ao tratamento e 134 (97 %) foram classificadas como SMD primária. Razão entre o sexo masculino e feminino foi 1,3:1 (Tabela 10).

Entre os pacientes com SMD primária, a maioria (65.72%) apresentou medula hiperclular.

Observou-se uma equivalência na variável displasia envolvendo 2 e 3 setores da medula óssea (38,41%) (Tabela 10).

Em relação à dependência transfusional, quando utilizado critério de 1 transfusão a cada 8 semanas durante o período de 4 meses (MALCOVATI et al. 2005) 52.2% dos pacientes mostraram-se dependentes transfusionais (Tabela 10).

O subtipo predominante foi CRDM (55.0%) seguido pelo subtipo ARSA (13.7%) (Figura 5). A maioria dos pacientes pertence aos grupos de menor risco, sendo 36.9 % (34/92) de baixo risco e 49.9% (45/92) de risco intermediário 1, segundo estratificação IPSS (1997) (Figura 6).

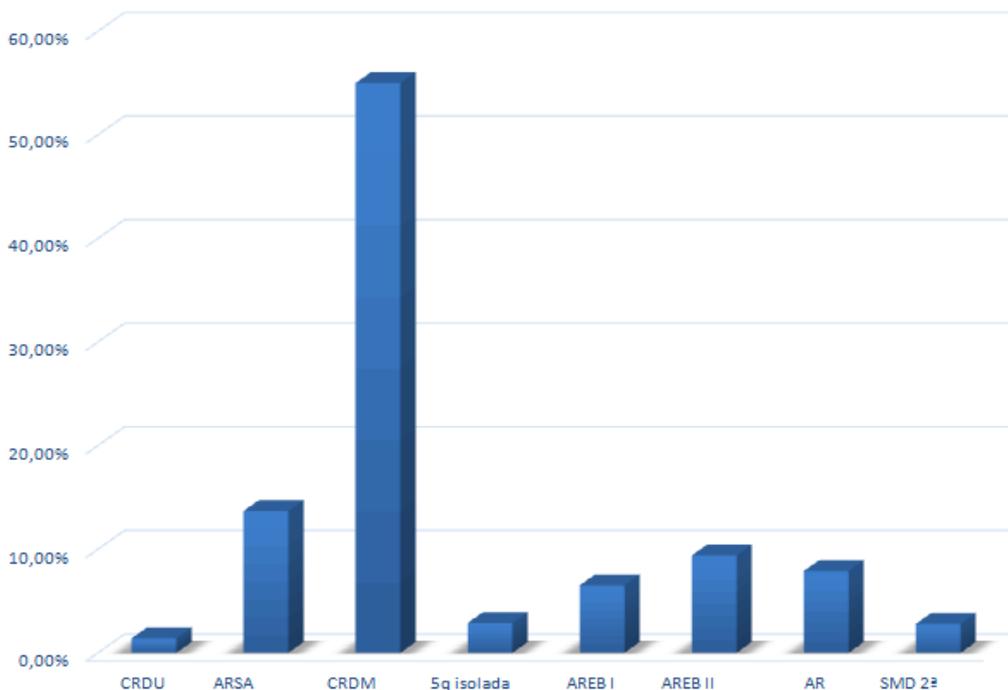
Tabela 10: Características dos pacientes portadores de SMD

Variáveis	N (%)	SMD1 ^a	SMD2 ^a
Idade/Sexo			
Média (anos)	65,9 (22-91)	65,9 (22-91)	75,0 (68-81)
≤60 anos	41/138 (29,7%)	41/134 (30,5%)	0/4 (0%)
>60 anos	97/138 (70,2%)	93/134 (69,4%)	4/4 (100%)
M/F	1,3:1		
Celularidade			
Hipocelular	17/105 (16,1%)	15/101 (14,8%)	2/4 (50,0%)
Normocelular	19/105 (18,0%)	18/101 (17,8%)	1/4 (25,0%)
Hiper celular	69/105 (65,7%)	68/101 (67,3%)	1/4 (25,0%)
Setor Displasia			
1	32/138 (23,1%)	31/134 (23,1%)	1/4 (25%)
2	53/138 (38,4%)	51/134 (38,0%)	2 /4 (50%)
3	53/138 (38,4%)	51/134 (38,0%)	1/4 (25%)
Distribuição OMS (2008)			
CRDU	2 /138 (1,4%)		
ARSA	19/138 (13,7%)		
CRDM	76/138 (55,0%)		
5q isolada	4/138 (2,89%)		
AREB I	9/138 (6,52%)		
AREB II	13/138 (9,4%)		
AR	11/138 (7,9%)		
SMD 2 ^a	4/138 (2,8%)		
Dependência transfusional (%)*			
SIM		69 /132 (52,2%)	
NÃO		63/132 (47,7%)	

SIM= 1 transfusão a cada 8 semanas durante período de 4 meses.

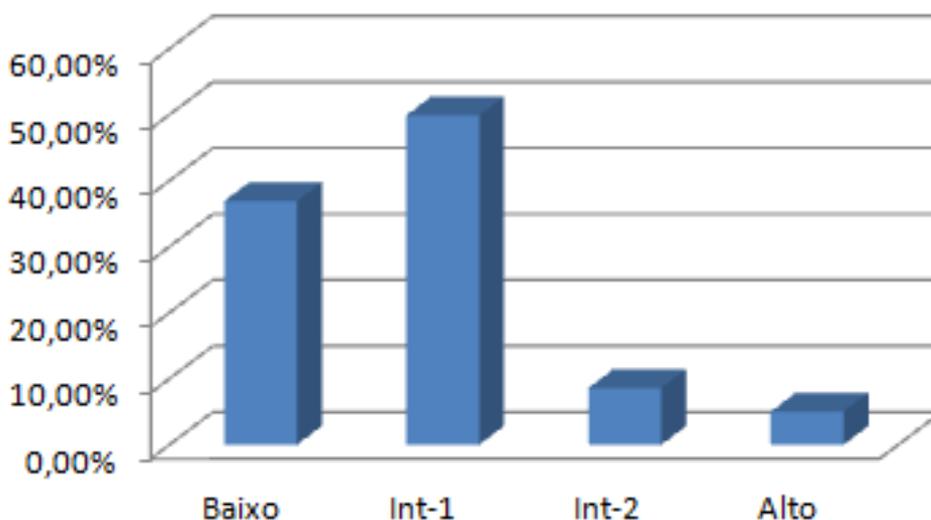
CRDU (Citopenia Refratária com Displasia Unilinhagem), ARSA (Anemia Refratária com Sideroblastos em Anel); CRDM (Citopenia Refratária com Displasia Multilinhagem); AREB I e II (Anemia Refratária com Excesso de Blasto); SMD2^a (SMD secundária).

Figura 5: Distribuição dos pacientes portadores de SMD, segundo classificação OMS (2008)



Legenda: CRDU (Citopenia Refratária com Displasia Unilinhagem); ARSA (Anemia Refratária Sideroblastos em Anel); CRDM (Citopenia Refratária com Displasia Multilinhagem); AREB I e II (Anemia Refratária com Excesso de Blasto); SMD^a (SMD secundária).

Figura 6: Distribuição dos pacientes portadores de SMD primária, segundo Sistema Internacional de Escore Prognóstico (IPSS-1997).



Legenda: INT-1= Intermediário 1, INT-2= Intermediário

4.2 RESULTADOS CITOGENÉTICOS

4.2.1 Análise Citogenética Clássica (banda G)

Foram obtidos resultados de citogenética em 99/138, caracterizando um percentual de resultado de (71,7%). Dentre os resultados foram detectados cariótipos normais em 56 casos e alterados em 43, perfazendo um percentual de (56,5%) normal e (43,4%) alterado respectivamente (Figura 8), dos quais 48,8% (21/43) apresentaram uma única alteração, 23,2% (10/43) apresentaram clones com duas alterações e 27,9% (12/43) apresentaram cariótipo complexo (3 ou mais alterações citogenéticas na mesma célula). Ganho ou perda de cromossomo (aneuploidia) foi observado em 69,7% (30/43) dos casos com cariótipo alterado (Figura 13). Dentre os resultados obtidos, 63 (63,6%) apresentaram o cariótipo favorável, 26 (26,2%) apresentaram o cariótipo de prognóstico intermediário e 10 (10,0%) apresentaram cariótipo desfavorável, segundo IPSS 1997 (Figura 7). O cromossomo mais prevalente, envolvido nas alterações citogenéticas apresentadas foi o cromossomo 5 (Figura 14).

Quadro 11: Dados citogenéticos dos pacientes portadores de SMD

Variáveis	N (%)
Citogenética	
Com resultado	99 /138 (71,7%)
Sem metáfase	39/138 (28,2%)
Cariótipo	
Normal	56/99 (56,5%)
Alterado	43/99 (43,4%)
Aneuploidia	
Cariótipo Alterado com aneuploidia	30 /43 (69,7%)
Cariótipo Alterado sem aneuploidia	13 /43 (30,3%)
Nº alterações citogenéticas	
Uma alteração	21/43 (48,8%)
Duas alterações	10/43 (23,2%)
≥ 3 alterações	12/43 (27,9%)
Cromossomos envolvidos	
Cromossomo 5 (-5/5q-)	13/43 (30,2%)
5q- isolada	4/43 (9,3%)
Cromossomo 7 (-7/7q-)	8/43 (18,6%)

Cromossomo 8 (+8)	7/43 (16,2%)
Cromossomo 17 (-17/17p-)	7/43 (16,2%)
Cromossomo 20 (-20/20q-)	4/43 (9,3%)
Grupo citogenético (IPSS)	
Favorável	63/99 (63,6%)
Intermediário	26/99 (26,2%)
Desfavorável	10/99 (10,0%)

Figura 7: Distribuição dos pacientes portadores de SMD, segundo grupos citogenéticos utilizados pelo Sistema Internacional de Escore Prognóstico (IPSS-1997).

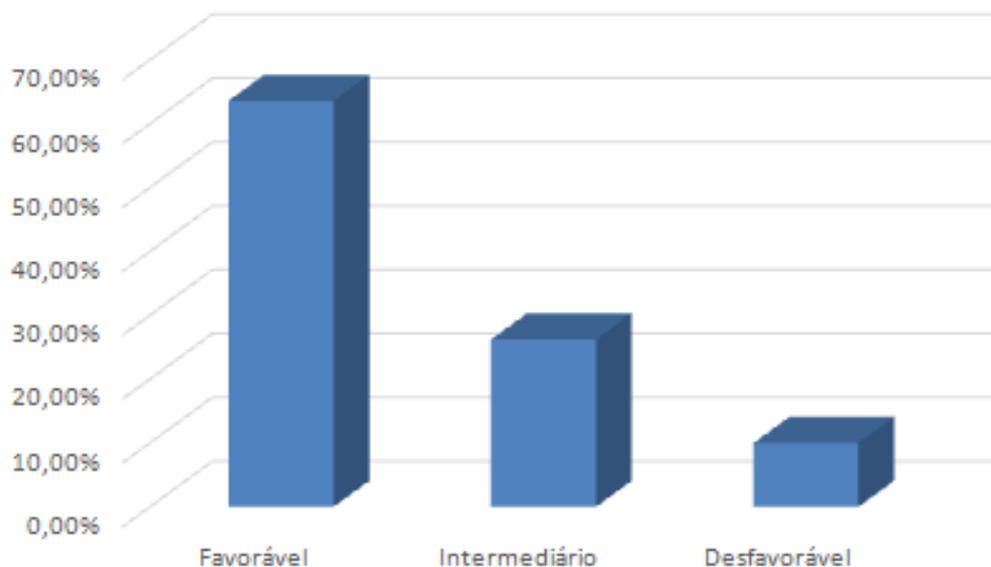


Figura 8: Distribuição dos pacientes portadores de SMD, de acordo com o resultado do cariótipo.

