



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
DEPARTAMENTO DE MEDICINA CLÍNICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS MÉDICAS
MESTRADO EM CIÊNCIAS MÉDICAS**

DANIELA DE PAULA BORGES

**ESTUDO DE ALVOS MOLECULARES RELACIONADOS À MITOSE E AO CICLO
CELULAR EM PACIENTES PORTADORES DE SÍNDROME MIELODISPLÁSICA**

FORTALEZA

2017

DANIELA DE PAULA BORGES

ESTUDO DE ALVOS MOLECULARES RELACIONADOS À MITOSE E AO CICLO
CELULAR EM PACIENTES PORTADORES DE SÍNDROME MIELODISPLÁSICA

Dissertação apresentada ao Curso de
Mestrado Acadêmico em Ciências Médicas,
do Departamento de Medicina Clínica, da
Universidade Federal do Ceará, como
requisito para obtenção do título de Mestre em
Ciências Médicas.

Orientador: Prof. Dr. Ronald Feitosa Pinheiro

FORTALEZA

2017

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca Universitária

Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

B731e Borges, Daniela de Paula.

Estudo de alvos moleculares relacionados à mitose e ao ciclo celular em pacientes portadores de Síndrome Mielodisplásica / Daniela de Paula Borges. – 2016.

113 f. : il. color.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas, Fortaleza, 2016.

Orientação: Prof. Dr. Ronald Feitosa Pinheiro.

1. Síndrome mielodisplásica. 2. ciclo celular. 3. fuso mitótico. 4. ponto de checagem mitótico. I. Título. CDD
610

*Aos meus pais.
À minha tia Terezinha.*

AGRADECIMENTOS

A **Deus**, por ter permitido que eu chegasse até aqui e por ter me sustentado em todos os momentos.

Aos meus pais **José Luiz de Paula Borges** e **Leonina Batista Rosa de Paula Borges**, pelo apoio, compreensão e amor incondicionais, por sempre acreditarem em mim, me incentivarem e quererem o meu melhor. Nunca terei como agradecer-los o suficiente.

Aos meus irmãos, **Douglas** e **Elomar**, com quem compartilho todos os momentos desde os nossos nascimentos e por quem também tenho amor incondicional.

À minha tia **Terezinha Schwenck**, que teve um papel importantíssimo na minha formação acadêmica, que sempre me incentivou a continuar e sempre esteve presente, apesar da distância geográfica.

Ao **Dr. Ronald Feitosa Pinheiro**, por ter me dado a oportunidade de participar deste grupo, pelos conhecimentos compartilhados e pela confiança depositada.

Aos membros das bancas de qualificação e defesa, **Howard Lopes Ribeiro Júnior**, **Fabíola Fernandes Heredia**, **Profa. Dra. Cláudia do Ó Pessoa**, **Dra Juliana Cordeiro de Sousa** e **Dr. Carlos Roberto Koscky Paier**, por terem aceitado o convite e pela boa vontade que sempre dispõem em ajudar e contribuir cientificamente.

À **Marília** e **Izabelle**, por estarem sempre “no mesmo barco”, compartilhando todos os momentos de desespero e de realizações, pelos momentos de amizade e de companheirismo e por serem apoio uma para as outras. E também à **Roberta**, que apesar de estarmos em fases diferentes, sempre acompanhou cada etapa junto com a gente, diminuindo a tensão e estando presente para o que fosse preciso. Por termos passado por tantos momentos ruins, mas conseguirmos superá-los juntas.

Ao meu IC **Wesley**, cuja participação foi essencial para o desenvolvimento e conclusão desse trabalho. Pela disponibilidade em ajudar em qualquer dia (inclusive sábados...) e qualquer horário, pelo otimismo, por tornar a caminhada mais fácil e pela amizade dentro e fora do laboratório.

Às minhas pessoas **Luana** e **André**, pela amizade de sempre, por serem um apoio nos meus piores momentos, por nunca me deixarem desistir e por acreditarem em mim até mais do que eu.

À **Juliana Cordeiro**, por todas as orientações e estímulos, por sempre torcer pelo nosso sucesso e por todos momentos de alegria compartilhados.

À **Milena**, por sempre estar disposta a ouvir e aconselhar, pela sua amizade e pelo seu importante papel na minha vida acadêmica.

Ao *NossoPG* (**Andressa, Adriane, Evelyn, Carol, Rafael e Aécio**), por todo apoio e ajuda, principalmente espiritual, durante todos os momentos dessa caminhada, por sempre me escutarem e apoiarem e por saber que posso contar com cada um de vocês.

É um agradecimento mais do que especial a todos os integrantes do Laboratório de Citogenômica do Câncer (**Rinna, Marília, Izabelle, Roberta, Wesley, Gabriel, Kézia, Bruna Badalo, Bruna Garota, Gabi, Mayumi, Anacélia, Manu, Mayara, Germana, Cinthya**), por todos os momentos de companheirismo, brincadeiras, aprendizado, por fazerem parte da minha vida e por tornarem o meu dia-a-dia mais leve e mais alegre.

À **Ivone** e à **Rita**, pela paciência e pela disposição em resolver tudo e solucionar todo nosso desespero quase contínuo.

Ao **CNPq** e à **CAPES** pelo apoio financeiro a essa pesquisa.

“Talvez não tenha conseguido fazer o melhor, mas lutei para que o melhor fosse feito. Não sou o que deveria ser, mas Graças a Deus, não sou o que era antes”.

(Martin Luther King)

“A persistência é o menor caminho do êxito”.

(Charles Chaplin)

RESUMO

A síndrome mielodisplásica (SMD) representa um grupo heterogêneo de doenças clonais caracterizado por insuficiência medular, aumento da apoptose e risco aumentado de evolução para Leucemia Mielóide Aguda (LMA). Proteínas relacionadas ao fuso mitótico (*TPX2*) e ao ponto de checagem mitótico (*MAD2*, *CDC20*) estão diretamente relacionadas com a estabilidade cromossômica e desenvolvimento de tumores. Sendo assim, este estudo tem como objetivo avaliar os níveis de expressão desses genes em pacientes portadores de síndrome mielodisplásica (SMD). A análise de expressão gênica foi realizada utilizando-se a metodologia de PCR em tempo real, a partir de amostras de medula óssea de 101 pacientes diagnosticados com SMD e 10 indivíduos controles saudáveis. Após a análise da expressão gênica, identificamos que os níveis de expressão do gene *CDC20* encontram-se aumentados em pacientes com displasia megacariocítica ($p=0,024$), trombocitopenia ($p=0,000$) e em pacientes de alto risco ($p=0,014$, $0,018$). *TPX2* também se encontra com expressão diminuída em pacientes com displasia megacariocítica ($p=0,009$). Os níveis de expressão do *MAD2* estão diminuídos em pacientes com 2 ou 3 citopenias ($p=0,000$) e contagem de neutrófilos inferior a $800/\text{mm}^3$. Foi observada uma diminuição na expressão dos genes *AURKA* e *AURKB* foram observados em pacientes que apresentavam cariótipo alterado ($p=0,000$), displasia em 3 linhagens ($p=0,000$; $p=0,017$) (*AURKA*) e hemoglobina inferior a 8g/dL ($p=0,024$) (*AURKB*). Os pacientes que apresentaram baixa expressão de *AURKA* e *AURKB* também apresentaram baixa sobrevida global e pacientes com aumento dos níveis de expressão de *CDKN1A* estão associados a uma pior sobrevida global ($p=0,000$). Os níveis de expressão da *AURKA*, *AURKB* e *MAD2* ($p=0,000$; $p=0,001$; $p=0,025$) encontram-se diminuídos em pacientes com medula óssea hipocelular, associado a uma alta frequência de alterações cromossômicas e altas taxas de mortalidade. Neste estudo, observamos correlações clínicas significantes com relação aos genes *AURKA*, *AURKB*, *MAD2*, *CDC20*, *TPX2* e *CDKN1A*, reafirmando a importância do estudo desses genes em pacientes com SMD, a fim de aprimorar os conhecimentos sobre a patogênese e evolução dessa síndrome.

Palavras-chave: Síndrome mielodisplásica, ciclo celular, fuso mitótico, ponto de checagem mitótico.