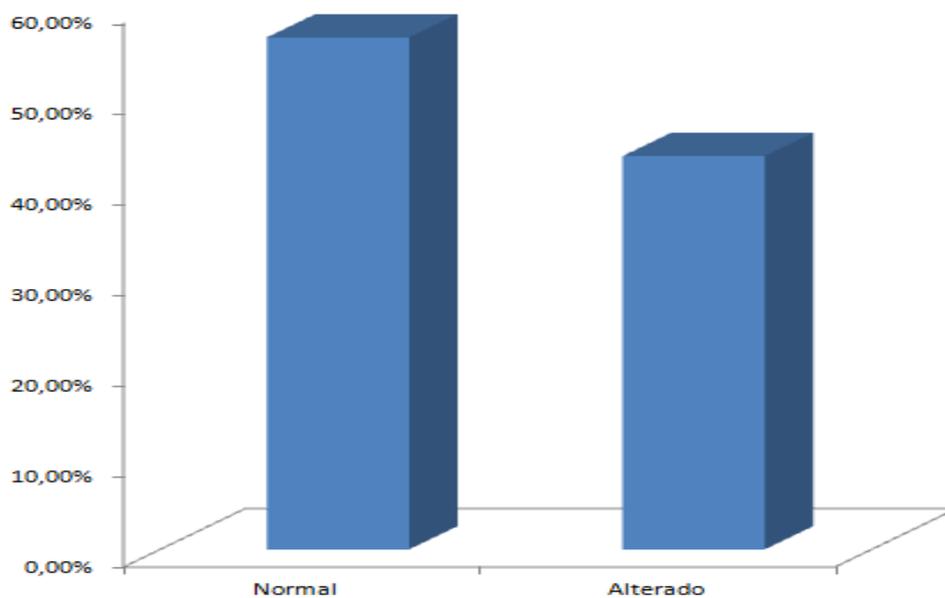


Figura 9: Cariótipo normal: 46,XX[20]

Figura 10: Caso número 66. Resultado de acordo com a classificação do IPSS (GREENBERG et al., 1997). A) Cariótipo 46, XY, +8. B) Cariótipo com alteração em dois cromossomos: 46, XY, del(5)(q31), del(7)(q32)

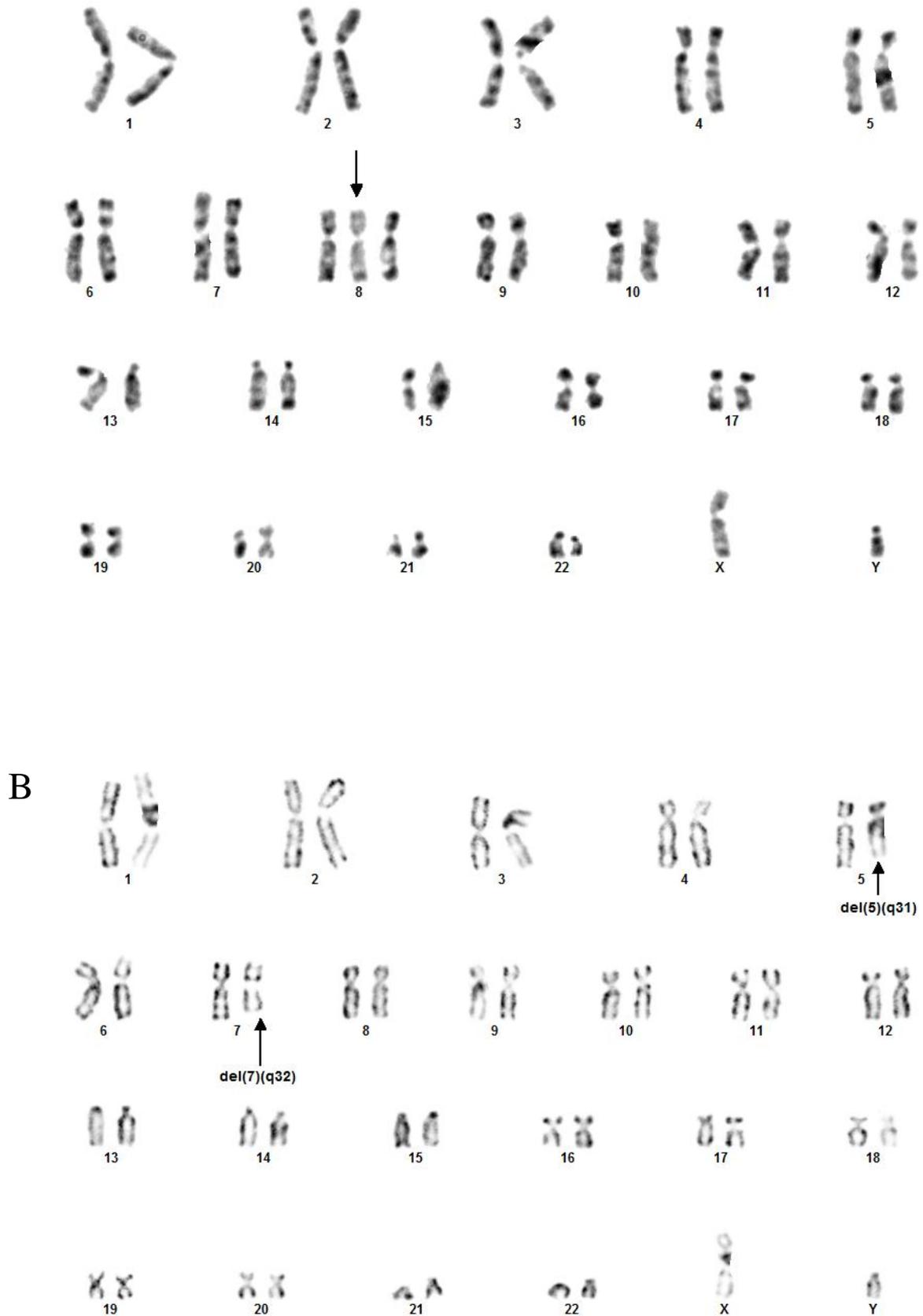


Figura 11 Caso número 17. Cariótipo com apenas uma alteração cromossômica: 46, XY, del(5)(q31) de acordo com a classificação do IPSS (GREENBERG et al., 1997).

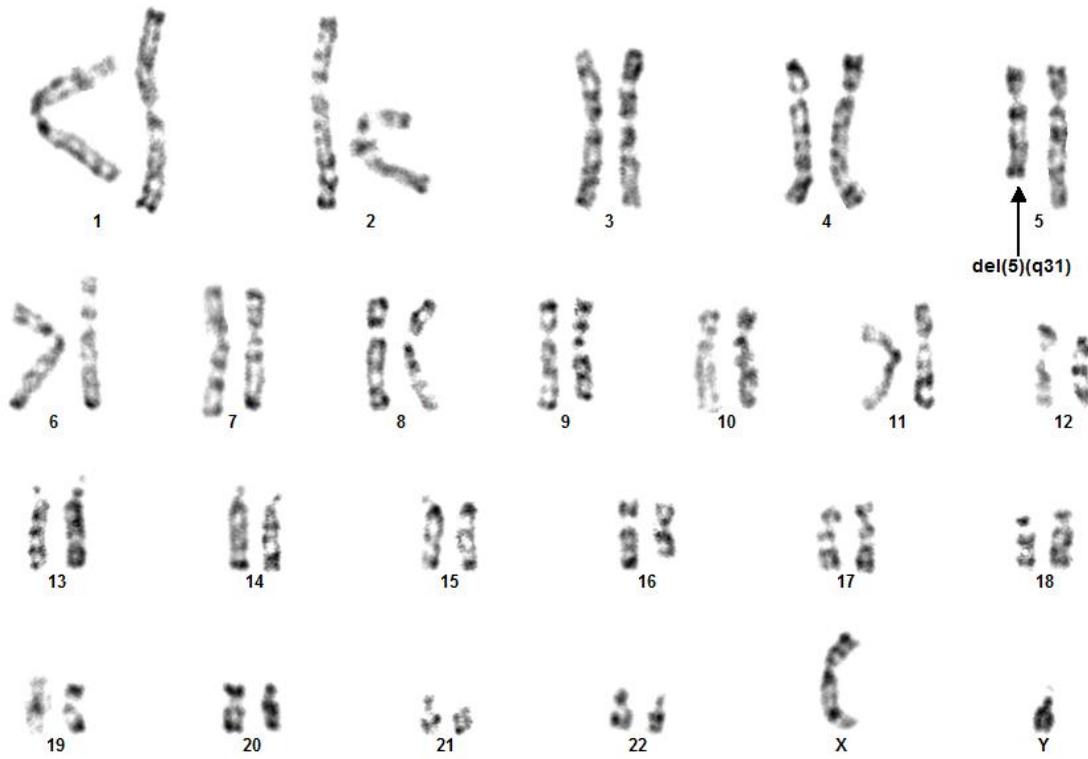


Figura 12: Distribuição dos pacientes portadores de SMD segundo a presença ou não de aneuploidia

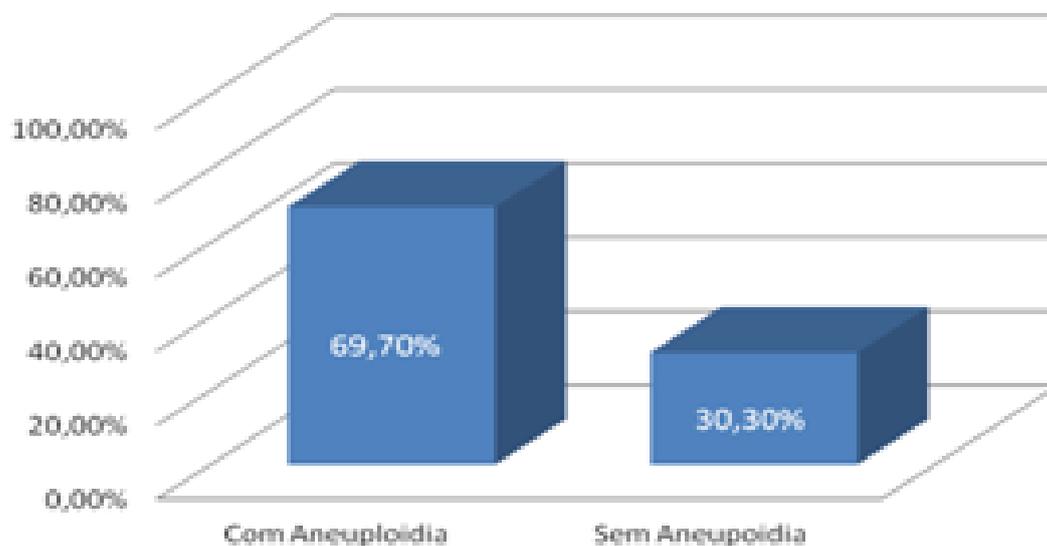
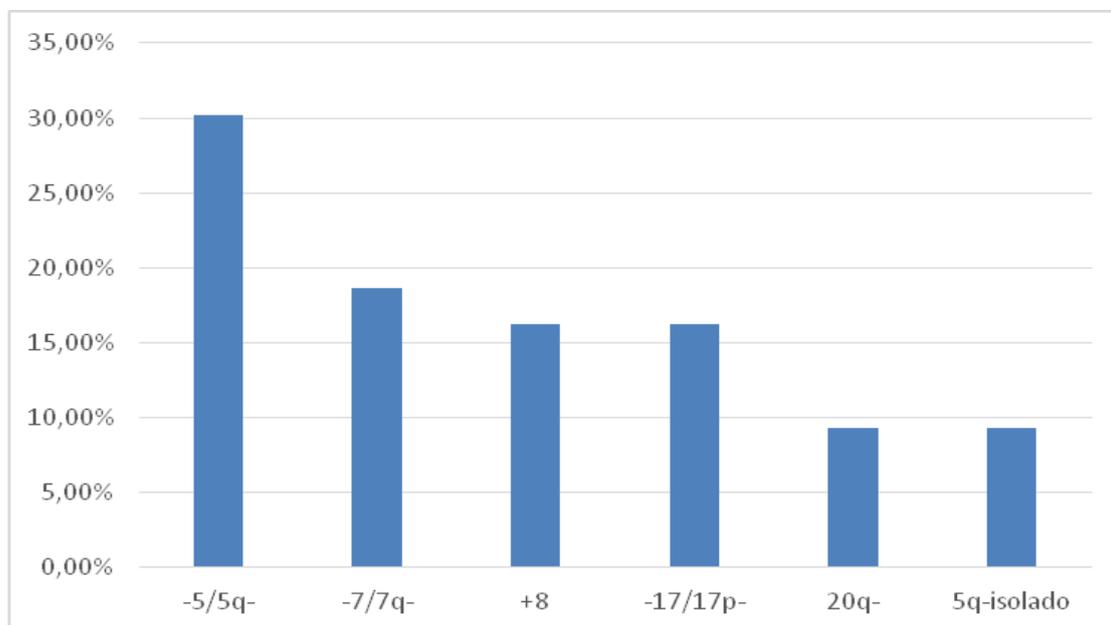


Figura 13: Distribuição dos pacientes portadores de SMD segundo o cromossomo envolvido nas alterações citogenéticas apresentadas.



4.2.2 Citogenética Molecular (FISH)

O resultado adicional da FISH em relação a Citogenética Clássica foi de apenas 2/30 casos (6,6%). As Figuras 15, 16 e 18 mostram núcleos interfásicos de pacientes normais para os cromossomo 5, 7 e 8. Apenas nos casos 78 e 129 dos 30 pacientes submetidos à técnica da FISH e que apresentavam baixo índice mitótico ao bandamento G, foram encontradas alterações (Figura 17).

Os valores considerados para confirmação das alterações citogenéticas pesquisadas foram: Monossomia e/ou Amplificação ($\geq 10\%$ das interfases positivas)

Não foi possível a realização da FISH para o cromossomo 8 em metade dos pacientes inclusos nesta metodologia, devido a problemas técnicos com a Sonda da Kreatech

Figura 15: Representação dos núcleos interfásicos de um paciente normal. Os sinais verdes correspondem a região alvo 5p15.31 e os sinais vermelhos correspondem à região controle EGR1.

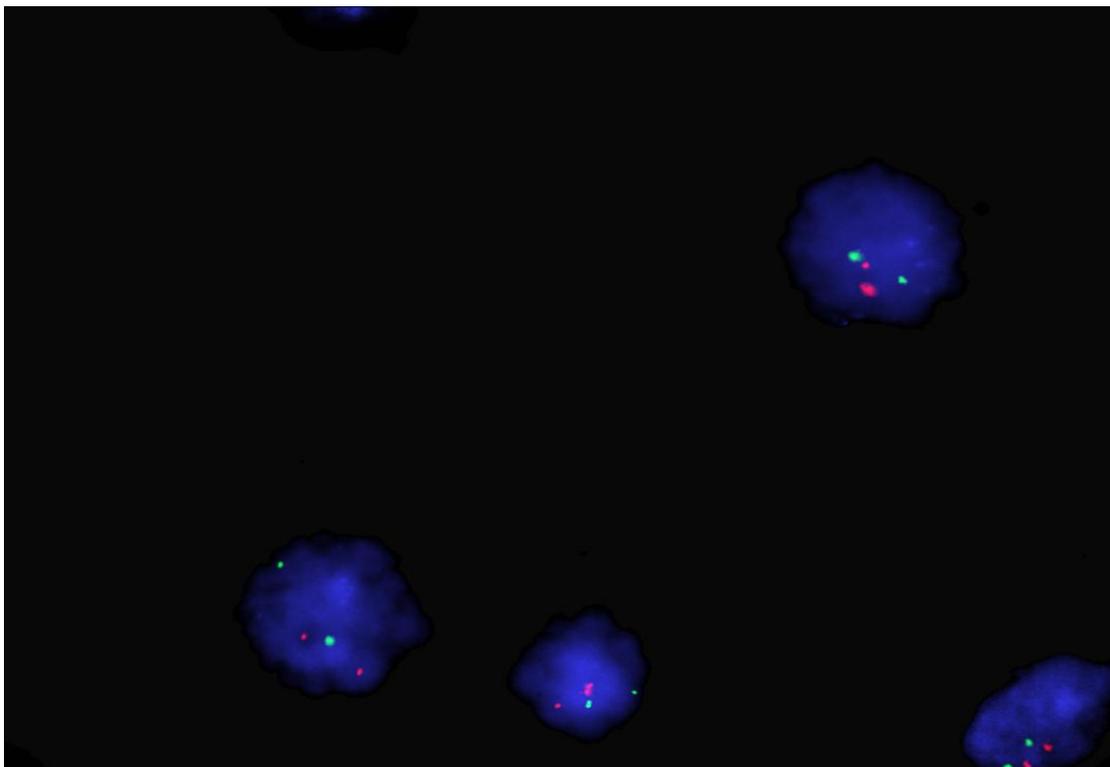


Figura 16: Representação dos núcleos interfásicos de um paciente normal. Os sinais vermelhos correspondem a região alvo 7q22 e os sinais verdes correspondem à região controle 7q31

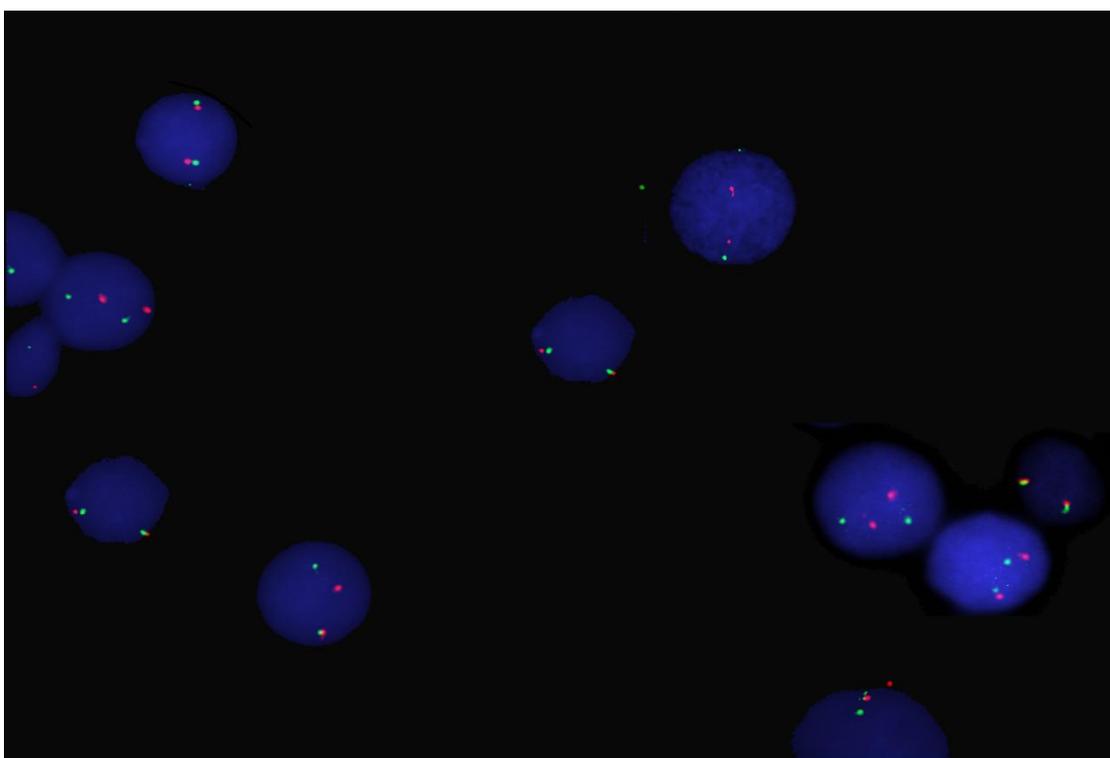


Figura 17: Caso número 78. Representação dos núcleos interfásicos de um paciente com deleção na região 5p15.31 do cromossomo 5. As setas indicam núcleos interfásicos onde os sinais verdes correspondem a região alvo 5p15.31 demonstrando apenas um sinal verde e dois sinais vermelhos correspondentes à região controle EGR1.

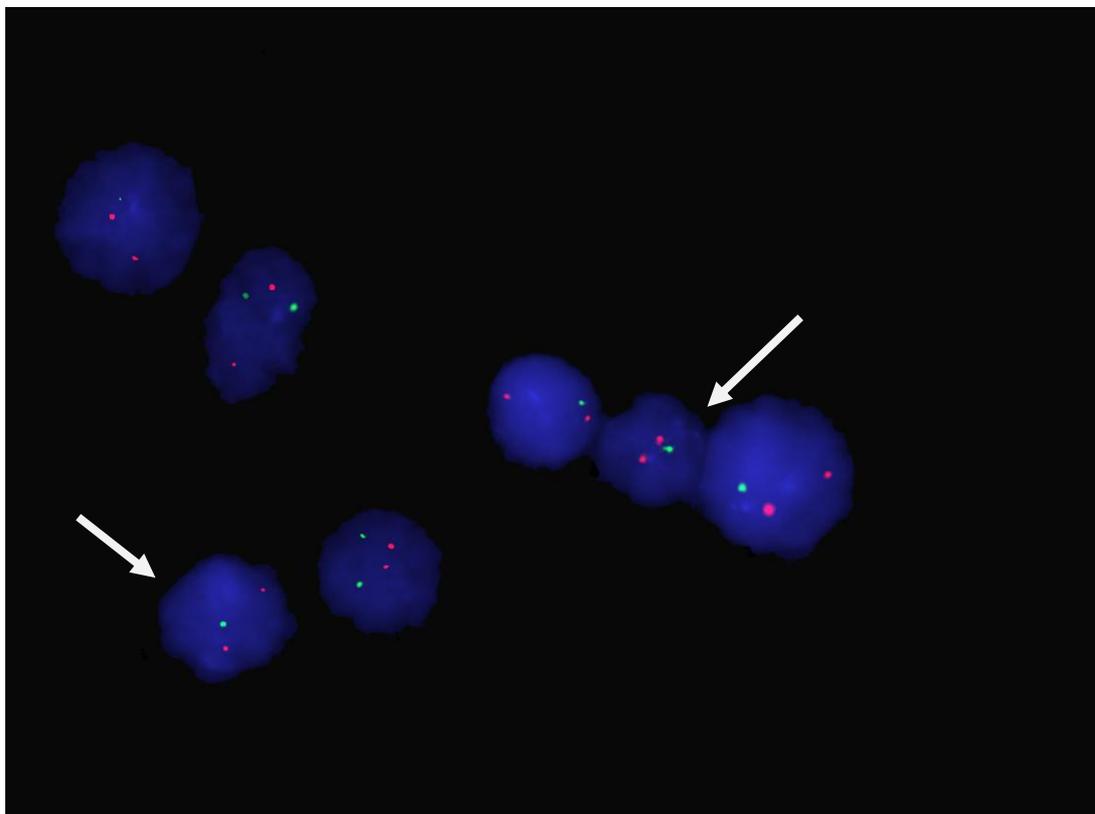
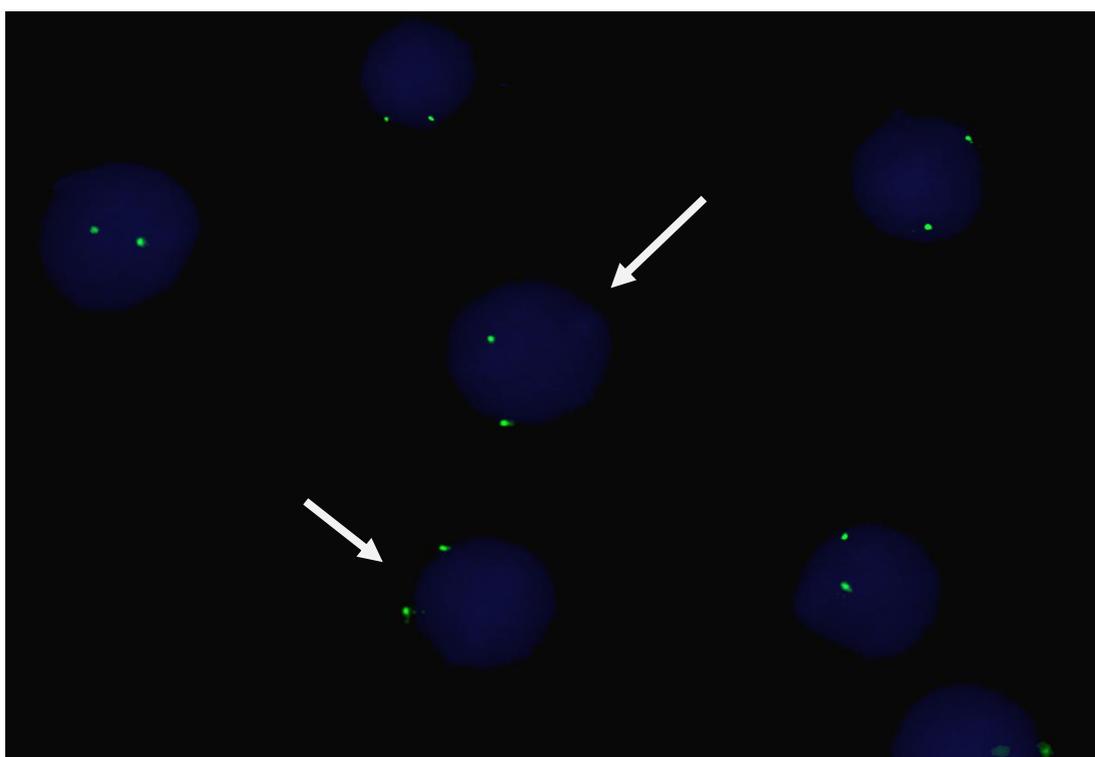


Figura 18: Representação dos núcleos interfásicos de um paciente com marcação normal para a região alfa satélite do cromossomo 8. As setas indicam núcleos interfásicos com dois sinais verdes, demonstrando que não houve trissomia do cromossomo 8.