ABSTRACT

Myelodysplastic syndrome (MDS) are a heterogeneous group of clonal disease characterized by insufficiency of bone marrow, increase of apoptosis and increased risk of acute myeloid leukemia (AML) progression. Proteins related to the mitotic spindle (*AURKA*, *AURKB*, *TPX2*), to the mitotic checkpoint (*MAD2*, *CDC20*) and the regulation of the cell cycle (*CDKN1A*) are directly related to chromosome stability and tumor development. This study aimed to evaluate the mRNA expression levels of these genes in 101 MDS patients and 10 healthy volunteers, using a real-time PCR methodology. After the analysis of mRNA expression, we identified that *CDC20* gene expression levels are increased in patients with dysmegakaryopoiesis ($p=0.024$), thrombocytopenia ($p=0.000$) and high-risk patients ($p=0.014$, 0.018 .) *MAD2* expression levels are decreased in patients with 2 or 3 cytopenias ($p=0.000$) and neutrophil below $800/\text{mm}^3$. *TPX2* is also overexpressed in patients presenting dysmegakaryopoiesis ($p=0.009$). A decrease in *AURKA* and *AURKB* gene expression levels were observed in patients with altered karyotype ($p=0.000$), who presented dysplasia in 3 lineages ($p=0.000$; 0.017) (*AURKA*) and hemoglobin inferior to 8g/dL ($p=0.024$) (*AURKB*). Patients with decreased *AURKA* and *AURKB* showed low overall survival and increased levels of *CDKN1A* expression are associated with poorer overall survival ($p=0.000$). The mRNA expression of *AURKA*, *AURKB* and *MAD2* ($p=0.000$; $p=0.001$; $p=0.025$) were decreased in patients with hypoplastic MDS, associated with a high frequency of chromosomal alterations and high mortality rate. In this investigation, we found significant clinical correlations regarding *AURKA*, *AURKB*, *MAD2*, *CDC20*, *TPX2* e *CDKN1A*, reaffirming the importance of studying these genes in MDS patients, to provide a better comprehension of the syndrome pathogenesis and evolution.

Key Words: Myelodysplastic syndrome, cell cycle, mitotic spindle, mitotic checkpoint.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Classificação prognóstica do IPSS-R de acordo com as categorias citogenéticas	23
Figura 2: Categorias de risco e escores prognósticos segundo o IPSS-R	23
Figura 3: Estágios do desenvolvimento da SMD.	26
Figura 4: Ligação dos cinetócoros ao fuso mitótico e separação dos cromossomos.	28
Figura 5: Regulação do CPA pelo complexo MAD2 e CDC20	29
Figura 6: Ação da Aurora A e Aurora B na progressão mitótica.	31
Figura 7: Ativação da AURKA pela TPX2.	34
Figura 8: Representação esquemática dos procedimentos de expressão gênica por qPCR.	40
Figura 9: Representação dos resultados encontrados na citogenética por banda G.	48
Figura 10: Níveis de expressão do gene TPX2 em pacientes com SMD em relação a presença de dismegacariopoiese na MO.	55
Figura 11: Níveis de expressão do gene TPX2 em relação a fibrose na MO.	56
Figura 12: Níveis de expressão do gene AURKA em pacientes com SMD em relação aos indivíduos controle.	57
Figura 13: Níveis de expressão do gene AURKA em pacientes com SMD em relação a celularidade da MO.	58
Figura 14: Níveis de expressão do gene AURKA em pacientes com SMD em relação ao número de displasias na MO.	59
Figura 15: Níveis de expressão do gene AURKA em pacientes com SMD em relação a presença de sideroblastos em anel na MO.	59
Figura 16: Níveis de expressão do gene AURKA em pacientes com SMD em relação ao cariótipo.	60
Figura 17: Níveis de expressão do gene AURKA em pacientes com SMD em relação ao cariótipo com alteração no cromossomo 5.	61