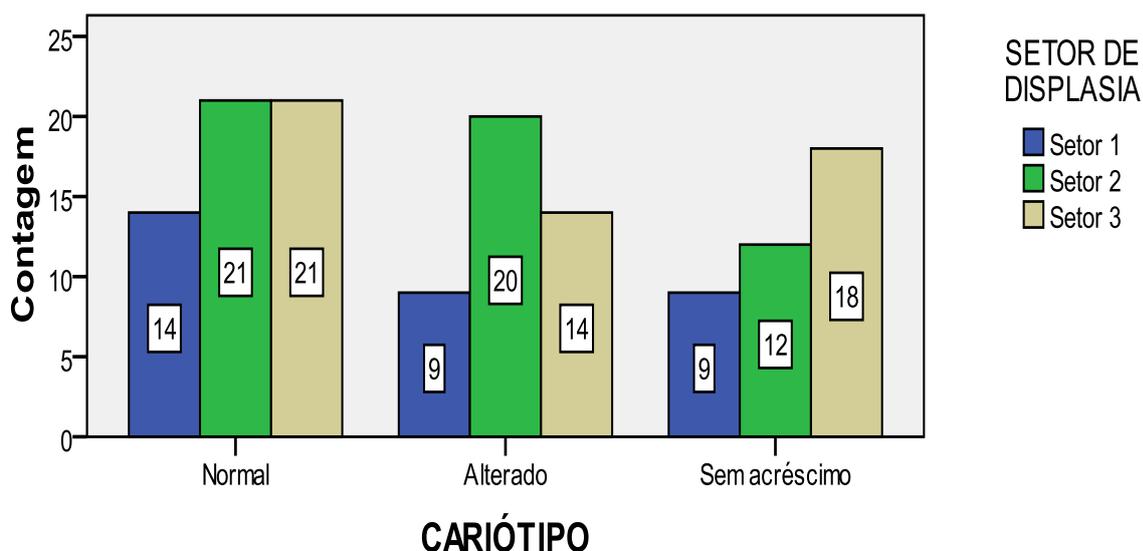


4.3 Associações das alterações cromossômicas com as características clínicas/laboratoriais

4.3.1 Citogenética Clássica (banda G) e Número de Displasias

Dentre os casos que apresentavam displasia medular, encontrou-se displasia envolvendo dois setores da medula entre os pacientes com o cariótipo normal (21; 15,22%), seguido dos pacientes com o cariótipo alterado (20; 14,49%) e dos pacientes com o cariótipo sem metáfase (12; 8,70%), assim como o envolvimento dos três setores entre os pacientes com cariótipo normal (21; 15,22%), seguido dos pacientes com o cariótipo sem metáfase (18; 13,04%) e dos pacientes com o cariótipo alterado (14; 10,14%). Contudo, a análise estatística inferencial permitiu afirmar que o número de displasias é independente do tipo de cariótipo [$\chi^2(2) = 2,518$; $p = 0,641$; e $N = 138$.] (Figura 21).

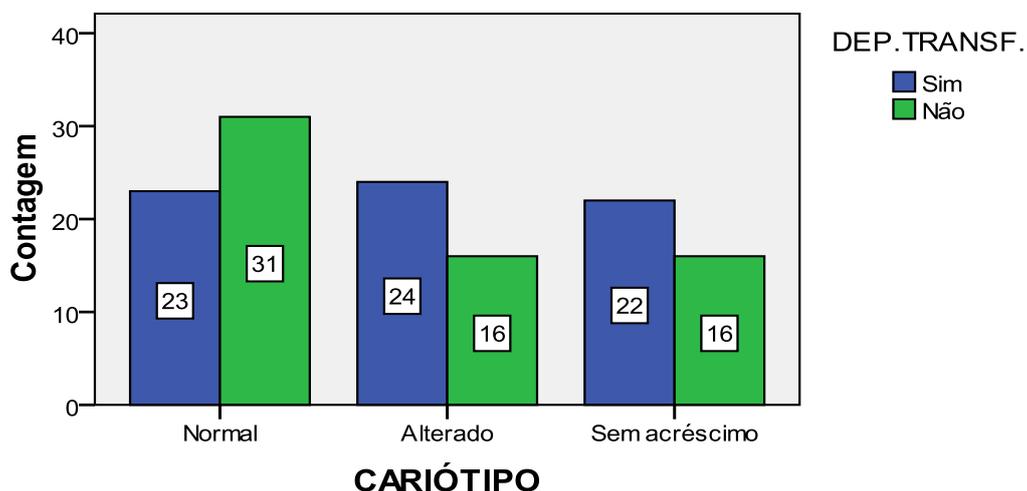
Figura 21: Distribuição da variável (número de displasias) de acordo com o tipo de cariótipo.



4.3.2 Citogenética Clássica (banda G) e Dependência Transfusional

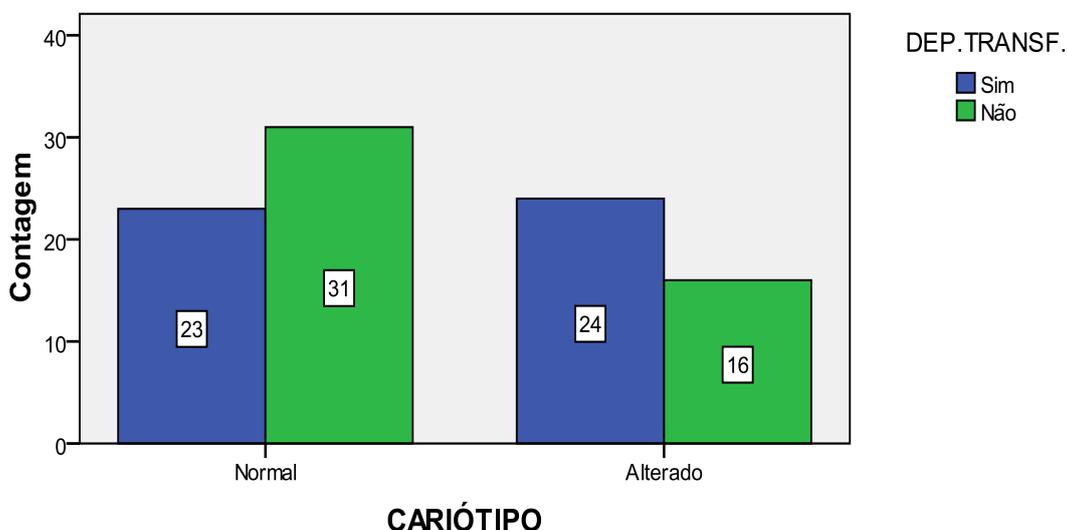
Encontrou-se um maior número de casos de dependência transfusional entre os pacientes com o cariótipo alterado (24; 18,2%), seguido dos pacientes com o cariótipo normal (23; 17,4%) e dos pacientes com o cariótipo sem metáfase (22; 16,7%). Contudo, a análise estatística inferencial permitiu afirmar que a dependência transfusional é independente do tipo de cariótipo [$\chi^2(2) = 3,467$; $p = 0,177$; e $N = 132$] (Figura 22)

Figura 22: Distribuição da variável (número de displasias) de acordo com o tipo de cariótipo.



Ao excluirmos os casos sem metáfase, encontrou-se também um maior número de casos de dependência transfusional entre os pacientes com cariótipo alterado (24; 25,5%), seguido dos pacientes com o cariótipo normal (23; 24,4%). Contudo, a análise estatística inferencial permitiu afirmar que a dependência transfusional é independente do tipo de cariótipo [$\chi^2(2) = 2,785$; $p = 0,095$; e $N = 94$] (Figura 23)

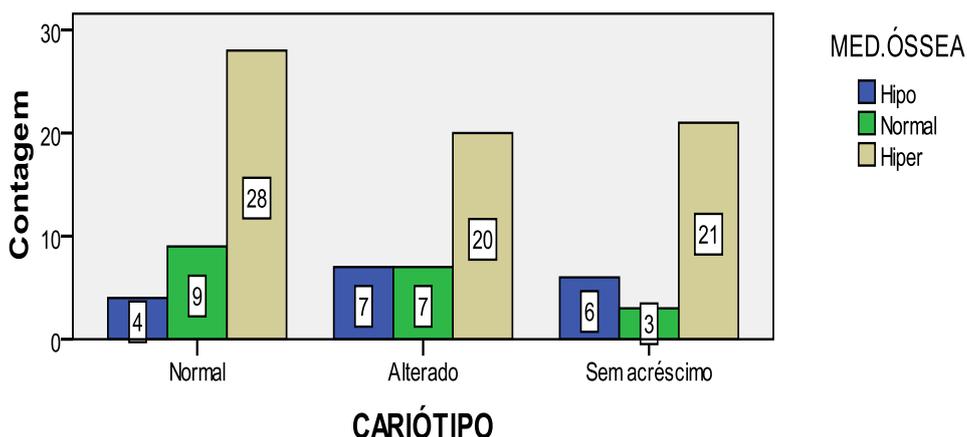
Figura 23: Distribuição dos casos de dependência transfusional de acordo com o cariótipo.



4.3.3 Citogenética Clássica (banda G) e Célularidade da Médula Óssea

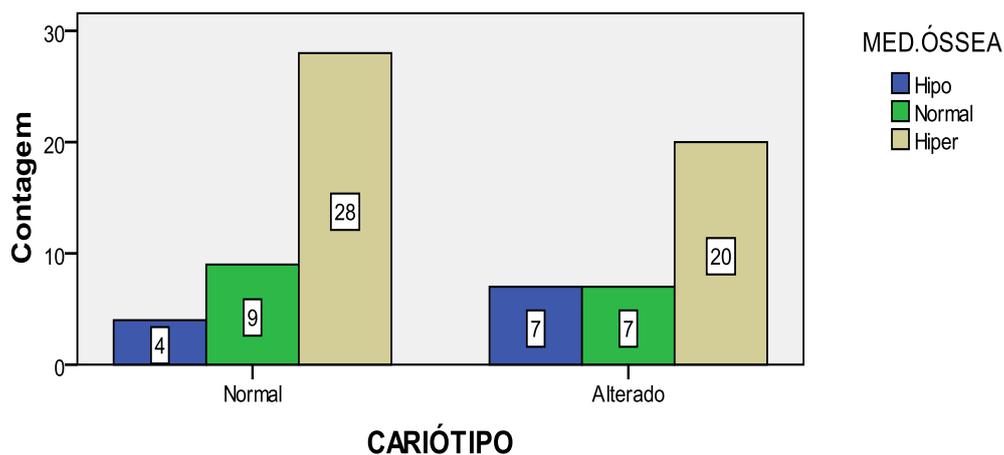
Foi observado um maior número de casos de medula hiperclular independente da presença ou ausência de alteração citogenética. entre os pacientes com o cariótipo normal (28; 26,67%), seguido dos pacientes com o cariótipo sem metáfase (21; 20,00%) e dos pacientes com o cariótipo alterado (20; 19,05%); um maior número de casos de medula óssea do tipo hipocelular entre os pacientes com o cariótipo alterado (7; 6,67%), seguido dos pacientes com o cariótipo sem metáfase (6; 5,71%) e dos pacientes com o cariótipo normal (4; 3,81%). Contudo, a análise estatística inferencial permitiu afirmar que a celularidade da medula óssea é independente do tipo de cariótipo [$\chi^2(2) = 3,635$; $p = 0,458$; e $N = 105$] (Figura 24)

Figura 24: Distribuição da celularidade da medula óssea de acordo com o cariótipo



Ao excluirmos os casos sem metáfase foi observado medula óssea do tipo Hiper celular em (28; 37,3 %) dos casos com cariótipo normal, seguido dos pacientes com cariótipo alterado (20; 26,6%). Contudo, a análise estatística inferencial permitiu afirmar que a celularidade da médula óssea é independente do tipo de cariótipo [$\chi^2(2) = 1,764$; $p = 0,414$; e $N = 75$] (Figura 25)

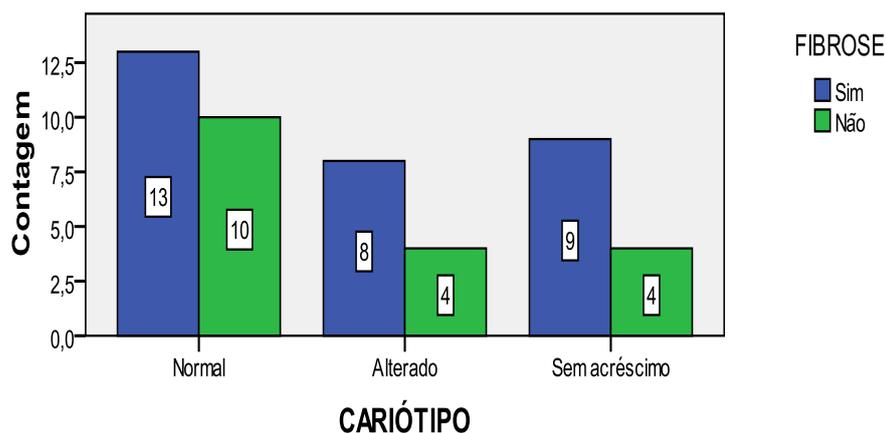
Figura 25: Distribuição da celularidade da médula óssea de acordo com o cariótipo



4.3.4 Citogenética Clássica (banda G) e Fibrose medular

Observou-se um maior número de casos de fibrose entre os pacientes com o cariótipo normal (13; 27,08%), seguido dos pacientes com o cariótipo sem metáfase (9; 18,75%) e dos pacientes com o cariótipo alterado (8; 16,67%). Contudo, a análise estatística inferencial permitiu afirmar que a fibrose é independente do tipo de cariótipo [$\chi^2(2) = 0,691$; $p = 0,742$; e $N = 48$] (Figura 26)

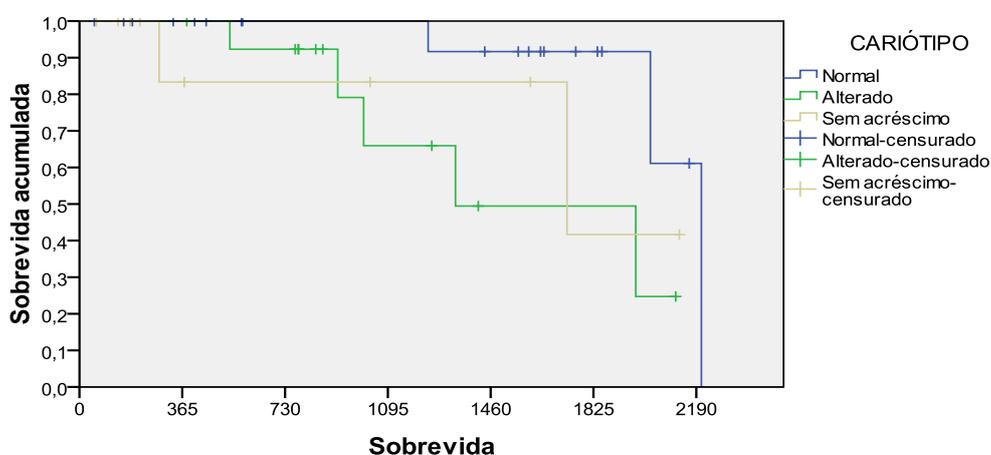
Figura 26: Distribuição dos casos de fibrose de acordo com o cariótipo



4.3.5 Citogenética Clássica (banda G) e Curva de Sobrevida

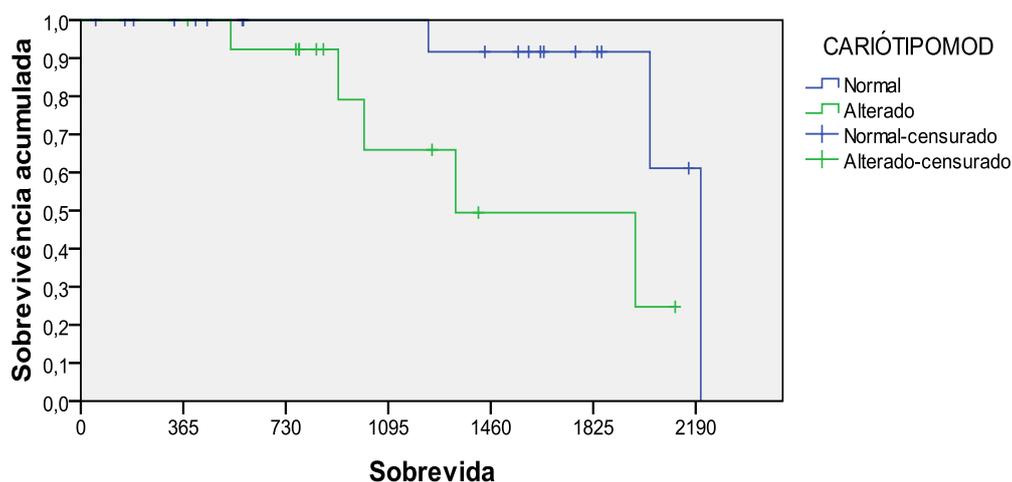
O grupo de pacientes com o cariótipo normal apresentou maior sobrevida do que os demais grupos, enquanto o grupo com o cariótipo alterado parece que sobreviveu menos do que o grupo com o cariótipo sem metáfase. De acordo com o teste *logrank*, as diferenças observadas entre a sobrevida nos três grupos, entretanto, não foram estatisticamente significativas (*logrank* = 4,472; $p = 0,122$) (Figura 27)

Figura 27: Curvas de sobrevida de acordo com o cariótipo



No entanto, ao excluirmos os casos sem metáfase, as diferenças observadas entre a sobrevida dos dois grupos remanescentes, foi estatisticamente significativo de acordo com o teste (*logrank* = 4,424; $p=0,035$) (Figura 28).

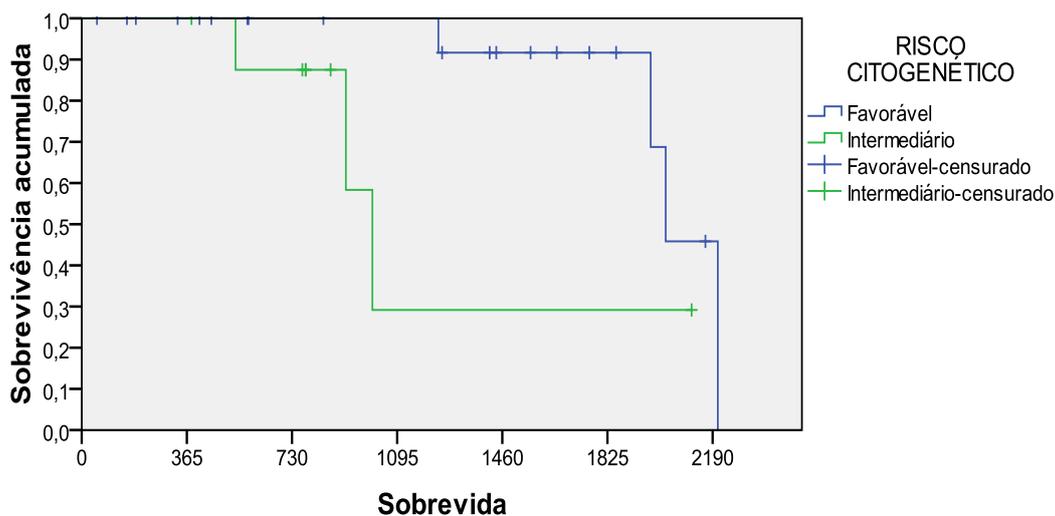
Figura 28: Curvas de sobrevida de acordo com o cariótipo



4.3.6 Grupo de Risco Citogenético e curva de Sobrevida

O grupo de pacientes que apresentava Risco Citogenético Favorável, sobreviveu mais do que os demais grupos. De acordo com o teste *logrank*, as diferenças observadas foram estatisticamente significativas (*logrank* = 3,824; $p = 0,05$) (Figura 29).

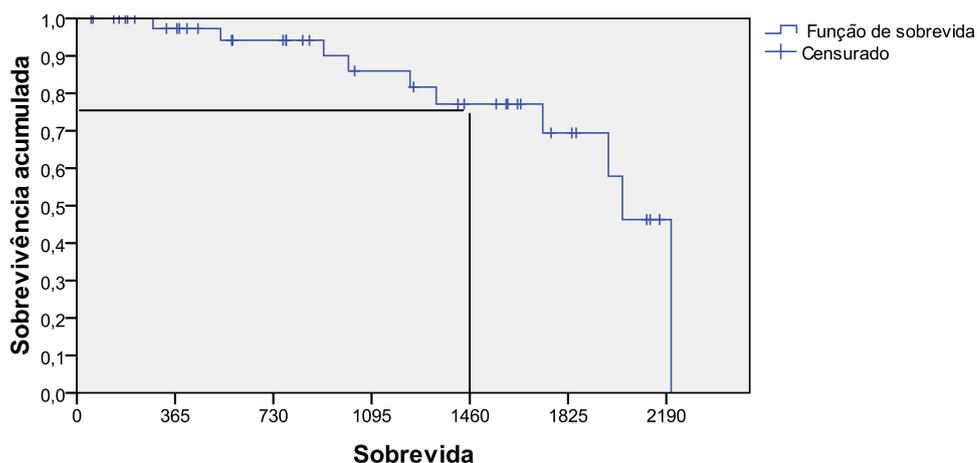
Figura 29: Curvas de sobrevida de acordo com o risco citogenético.



4.3.7 Sobrevida Global

Observa-se na curva de sobrevivência global de Kaplan-Meier, no eixo das ordenadas, a sobrevivência acumulada descrita em termos de probabilidade (de 0 a 1) e, no eixo das abscissas, o tempo de sobrevivência descrito em dias. Traçando uma linha vertical no tempo de 1460 dias (que corresponde a quatro anos) percebe-se que, aproximadamente, 77% dos pacientes sobreviveram mais de quatro anos. (Figura 30)

Figura 30: Curva de sobrevida global



5 DISCUSSÃO

Dados epidemiológicos sobre SMD no Brasil são escassos. Estudo prévio realizado por MAGALHÃES et al. (2010), que incluiu 476 pacientes das regiões Nordeste, Sudeste e Sul, a idade mediana dos pacientes foi de 68,3 anos. Nosso estudo mostrou idade média de 65,9 anos, concordando com dados nacionais.

Países ocidentais, como Estados Unidos, França e Alemanha e outros, possuem resultados distintos em seus estudos epidemiológicos, com medianas de idade variando entre 71 a 77 anos. (AVGERINOU et al., 2013; DINMOHAMED et al., 2014; MA, 2012; MA et al., 2007; MAYNADIE et al., 1996; MCQUILTEN et al., 2013; NOLTE et al., 2012; PHEKOO et al., 2006). Por outro lado, países orientais (Japão, China, Índia e outros) apresentam medianas de idade inferiores, entre 50 a 60 anos. (DAKSHINAMURTHY et al., 2005; LEE et al., 1999; OGUMA et al., 1995; ZHAO et al., 2002).