Figura 18: Níveis de expressão do gene AURKA em pacientes com SMD em relação ao cariótipo com alteração no cromossomo 7.	61
Figura 19: Níveis de expressão do gene AURKA em pacientes com SMD em relação ao cariótipo com aneuploidia.	62
Figura 20: Níveis de expressão do gene AURKA em pacientes com SMD em relação ao números de alterações no cariótipo.	62
Figura 21: Níveis de expressão do gene AURKB em pacientes com SMD em relação celularidade da MO.	63
Figura 22: Níveis de expressão do gene AURKB em pacientes com SMD em relação a fibrose na MO.	64
Figura 23: Níveis de expressão do gene AURKB em pacientes com SMD em relação a presença de sideroblastos em anel na MO.	64
Figura 24: Níveis de expressão do gene AURKB em pacientes com SMD em relação ao número de citopenias no SP.	65
Figura 25: Níveis de expressão do gene AURKB em pacientes com SMD em relação a hemoglobina.	66
Figura 26: Níveis de expressão do gene AURKB em pacientes com SMD em relação ao cariótipo	66
Figura 27: Níveis de expressão do gene MAD2 em pacientes com SMD em relação ao grupo controle	67
Figura 28: Níveis de expressão do gene MAD2 em pacientes com SMD em relação a celularidade da MO.	68
Figura 29: Níveis de expressão do gene MAD2 em pacientes com SMD em relação a contagem de neutrófilos no SP.	69

Figura 30: Níveis de expressão do gene MAD2 em pacientes com SMD em relação ao número de citopenias no SP.	69
Figura 31: Níveis de expressão do gene CDC20 em pacientes com SMD em relação a fibrose medular.	70
Figura 32: Níveis de expressão do gene CDC20 em pacientes com SMD em relação a presença de dismegacariopoiese.	71
Figura 33: Níveis de expressão do gene CDC20 em pacientes com SMD em relação a contagem de plaquetas no SP.	72
Figura 34: Níveis de expressão do gene CDC20 em pacientes com SMD em relação a classificação de risco segundo o IPSS-R.	73
Figura 35: Níveis de expressão do gene CDKN1A em pacientes com SMD em relação ao grupo controle.	74
Figura 36: Representação esquemática dos resultados encontrados	75
Figura 37: Análise de correlação dos níveis de expressão dos genes TPX2 e CDC20 em pacientes com SMD.	76
Figura 38: Análise de correlação dos níveis de expressão dos genes AURKA e AURKB em pacientes com SMD.	77
Figura 39: Análise de correlação dos níveis de expressão dos genes AURKB e CDC20 em pacientes com SMD.	77
Figura 40: Análise de correlação dos níveis de expressão dos genes TPX2 e AURKA em pacientes com SMD.	78
Figura 41: Análise de correlação dos níveis de expressão dos genes TPX2 e AURKB em pacientes com SMD.	79
Figura 42: Análise de correlação dos níveis de expressão dos genes AURKA e MAD2 em pacientes com SMD.	79

Figura 43: Análise de correlação dos níveis de expressão dos genes AURKA e CDC20 em pacientes com SMD.	80
Figura 44: Análise de correlação dos níveis de expressão dos genes TPX2 e MAD2 em pacientes com SMD	81
Figura 45: Análise de correlação dos níveis de expressão dos genes AURKA e CDKN1A em pacientes com SMD	81
Figura 46: Análise de correlação dos níveis de expressão dos genes AURKB e MAD2 em pacientes com SMD	82
Figura 47: Análise de correlação dos níveis de expressão dos genes MAD2 e CDC20 em pacientes com SMD	82
Figura 48: Análise de correlação dos níveis de expressão dos genes CDC20 e CDKN1A em pacientes com SMD	83
Figura 49: Análises de associação entre o nível de expressão do gene AURKA e a sobrevida dos pacientes com SMD. A. Gráfico de curva de sobrevida (Kaplan-Meyer). B. Gráfico de obtenção de Cutoff a partir da otimização por correlação com a sobrevida.	84
Figura 50: Análises de associação entre o nível de expressão do gene AURKB e a sobrevida dos pacientes com SMD. A. Gráfico de curva de sobrevida (Kaplan-Meyer). B. Gráfico de obtenção de Cutoff a partir da otimização por correlação com a sobrevida.	85
Figura 51: Análise de associação entre o nível de expressão do gene CDKN1A e a sobrevida dos pacientes com SMD. A. Gráfico de curva de sobrevida (Kaplan-Meyer). B. Gráfico de obtenção de Cutoff a partir da otimização por correlação com a sobrevida.	86