No nosso país a mediana de idade em comparação aos demais países ocidentais foi menor, isto talvez possa ser explicado pela grande heterogeneidade genética da população e/ou pela exposição a fatores ambientais que contribuem para o desenvolvimento de SMD. (BOWEN, 2013; NISSE et al., 2001; RIGOLIN et al., 1998; SCHNATTER et al., 2012)

Em nosso estudo, 20 pacientes (14,4%) relataram histórico de exposição a agentes mielotóxicos (solventes e agrotóxicos), corroborando com o estudo americano com 365 pacientes, no qual 19,4% haviam sido expostos à solventes e apenas 8 % há uso de agrotóxicos. (ELHOR GBITO; GARCIA-MANERO; STROM, 2014)

É importante ressaltar que o envelhecimento da população brasileira está se acentuando e que a incidência dessa doença é maior à medida que aumenta a faixa etária. Segundo dados do IBGE (2011), em 2050, a expectativa de vida será de 81,3 anos. Portanto, devemos esperar um aumento na incidência dessa doença no Brasil nos próximos anos (IBGE, 2008).

Em pacientes portadores de SMD, nosso trabalho apresentou razão de M/F de 1,3:1, dado que encontra-se condizente com os registros internacionais que demonstraram razão de M/F variando entre 1,1 e 2. (CHEN, B. et al., 2005; GREENBERG, P. et al., 1997; HAASE et al., 2007; OGUMA et al., 1995; SOLE et al., 2005).

A maioria dos pacientes do estudo era portadora de SMD *de novo*, sendo apenas 2.8% dos casos (quatro pacientes) classificados como SMD secundária.

O grupo predominante, pela classificação OMS foi o CRDM (55-% dos casos), seguido por ARSA (13,7% dos casos). Ao contrário do que foi observado por (FERREIRA JUNIOR et al., 2013; PARK et al., 2008), onde a minoria dos pacientes pertenceu ao subtipo AREB I ou AREB II, nosso trabalho apresentou o subtipo CRDU sendo o de menor prevalência. Entretanto, dados da literatura em relação a essa característica são variáveis, além de muitos estudos mostrarem resultados de acordo com a classificação OMS de 2001 (GERMING et al., 2012; HAASE et al., 2007; MALCOVATI et al., 2011)

Como esperado, a maioria dos pacientes portadores de SMD apresentaram medula hiperclular (65,7 %). Este dado está relacionado à própria patogênese da doença, visto que a apoptose excessiva dos estágios iniciais da doença é contrabalanceada pelo aumento na proliferação das células progenitoras hematopoéticas. Essas alterações proliferativas podem ser uma característica intrínseca do clone neoplásico ou podem estar relacionadas a interações autócrinas e/ou parácrinas de citocinas. (MUFTI, 2004; BERNASCONI, 2008; ISHIBASHI et al., 2011)

A frequência de medula hipocelular (16,1 %) observada em nosso estudo foi equivalente ao descrito na literatura internacional (entre 10-20% dos casos) (CATENACCI e SCHILLER, 2005; GERMING et al., 2008; DELLA PORTA et al., 2009).

A maioria dos pacientes estudados apresentaram dependência transfusional (52,3%), usando o critério de transfusão de MALCOVATI et al., (2005). Este achado corrobora com dois estudos nacionais MAGALHAES et al., (2010) e HEREDIA et al., (2012), que observou uma dependência de (66,3 e 62,3%, respectivamente).

Acreditamos que o número de transfusões realizadas em comparação a concentração de hemoglobina, reflita melhor a verdadeira necessidade transfusional do paciente, e conseqüentemente, a gravidade da citopenia.

Este estudo retrospectivo foi desenvolvido para avaliar as alterações citogenéticas clássicas e moleculares em pacientes portadores de SMD, assim como detectar associação entre as variáveis clínico/laboratoriais e o cariótipo nesse grupo de pacientes. A avaliação do bandamento G, assim como da FISH, foi realizado de forma quantitativa.

O estudo da Citogenética convencional identifica clone a partir de alterações cromossômicas. A escassez de células neoplásicas, devido à eventual incapacidade de divisão apropriada *in vitro* do clone displásico, assim como a presença de mutação críptica/submicroscópica, dificulta a análise das alterações cromossômicas em amostras de rotina com menos de 20 metafases.

Contrariamente à citogenética convencional, as análises de hibridização *in situ* não dependem de células em divisão e podem ser realizadas em núcleos interfásicos. Permite analisar um elevado número de células, sendo a técnica adequada para detectar alterações submicroscópicas, especialmente deleções indetectáveis por bandamento G.

A técnica FISH apresenta, no entanto, algumas limitações: as sondas disponíveis na prática clínica não permitem avaliar alguns tipos de alterações citogenéticas recorrentes e de interesse clínico como os rearranjos complexos, a FISH avalia alterações específicas com base em uma seleção de sondas possibilitando apenas a identificação de alterações marcadas por sondas moleculares rigorosamente definidas, e complementares às estruturas do gene selecionado. (HEREDIA et al., 2012)

A citogenética é fundamental para o diagnóstico, prognóstico e decisão terapêutica dos pacientes com SMD (MUFTI, 2004). A incidência de cariótipo alterado encontrado nesse estudo (43,4%) mostra-se de acordo com os dados internacionais que relatam uma frequência entre 40-60% em pacientes portadores de SMD *de novo* (SOLÉ et al., 2005; DAKSHINAMURTHY et al., 2005; HAASE et al., 2007; HAASE, 2008), no entanto, superior aos estudos nacionais publicados por (ROMEO et al., 2002) e (PINHEIRO e CHAUFFAILLE, 2009), no qual foi observada uma frequência de 35,2% (12/34) e 20,5% (9/44) de alterações citogenéticas, respectivamente.

A presença de cariótipos normais (56,6%), assim como as alterações citogenéticas com deleção do 5q isolada, foram os principais fatores que contribuíram para a prevalência de (86,8 %), classificando a grande maioria dos pacientes incluídos, no nosso estudo, como de baixo risco ao serem estratificados usando o critério prognóstico (IPSS 1997).

As alterações cromossômicas encontradas em nosso estudo foram predominantemente alterações não balanceadas, e dentre elas, as alterações envolvendo a monossomia do cromossomo 5, deleção do braço longo do cromossomo (5q-), monossomia do cromossomo 7, deleção do braço longo do cromossomo 7 (-7/7q-), trissomia do 8 (+8) e monossomia do cromossomo 17 ou deleção do braço curto da região 17p- (-17/17p-).

A frequência de alterações envolvendo o cromossomo 17 (-17/17p-) encontrada (16,2% do total de pacientes com alteração citogenética ou 7,0 % (7/99) do total de pacientes com SMD) foi bem superior as descritas por (HAASE et al., 2008) e (BERNASCONI et al., 2007), que relataram frequências em torno de 5% (do total de pacientes com alteração citogenética) e 1,2% (do total de pacientes com SMD), respectivamente. Este achado talvez possa ser explicado pelo fato da nossa população apresentar grande exposição ao uso de agrotóxicos e ao uso de medicamento da classe de Imunossupressor como Azatioprina.

Dentre todas as alterações encontradas em SMD, deleções do braço longo do cromossomo 5 são as alterações citogenéticas mais frequentes. A del(5q) no atual estudo foi observada em 30,2% dos casos que apresentavam cariótipo alterado, este achado encontra-se condizente com o descrito na literatura nacional e internacional, onde foi observado deleção da região 5q em 33,3% e 30%, respectivamente. (ROMEO et al., 2002; HEREDIA et al., 2012; HIRAI, 2003; HAASE et al., 2008)

À semelhança de outros estudos publicados as alterações do cromossomo 7 foram as segundas mais observadas. (OLNEY e LE BEAU, 2002; HAASE, 2008)

Variação nas frequências de alterações citogenéticas é relatada na literatura e atribuída aos diferentes perfis étnicos. Como exemplo, alterações citogenéticas isoladas do cromossomo 5 (-5/5q-) e cromossomo 7 (-7/7q-) são mais frequentes na população de SMD dos países ocidentais (variando entre 12,8%-23,1% e 3,1%-19,4%, respectivamente) do que nos países orientais, onde essas alterações representam apenas um pequeno grupo de casos (CHEN et al., 2005)

No presente estudo a frequência de pacientes sem resultado do cariótipo por insucesso da cultura celular foi de 28,2 %. Esta percentagem foi superior a outros estudos de citogenética convencional em SMD, como no estudo brasileiro realizado por (Romeo et al., 2002), no qual a frequência de casos com insucesso da cultura celular foi de 15%.

Nas SMD, a presença de um cariótipo normal é um fator de melhor prognóstico em relação à presença de qualquer alteração numérica ou estrutural. Deste modo, a ausência de alterações na análise citogenética clássica pode resultar em um atraso na terapia citostática ou em uma terapia menos agressiva. Contudo, a falta de alterações citogenéticas no cariótipo nem sempre significa que estas estão ausentes. Assim, é importante definir indicadores biológicos que permitam uma melhor caracterização dos pacientes com cariótipo normal e que possibilitem a identificação dos pacientes com SMD com cariótipo normal em risco elevado de progressão para LMA.

Entre todas variáveis clínicas/laboratoriais descritas nesse estudo, apenas o cariótipo e o subtipo citogenético foram capazes de prever a sobrevida. Pacientes que tinham, ao diagnóstico, cariótipo alterado apresentaram uma menor sobrevida em relação aos pacientes com cariótipo normal. O mesmo ocorreu com os pacientes que apresentavam o subgrupo citogenético favorável (normal, del(5q), del(20q) e -Y). Estes dados corroboram o papel fundamental da Citogenética na caracterização da SMD.

A hibridização *in situ* por fluorescência (FISH), caracterizada pelo anelamento de uma fita simples de DNA à uma seqüência de DNA complementar, detecta alteração cromossômica específica tanto em interfases quanto em metáfases, o que permitiu avaliar os cromossomos 5,7 e 8 mesmo quando presentes em baixas frequências (clones pequenos).

Um dos objetivos do presente estudo foi avaliar a FISH como método complementar à técnica da banda G no que tange à detecção das anormalidades em casos onde se detecta baixo índice mitótico à citogenética clássica.

De acordo com RIGOLIN *et al.*, 2001; HEREDIA *et al.*, 2012 um resultado de FISH positivo associa-se a uma percentagem mais elevada de blastos na medula óssea, a um subgrupo de SMD de risco elevado e a uma categoria do IPSS de risco elevado. Assim, os pacientes com diagnóstico de SMD e com resultado de FISH positivo apresentam um risco mais elevado de progressão para LMA comparativamente aos doentes cujos resultados de FISH são negativos. No global, os resultados obtidos por estes autores mostram que a análise de FISH pode ser útil na investigação dos doentes com SMD no diagnóstico quando é observado um cariótipo normal.

Com o painel de sondas utilizado neste estudo, a análise da FISH permitiu detectar dois casos (2/30), havendo benefício adicional de 6,6%. A alteração observada, nesses dois casos, pela FISH foi a deleção do braço longo do cromossomo 5.

Os diferentes estudos realizados com o objetivo de avaliar a capacidade da técnica FISH na detecção de alterações ocultas, em doentes com SMD com cariótipo normal, têm demonstrado benefícios adicionais variáveis.

Panani e Pappa, 2007 estudaram a incidência de trissomia do cromossomo 8 nos pacientes com SMD primária utilizando técnicas de citogenética convencional e FISH, tendo detectado por FISH a presença de trissomia 8 oculta, não detectada no cariótipo, em 10%

Rigolin *et al.*, 2001 analisaram por FISH 101 doentes com SMD com cariótipo normal, recorrendo a um painel de sondas moleculares específicas para as anomalias dos cromossomas 5, 7, 8 e 17. Estes autores encontraram alterações em 17,8% dos pacientes. CHERRY *et al.*, 2003 avaliou 48 pacientes com SMD, apresentou um benefício adicional de 2% na detecção de alterações cromossômicas com o uso da FISH, porém inferior aos resultados de ROMEO *et al.*, 2002, que detectaram um benefício de 10%. Resultado bastante similar ao desenvolvido por CHERRY *et al.*, 2003 foi encontrado por PINHEIRO E CHAUFFALI *et al.*, 2009 que detectaram pelo uso da FISH alterações cromossômicas em seis casos, havendo benefício adicional somente para 2% (1/50) dos pacientes.

Os nossos resultados são equivalentes ao encontrado na literatura nacional e internacional, no entanto apresenta um benefício adicional inferior ao encontrado por (RIGOLIN *et al.*, 2001). Uma possível explicação para a diferença de resultados entre estes trabalhos e o aqui apresentado pode estar relacionado ao grupo de risco dos pacientes de Rigolin *et al.*, 2001, o qual era composto, em sua grande maioria, por pacientes de alto risco para evolução leucêmica (IPSS alto risco e Intermediário II) ao contrário dos pacientes aqui estudados (Intermediário-I em sua grande maioria).