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Classificação da SMD segundo os critérios da OMS de 2008.	21
Tabela 2: Classificação da SMD segundo os critérios da OMS de 2016.	22
Tabela 3: Classificação da SMD segundo os critérios do WPSS de 2011.	24
Tabela 4: Sondas utilizadas na avaliação da expressão gênica por PCR em Tempo Real	39
Tabela 5: Frequência das variáveis clínicas dos pacientes.	46
Tabela 6: Caracterização dos pacientes segundo a classificação da OMS 2008	47
Tabela 7: Caracterização da citogenética e impacto prognóstico.	49
Tabela 8: Caracterização dos grupos de risco dos pacientes com SMD.	50
Tabela 9: Descrição clínica dos pacientes.	51
Tabela 10: Caracterização dos cutoffs na análise de associação entre os níveis de expressão dos genes e a sobrevida dos pacientes com SMD	83

LISTA DE ABREVIATURAS

ANC	<i>Contagem Absoluta de Neutrófilos</i>
ANPC	<i>Antígeno Nuclear de Proliferação Celular</i>
AR	<i>Anemia Refratária</i>
AREB	<i>Anemia Refratária com Excesso de Blastos</i>
AREB-T	<i>Anemia Refratária com Excesso de Blastos em Transformação</i>
ARSA	<i>Anemia Refratária com Sideroblastos em Anel</i>
AURKA	<i>Aurora Kinase A</i>
AURKB	<i>Aurora Kinase B</i>
B2M	<i>Beta-2-Microglobulina</i>
CCM	<i>Complexo de Controle Mitótico</i>
CDC20	<i>Cell division cycle 20</i>
CDKN1A	<i>Cyclin-dependent kinase inhibitor 1^a</i>
cDNA	<i>DNA complementar</i>
CPA	<i>Complexo Promotor da Anáfase</i>
CRDM	<i>Citopenia Refratária com Displasia em Múltiplas Linhagem</i>
CRDU	<i>Citopenia Refratária com Displasia em Única Linhagem</i>
DNA	<i>Ácido Desoxirribonucleico</i>
FAB	<i>Franco-Americano-Britânico</i>
GAPDH	<i>Gliceraldeído fosfato desidrogenase</i>
Hb	<i>Hemoglobina</i>
IPSS	<i>International Prognostic Score System</i>
IPSS-R	<i>Revised International Prognostic Score System</i>
ISCN	<i>Sistema Internacional de Nomenclatura Citogenética Humana</i>
LLA	<i>Leucemia Linfóide Aguda</i>
LMA	<i>Leucemia Mielóide Aguda</i>
LMMC	<i>Leucemia Mielomonocítica Aguda</i>
MAD2	<i>Mitotic arrest defective type 2</i>
MO	<i>Medula Óssea</i>

NR	<i>Neutropenia Refratária</i>
OMS	<i>Organização Mundial de Saúde</i>
OR	<i>Oddis Ratio</i>
qPCR	<i>PCR quantitativa em Tempo Real</i>
RNA	<i>Ácido Ribonucleico</i>
SMD	<i>Síndrome Mielodisplásica</i>
SEERS	<i>Surveillance, Epidemiology and End Results</i>
TPX2	<i>Xenopus kinesin-like protein 2</i>
TR	<i>Trombocitopenia Refratária</i>
t-SMD	<i>SMD relacionada a terapia</i>
UBC	<i>Ubiquitina C</i>
WPSS	<i>WHO classification-based Prognostic Scoring System</i>

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	19
1.1. Aspectos gerais da Síndrome Mielodisplásica	19
1.2. Etiologia	19
1.3. Classificação	20
1.3.1. Classificação Clínica da SMD.....	20
1.3.2. Classificação prognóstica da SMD.....	22
1.4. Epidemiologia.....	24
1.5. Patogênese.....	25
1.6. Citogenética	26
1.7. Controle e regulação do Ciclo Celular	27
1.7.1. Genes relacionados ao ponto de checagem mitótico.....	28
1.7.2. Genes relacionados ao fuso mitótico.....	30
1.7.2.1. Aurora B.....	31
1.7.2.2. Aurora A.....	32
1.7.2.3. TPX2	33
1.7.3. Genes reguladores do ciclo celular (<i>CDKN1A</i>).....	35
2. OBJETIVOS.....	36
2.1. Objetivo Geral.....	36
2.2. Objetivos Específicos	36
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	37
3.1. Seleção de amostras	37
3.2. Aspectos Éticos	37
3.3. Coleta das amostras	37
3.4. Cariótipo por Banda G.....	38
3.5. Extração de RNA total	38
3.6. Síntese de cDNA	39
3.7. qPCR (PCR quantitativa em tempo real).....	39
3.8. Análise Estatística	41
3.8.1. Análise dos dados de expressão gênica.....	41
3.8.2. Avaliação da associação entre os dados de expressão e a sobrevida dos pacientes ...	42
3.9. Variáveis analisadas	43