Apesar do resultado da FISH ser alterado em apenas 2 casos (6,6%) parecer insignificante, foi introduzido uma nova terapêutica para ambos os pacientes. Como as alterações envolviam deleção do cromossomo 5, os paciente foram encaminhados para tratamento com Lenalidomida, uma droga que é capaz de gerar independência transfusional em até 50% dos pacientes.

6 CONCLUSÕES:

1 As principais alterações citogenéticas encontradas no estudo foram a deleção do cromossomo 5, a deleção do cromossomo 7 e a deleção do cromossomo 17.

2. A melhor estratégia de estudo citogenético dos pacientes com SMD, visando a otimização da relação custo/benefício, consiste na aplicação sequencial das técnicas de citogenética convencional e molecular, devendo estas ser encaradas como complementares na caracterização citogenética das síndromes mielodisplásicas. A FISH, ainda que ofereça pouco acréscimo, deve ser usada nos casos que não apresentem metáfase ou de baixo índice mitótico.

3. Na avaliação dos parâmetros clínicos, apenas a presença de cariótipo alterado e o subtipo do grupo citogenético foram capazes de predizer estatisticamente a sobrevida global dos pacientes.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

APA, A.G.; GUTZ, C.N.R.M. Fatores prognósticos nas síndromes mielodisplásicas. **Rev Bras Hematol Hemoter.** v. 28, n.3, p.198-200, 2006

AGGARWAL, S. et al. Role of immune responses in the pathogenesis of low-risk MDS and high-risk MDS: implications for immunotherapy. **Br J Haematol**, v. 153, n. 5, p. 568-81, Jun 2011.

Bernasconi P, Cavigliano PM, Boni M, Calatroni S, Klersy C, Giardini I, Rocca B, Crosetto N, Caresana M, Lazzarino M and Bernasconi P. Is FISH a relevant prognostic tool in myelodysplastic syndromes with a normal chromosome pattern on conventional cytogenetics? A study on 57 patients. **Leukemia.** 2003; 17:2107–2112.

Brunning RD, Orazi A, Germing U. Myelodysplastic syndromes/neoplasms, overview. In: Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, Jaffe ES, Pileri SA, Stein H, Thiele J, Vardiman JW. **WHO Classification of Tumours of Hematopoietic and Lymphoid Tissues.** Lyon: IARC Press,2008, 88-93.

BEJAR, R. Prognostic models in myelodysplastic syndromes. **Hematology Am Soc Hematol Educ Program**, v. 2013, p. 504-10, 2013.

BOWEN, D. T. Occupational and environmental etiology of MDS. **Best Pract Res Clin Haematol**, v. 26, n. 4, p. 319-326, Dec 2013.

CHAUFFAILLE, ML. Adding FISH to karyotype in Myelodysplastic syndrome investigation diagnosis: are all questions answered? **Leuk Res.** Vol 34, n.4 p. 413-415, 2010

CATENACCI, D. V.; SCHILLER, G. J. Myelodysplastic syndromes: a comprehensive review. **Blood Rev**, v. 19, n. 6, p. 301-19, Nov 2005

CORDOBA, I. et al. The degree of neutropenia has a prognostic impact in low risk myelodysplastic syndrome. **Leuk Res**, v. 36, n. 3, p. 287-92, Mar 2012

COSTA, M. B. et al. Revised IPSS cytogenetics in Brazilian patients correlates with prognosis in myelodysplastic syndrome. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 35, n. Suplemento 1, 7/11/2013 2013

DAYYANI, F. et al. Cause of death in patients with lower-risk myelodysplastic syndrome. **Cancer**, v. 116, n. 9, p. 2174-9, May 1 2010

DELLA PORTA, MG .; MALCOVATI, L.; BOVERI, E et al. Clinical relevance of bone marrow fibrosis and CD34-positive cell clusters in primary myelodysplastic syndromes. **J Clin Oncol**, v.27, n.3, p.754-62, 2009

DE SOUZA FERNANDEZ, T. et al. Chromosomal alterations associated with evolution from myelodysplastic syndrome to acute myeloid leukemia. **Leuk Res**, v. 24, n. 10, p. 839-48, Oct 2000

DINMOHAMED, A. G. et al. Trends in incidence, initial treatment and survival of myelodysplastic syndromes: A population-based study of 5144 patients diagnosed in the Netherlands from 2001 to 2010. **Eur J Cancer**, v. 50, n. 5, p. 1004-12, Mar 2014

ELHOR GBITO, K. Y.; GARCIA-MANERO, G.; STROM, S. S. Evaluation of epidemiological factors in survival of patients with de novo myelodysplastic syndromes. **Cancer Causes Control**, v. 25, n. 4, p. 425-35, Apr 2014

FERREIRA JUNIOR, M. A.; IVO, M. A.; PONTES, E. R. C. J. Sobrevida e evolução leucêmica de portadores de síndromes mielodisplásicas. **Cad. Saúde Colet.**, v. 21, n. 2, p. 154-9, 2013.

GARCIA-MANERO, G. Myelodysplastic syndromes: 2011 update on diagnosis, risk-stratification, and management. **Am J Hematol**, v. 86, n. 6, p. 490-8, Jun 2011.

GERMING, U et al. Epidemiology, classification and prognosis of adults and children with myelodysplastic syndromes. **Ann Haematol** v. 87, p.691-9, 2008

GRAUBERT, T.; WALTER, M. J. Genetics of myelodysplastic syndromes: new insights. **Hematology Am Soc Hematol Educ Program**, v. 2011, p. 543-9, 2011.

GREENBERG, P. et al. International scoring system for evaluating prognosis in myelodysplastic syndromes. **Blood**, v. 89, n. 6, p. 2079-88, Mar 15 1997.

GREENBERG, P. L. et al. Revised international prognostic scoring system for myelodysplastic syndromes. **Blood**, v. 120, n. 12, p. 2454-65, Sep 20 2012.

IBGE. Censo agropecuário 2006: resultados preliminares. 2007. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/economia/agropecuaria/censoagro/2006/tabela1_3_10.pdf>. Acesso em: 15/01/2014.

IBGE. Projeção da população. 2008. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/populacao/projecao_da_populacao/2008/piramide/piramide.shtm>. Acesso em: 15/03/2014.

ISCN An International system for Human Cytogenetic Nomenclature. S. Karger: Basel 2005.

Jädersten M, Hellström-Lindberg E. Myelodysplastic syndromes: biology and treatment. **Journal of Internal Medicine** 2008; 265:307-328.

Li L, Liu X-P, Nie L, Yu M-H, Zang, Y, Qin T-J, Xiao Z-J. Unique cytogenetics features of primary myelodysplastic syndromes in Chinese patients. **Leukemia Research**. 2009; 33:1194-1198.

LORAND-METZE, I. et al. Factors influencing survival in myelodysplastic syndromes in a Brazilian population: comparison of FAB and WHO classifications. **Leuk Res**, v. 28, n. 6, p. 587-94, Jun 2004

LUKACKOVA, R. et al. Molecular genetic methods in the diagnosis of myelodysplastic syndromes. A review. **Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub**, Nov 20 2013.

Magalhães SMM, Madeira TS, Bittencourt R, Velloso E, Chauffaille ML, Azevedo AA, Fagundes EM, Zanichelli MA, Bonfim G, Melo LG, Tavares RS, Bortolheiro TC. Epidemiological and Clinicopathological Data From the Brazilian Registry of Patients with Myelodysplastic Syndromes and Comparative Analysis between different geographic areas. **53rd ASH Annual Meeting and Exposition**, 2010, December 4.

MALCOVATI, L. et al. Impact of the degree of anemia on the outcome of patients with myelodysplastic syndrome and its integration into the WHO classification-based Prognostic Scoring System (WPSS). **Haematologica**, v. 96, n. 10, p. 1433-40, Oct 2011

MALCOVATI, L. et al. Prognostic factors and life expectancy in myelodysplastic syndromes classified according to WHO criteria: a basis for clinical decision making. **J Clin Oncol**, v. 23, n. 30, p. 7594-603, Oct 20 2005.

Mufti GJ, Bennett JM, Goasguen J, Bain BJ, Baumann I, Brunning R. Diagnosis and classification of myelodysplastic syndrome: International Working Group on Morphology of myelodysplastic syndrome (IWGM-MDS) consensus proposal for the definitions and enumeration of myeloblasts and ring sideroblasts. **Haematologica** 2008; 83:1712-1717.

Naeim F, Rao PN, Grody WW. Myelodysplastic Syndromes. In Hematopathology – Morphology, Immunophenotype, Cytogenetics and Molecular Approaches, 1st Edition. USA: Academic Press Publication 2008:129-154.

Nimer SD. Myelodysplastic syndromes. **Blood**. 2008; 111(10):4841-4851.

Olney HJ, Le Beau MM. The Cytogenetics and Molecular Biology of Myelodysplastic Syndromes. In: Bennett JM editor. Myelodysplastic Syndromes: Pathobiology and Clinical Management. New York, Marcel Dekker, Inc. 2002:89-119

Olney HJ, Le Beau MM. The Cytogenetics and Molecular Biology of the Myelodysplastic Syndromes. In: Steensma DP editor. Myelodysplastic Syndromes:

Pathobiology and Clinical Management. 2nd Edition. New York, Informa Healthcare: 49-86, 2009.

PEDERSEN-BJERGAARD, J.; ANDERSEN, M. T.; ANDERSEN, M. K. Genetic pathways in the pathogenesis of therapy-related myelodysplasia and acute myeloid leukemia. **Hematology Am Soc Hematol Educ Program**, p. 392-7, 2007.

KITAGAWA, M. et al. Molecular pathology of myelodysplastic syndromes: biology of medullary stromal and hematopoietic cells (review). **Mol Med Report**, v. 4, n. 4, p. 591-6, Jul-Aug 2011.

Komrokji RS, Zhang L, Bennett JM. Myelodysplastic syndromes classification and risk stratification. **Hematol Oncol Clin North Am** 2010; 24:443-57

Schanz J, Tuchler H, Solé F, et al. New comprehensive cytogenetic scoring system for primary myelodysplastic syndromes (MDS) and oligoblastic acute myeloid leukemia after MDS derived from an international database merge. **J Clin Oncol** 2012; 30:820-29

SWERDLOW, S. H. et al. **WHO Classification of Tumors of Haematopoietic and Lymphoid Tissues**. 4. Lyon: International Agency for Research on Cancer, 2008.

Strom SS, Velez-Bravo V, Estey EH. Epidemiology of myelodysplastic syndromes. **Semin Hematol** 2008, v.45, n.1, p.8-13.

8. APÊNDICE

Sexo	Idade	Cariótipo	IPSS	Citogenética	FISH (5q31)	FISH(7q22-7q36)	FISH (SE8)
F	83	46,XX[12]	Baixo	Normal	NORMAL	NORMAL	NORMAL
F	28	46,XX[20]	Baixo	Normal	-	-	-
M	24	46,XY[9]	-	Normal	NORMAL	NORMAL	NORMAL
M	57	Ausencia de metafase.	-	Ausência	-	-	-
M	87	77~158<4n>XY[9]/46,XY[18]	Intermediário 1	Alterado	-	-	-
F	83	46,XX[20]	Intermediário 1	Normal	-	-	-
F	82	47,XX,del(5)(q31q33),+8[3]/48,XX,+8,+9[4]/48,XX,del(5)(q31q33),+8,+9[2]/46,XX[3]	Intermediário 1	Alterado	-	-	-
F	81	46,X,i(x)(q10),del(17)(q22q23.3)[7]/46,XX[13]	Intermediário 1	Alterado	-	-	-
F	69	46,XX,del(5)(q12q33)[18]/46,XX[2]	Baixo	Alterado	-	-	-
M	85	46,XY[20]	Baixo	Normal	-	-	-
F	59	46,XX,del(7)(q32)[5]/46,XX[17]	Intermediário 1	Alterado	-	-	-
F	41	AUSENCIA DE METAFASE		Ausência	-	-	-
F	86	46,XX[20]	Baixo	Normal	-	-	-
M	76	178~182<7N>,XXXXXXXXXXYYYYYYY...[24]/46,XY[5]	Baixo	Alterado	-	-	-
M	85	46,XY[15]	Baixo	Normal	-	-	-
M	23	46,XY[20]	Baixo	Normal	-	-	-
M	48	46,XY,del(4)(q31)[4]/46,XY,del(5)(q21q33)[3]/46,XY[15]	Intermediário 1	Alterado	-	-	-
M	67	Ausencia de metafase		Ausência	-	-	-
M	31	46,XY[24]	Intermediário 1	Normal	NORMAL	-	-
M	76	80~90<3n>,...[3]/46,XY,del(5)(q32),del(11)(q32),del(17)(p11.2)[7]/46,XY[11]	Intermediário 2	Alterado	-	-	-
M	74	Ausencia de metafase		Ausência	-	-	-
M	53	46,XY[20]	Baixo	Normal	-	-	-
F	65	46,XX[20]	Intermediário 1	Normal	-	-	-

F	70	Ausencia de metafase		Ausência	-	-	-
M	67	Ausencia de metafase		Ausência	-	-	-
M	66	46,XY[17]	Baixo	Normal	-	-	-
M	91	46,X-Y[4]/46,XY[16]	Baixo	Alterado	-	-	-
-	63	47,XY,+8[6]/47,XY,del(7)(q32),+8[7]/46,XY[2]	Alto	Alterado			
F	68	46,XX[5]		Normal	NORMAL	NORMAL	NORMAL
M	33	46,XY[5]		Normal	NORMAL	NORMAL	NORMAL
F	84	46,XX,del(20)(q13.1)[7]/46,XX[16]	Baixo	Alterado	-	-	-
M	57	43~44,X,-Y,-5,-18[6]/46,XY[14]	Intermediário 1	Alterado	-	-	-
F	75	46,XX[6]	Baixo	Normal	NORMAL	NORMAL	NORMAL
F	54	Ausencia de metafase		Ausência	-	-	-
F	90	46,XX,del(5)(q23)[7]/46,XX[6]	Intermediário 1	Alterado	-	-	-
F	71	AUSENCIA DE METAFASE		Ausência	-	-	-
M	62	47,XY,+15[10]/46,XY[10]		Alterado	-	-	-
M	45	47,XY,+mar[3]/46,XY[17]	Intermediário 1	Alterado	-	-	-
M	67	46,XY[20]	Intermediário 1	Normal	-	-	-
M	72	Ausencia de metafase		Ausência	-	-	-
M	89	46,XY[17]	Alto	Normal	-	-	-
M	35	46,XY[5]	Intermediário 1	Normal	NORMAL	NORMAL	NORMAL
M	83	46,XY,del(5)(?q22q33)[3]/45,XY,del(5)(?q22q33),-18[3]/46,XY[14]	Intermediário 1	Alterado	-	-	-
M	68	AUSENCIA DE METÁFASE		Ausência	-	-	-
F	74	AUSENCIA DE METÁFASE		Ausência	-	-	-
F	62	46,XX[20]	Baixo	Normal	-	-	-

M	80	46,XY,del(5)(q34),del(11)(q23)[7]/46,XY[5]	Intermediário2	Alterado	-	-	-
M	89	46,XY,del(5)(q31q35)[6]/46,XY[17]	Baixo	Alterado	-	-	-
M	84	Ausencia de metáfase		Ausência	-	-	-
F	42	Ausencia de metáfase		Ausência	-	-	-
M	76	46,XY[20]	Intermediário 1	Normal	-	-	-
F	69	46,XX[7]	Intermediário 1	Normal	NORMAL	NORMAL	NORMAL
M	79	AUSENCIA DE METAFASE		Ausência	-	-	-
M	65	46,XY,del(5)(q35),i(17)(q10)[3]/46,XY,del(5)(q35)[3]	Intermediário 1	Alterado	-	-	-
M	69	46,XY,del(5)(q15q33)[7]/46,XY[11]	Intermediário 1	Alterado	-	-	-
M	82	46,XY[10]		Normal	NORMAL	NORMAL	-
F	30	90,XXXX,-6,-7,-8,-11,+21,+22[5]/46,XX,del(7)(q23),del(20)(q13.1)[3]/45,XX,-7[5]/45~46,XX,-7,del(7)(q32),del(11)(q32),-17,del(17)(p11.2),del(20)(q13.1)[cp11]	Alto	Alterado	-	-	-
M	85	46,XY[3]	Baixo	Normal	NORMAL	NORMAL	NORMAL
M	72	47,XY,+22[5]/47,XY,del(5)(q31),+22[5]/46,XY[10]	Intermediário 1	Alterado	-	-	-
M	81	46,XY[20]	Intermediário 1	Normal	NORMAL	NORMAL	NORMAL
M	44	46,XY[5]	Baixo	Normal	NORMAL	NORMAL	NORMAL
M	83	42,XY-4,-5,-16,-22[10]	Intermediário 1	Alterado	-	-	-
M	78	AUSENCIA DE METAFASE		Ausência	-	-	-
M	42	47,XY,+8[4]/46,XY[5]	Intermediário 2	Alterado	-	-	-
M	66	47,XY,+mar[5],46,XY[11]	Intermediário 1	Alterado	-	-	-
M	45	46,XY,-?10,+mar[5]/46,XY[1]	Intermediário 1	Alterado	-	-	-
M	77	46,XY,add(13)(p11)[12]/46,XY,del(7)(q32),add(13)(p11)[4]/48,XY,add(13)(p11),+22,+mar[9]/48,XY,del(7)(q32),add(13)(p11),+22,+mar[3]/46,XY[2]	Intermediário 2	Alterado	-	-	-

M	86	AUSENCIA DE METAFASE		Ausência	-	-	-
M	82	89,XXY,-20,-22,-Y[4]/46,XY,del(16)(?q22)[5]/46,XY[11]	Intermediário 1	Alterado	-	-	-
M	49	47,XY,+mar[6]/48,XY,+8,del(16)(?q22),+mar[4]/47~50,XY,del(4)(?q35),+8,+10,+11,del(16)(?q22),+21,+mar[cp8]	Intermediário 2	Alterado	-	-	-
M	70	46,XY,del(5)(q33),del(11)(q23)[20]	Intermediário 1	Alterado	-	-	-
M	22	46,XY,-7,del(12)(p12.2p13)[8]/46,XY,-7,del(12)(p12.2o13),+mar[8]	Alto	Alterado	-	-	-
M	65	Ausencia de metafase		Ausência	-	-	-
M	54	Ausencia de metafase		Ausência			
M	90	46,XY[6]	Baixo	Normal	del5q31	NORMAL	-
M	59	Ausencia de metafase		Ausência			
M	47	46, XY[8]	Intermediário 1	Normal	NORMAL	NORMAL	NORMAL
F	63	AUSENCIA DE METÁFASE		Ausência			
M	48	46,XY[4]	Intermediário 1	Normal	NORMAL	NORMAL	-
M	64	37,X,-2,-3,-9,-11,-12,-15,-16,-18,-Y[8]/46,XY,del(5)(q15q33)[5]/46,XY[6]	Alto	Alterado	-	-	-
M	89	46,XY[10]	Intermediário 1	Normal	NORMAL	NORMAL	
M	80	AUSENCIA DE METÁFASE		Ausência	-	-	-
M	71	46,XY[17]	Baixo	Normal	-	-	-
F	60	46,XX[20]	Baixo	Normal	-	-	-
F	72	46,XX[25]	Intermediário 1	Normal	-	-	-
F	68	AUSENCIA DE METAFASE	2	Ausência	-	-	-
F	77	40-45,XX, -5, -6,-7,-9,-17[7]/46,xx,add(5)(p15)[3]/46,XX[14]	Intermediário 1	Alterado	-	-	-
F	47	46,XX[15]	Intermediário 1	Alterado	-	-	-
F	88	28~44,X,-X,-1,-3,-8,-10,-22[cp11]	Intermediário 1	Alterado	-	-	-
F	87	46,XX[10]	Baixo	Normal	NORMAL	NORMAL	
F	54	46,XX[13]	Baixo	Normal	-	-	-

F	59	AUSENCIA DE METAFASE		Ausência	NORMAL	NORMAL	-
F	66	AUSENCIA DE METAFASE		Ausência	-	-	-
F	42	46,XX,del(5)(q15q33)[9]/46,XX,del(5)(q15q33),del(11)(?q25)[7]/46,XX[4]		Alterado	-	-	-
F	86	46,XX[5]	Baixo	Normal	NORMAL	NORMAL	-
F	57	46,XX[8]	Intermediário 1	Normal	NORMAL	NORMAL	-
F	60	45,X,-X[20]/46,XX[4]	Intermediário 2	Alterado	-	-	-
F	71	AUSENCIA DE METÁFASE		Ausência	-	-	-
F	75	46,XX[27]	Intermediário 1	Normal	-	-	-
F	83	46,XX[20]	Baixo	Normal	-	-	-
F	72	AUSENCIA DE METÁFASE		Ausência	-	-	-
F	83	46,XX[20]	Baixo	Normal	-	-	-
F	98	AUSENCIA DE METÁFASE		Ausência	-	-	-
F	68	AUSENCIA DE METÁFASE		Ausência	-	-	-
F	41	44,XX,-13,-17[4]/46,XX[5]	Intermediário 1	Alterado	-	-	-
F	55	AUSENCIA DE METAFASE		Ausência	-	-	-
F	60	47,XX,+mar[5]/46,XX[15]	Baixo	Alterado	-	-	-
F	84	AUSENCIA DE METAFASE		Ausência	-	-	-
F	87	AUSENCIA DE METAFASE		Ausência	-	-	-
F	72	AUSENCIA DE METAFASE		Ausência	-	-	-
F	44	46,XX[20]	Intermediário 2	Normal	-	-	-
F	82	46,XX[5]	Baixo	Normal	NORMAL	NORMAL	NORMAL
F	23	46,XX[20]	Intermediário 1	Normal	-	-	-
F	70	46,XX,del(11)(q23)[9]/46,XX[5]	Intermediário 1	Alterado	-	-	-
F	64	46,XX,?add(15)(q22),?del(17)(q21)[10]/46,XX[16]	Intermediário 2	Alterado	-	-	-
F	77	AUSENCIA DE METAFASE		Ausência	-	-	-
F	46	46,XX[8]	Baixo	Normal	NORMAL	NORMAL	NORMAL

M	76	71~99<4N>,XY...[4]/46,XY,del(17)(p11.2)[9]/46,XY[7]	Intermediário 1	Alterado	-	-	-
M	58	46,XY,del(5)(?q15q33)[8]/46,XY[12]	Intermediário 1	Alterado	-	-	-
M	49	AUSENCIA DE METAFASE		Ausência	NORMAL	NORMAL	-
M	67	AUSENCIA DE METAFASE		Ausência	-	-	-
M	82	AUSENCIA DE METAFASE		Ausência	-	-	-
F	83	46,XX [4]	Baixo	Normal	NORMAL	NORMAL	NORMAL
F	65	AUSENCIA DE METAFASE		Ausência	DEL 5Q31	NORMAL	NORMAL
M	74	46,XY[11]	Intermediário 1	Normal	-	-	-
M	59	46,XY,del(1)(q31)[3]/46,XY,-1,+mar1[2]/47,XY,add(13)(q31),+mar2[3]/46,XY[3]	Intermediário 1	Alterado	-	-	-
F	25	46,XX,del(5)(q15q33)[4]/46,XX[18]	Baixo	Alterado	-	-	-
F	77	46,XX[3]	Intermediário 1	Normal	NORMAL	NORMAL	-
F	81	47,XX,t(4;11)(q27;q32),+mar[4]/46,XX[16]	Intermediário 1	Alterado	-	-	-
M	79	46,XY[7]	Baixo	Normal	NORMAL	NORMAL	
M	68	46,XX[5]	Intermediário 1	Normal	NORMAL	NORMAL	
F	74	46,XX[12]	Baixo	Normal	-	-	-
M	76	45,X,-Y[18]/46,XY[7]	Baixo	Alterado	-	-	-
F	78	46,XX[14]	Intermediário 1	Normal	-	-	-
M	73	AUSENCIA DE METAFASE		Ausência	-	-	-
M	67	AUSENCIA DE METAFASE		Ausência	-	-	-
F	81	46,XX[11]	Baixo	Normal	-	-	-