4. RESULTADOS.....	45
4.1. Caracterização dos pacientes	45
4.2. Análise da expressão gênica por qPCR.....	55
4.2.1. Análise da expressão do gene <i>TPX2</i>	55
4.2.2. Análise da expressão do gene <i>AURKA</i>	56
4.2.3. Análise da expressão do gene <i>AURKB</i>	63
4.2.4. Análise da expressão do gene <i>MAD2</i>	67
4.2.5. Análise da expressão do gene <i>CDC20</i>	70
4.2.6. Análise da expressão do gene <i>CDKN1A</i>	73
4.3. Análise de correlação entre os níveis de expressão gênica	76
4.4. Análise de sobrevida em relação aos níveis de expressão gênica.....	83
5. DISCUSSÃO.....	87
6. CONCLUSÕES	93
7. REFERÊNCIAS	94
APÊNDICE A - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido do Paciente	108
APÊNDICE B - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido do Voluntário	111

1. INTRODUÇÃO

1.1. Aspectos gerais da Síndrome Mielodisplásica

A síndrome mielodisplásica (SMD) representa um grupo heterogêneo de doenças clonais caracterizado por insuficiência na medula óssea e aumento da apoptose, o que leva à hematopoiese ineficaz e citopenias no sangue periférico em uma ou mais linhagens (GREENBERG et al, 2013; ADES et al, 2014; PFEILSTOCKER et al, 2016), podendo levar à dependência transfusional e ao aumento da susceptibilidade a infecções e hemorragias (MALCOVATI et al, 2011). Com a progressão da doença, há o risco de 30 a 40% de os pacientes desenvolverem leucemia mieloide aguda (LMA) (DOLATSHAD et al., 2015). A SMD está entre as neoplasias mais desafiadoras com relação a diagnóstico e classificação, porque as características clínicas dos pacientes podem variar muito, mesmo entre pacientes de um mesmo subgrupo (VARDIMAN et al, 2008; BEJAR, 2014). Apesar dos diversos avanços nas pesquisas moleculares, o diagnóstico da SMD ainda é baseado nas características clínicas e morfológicas (SHAHRABI et al, 2016).

A principal característica clinico-laboratorial da SMD é a presença de citopenias, principalmente a anemia (MALCOVATI et al, 2008). Os achados morfológicos da SMD geralmente incluem medula óssea hiperclular ou normocelular (cerca de 10% dos pacientes apresentam medula hipocelular), displasias, bloqueio de diferenciação e aumento de blastos ou de sideroblastos em anel (YIN et al, 2010; ADES et al, 2014).

1.2. Etiologia

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

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

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

1.3. Classificação

1.3.1. Classificação Clínica da SMD

O primeiro sistema de classificação da SMD foi criado pelo grupo Franco-Americano-Britânico (FAB) que definiu subgrupos da SMD baseados na morfologia e percentual de blastos na medula óssea (30%) (BENNETT et al, 1982). A classificação FAB divide a SMD em cinco subtipos: Anemia Refratária (AR), Anemia Refratária com Sideroblastos em Anel (ARSA), Anemia Refratária com Excesso de Blastos (AREB), AREB em transformação (AREB-T) e Leucemia Mielomonocítica Crônica (LMMC) (BENNETT et al, 1982). Apesar das suas limitações, a classificação FAB foi utilizada como base para o diagnóstico da SMD por mais de duas décadas (SENENT et al, 2013).

Em 2001, foi proposto um sistema de classificação pela Organização Mundial de Saúde (OMS), que incorpora várias definições da classificação FAB, incorporando outras características relevantes, como a adição da citogenética, e, principalmente, redefinir o limiar da porcentagem de blastos, na medula óssea (MO), que delimita as fronteiras entre a SMD e a LMA, diminuindo de 30% para 20% de blastos na medula óssea (JAFFE et al, 2001; VARDIMAN et al, 2002, VARDIMAN et al, 2009; SENENT et al, 2013).

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

Em 2008 foi publicada uma atualização da classificação pela OMS, que divide a SMD em sete subgrupos, sendo a principal mudança a estratificação do subgrupo Anemia Refratária (AR), agora incluso no subgrupo Citopenia Refratária com Displasia em Única Linhagem (CRDU), que se divide, além da AR, em Neutropenia Refratária (NR) e Trombocitopenia Refratária (TR) (SWERDLOW et al, 2008; VARDIMAN et al, 2009; SENENT et al, 2013). As características de cada subgrupo se encontram na Tabela 1.

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

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

Fonte: Adaptado de Swerdlow et al (2008)

Recentemente, no ano de 2016, foi lançada uma nova revisão da classificação da OMS, que, apesar dos recentes avanços no estudo molecular da SMD, traz poucas mudanças com relação à classificação de 2008 (STEENSMA, 2016). As principais alterações foram a substituição dos termos “anemia refratária” e “citopenia refratária” por “síndrome mielodisplásica” e a adição da mutação do gene *Splicing factor 3B subunit 1 (SF3B1)* para definir a porcentagem de sideroblastos em anel no subgrupo, agora intitulado como SMD com sideroblastos em anel (ARBER et al, 2016). As características de cada subgrupo se encontram na Tabela 2.

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

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

*Na presença de mutação do gene *SF3B1*. [†]1% de blastos deve ser encontrado em pelo menos duas situações isoladas.

Fonte: Adaptado de Arber et al (2016)

1.3.2. Classificação prognóstica da SMD

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

O IPSS de 1997 utilizou 816 pacientes classificados como SMD primária. As variáveis utilizadas foram o número de citopenias periféricas (0/1 e 2/3), a porcentagem de blastos na medula óssea e três grupos de citogenética, favorável (cariótipo normal, del(5q), del(20q) e -Y), desfavorável (cariótipo complexo e alterações envolvendo o cromossomo 7) e intermediário (demais alterações) (GREENBERG et al, 1997). Cada variável recebe um escore diferente, e a soma dos escores leva à um grupo de risco, sendo eles: baixo risco, intermediário 1 e 2 e alto risco (GREENBERG et al, 1997).

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

Figura 1: Classificação prognóstica do IPSS-R de acordo com as categorias citogenéticas

Muito Favorável	Favorável	Intermediário	Desfavorável	Muito Desfavorável
<ul style="list-style-type: none"> Única: del(11q)-Y 	<ul style="list-style-type: none"> Normal Única: del(5q) del(12p) del(20p) Dupla: Incl. del(5q) 	<ul style="list-style-type: none"> Única: del(7q)+8 i(17q)+19 Qualquer outra Dupla: Qualquer outra 	<ul style="list-style-type: none"> Única: del(3q)-7 Dupla: Incl. -7/7q- Complexo: 3 alterações 	<ul style="list-style-type: none"> Complexo: > 3 alterações

Fonte: Adaptado de Greenberg et al (2012)

Figura 2: Categorias de risco e escores prognósticos segundo o IPSS-R

VARIÁVEIS	0	0,5	1	1,5	2	3	4
Cariótipo	Muito Favorável		Favorável		Intermediário	Desfavorável	Muito Desfavorável
Blastos MO (%)	≤2		>2 a <5		5 a 10	>10	
Hb (g/dL)	≥10		8 a <10	<8			
ANC (mm ³)	≥800		<800				
Plaquetas (mil cél/mm ³)	≥100	50 a <100	≤50				

CATEGORIA DE RISCO					
	Muito Baixo	Baixo	Intermediário	Alto	Muito Alto
Escores	≤1,5	>1,5- 3	>3-4,5	>4,5-6	>6
Sobrevida (anos)	8,8	5,3	3	1,6	0,8

Legenda: Hb = Hemoglobina; ANC = Contagem absoluta de neutrófilos; MO = Medula óssea.

Fonte: Adaptado de Greenberg et al (2012)

Em 2005, Malcovati e colaboradores desenvolveram um novo sistema de classificação para a SMD, o WPSS (*WHO classification-based Prognostic Scoring System*) utilizando as características definidas pela OMS e pelo IPSS, com a adição da variável dependência transfusional, considerada pelos autores como um fator com grande impacto na sobrevivência dos pacientes. Esse sistema de classificação divide os pacientes com SMD em quatro grupos de risco (Tabela 3) (MALCOVATI et al, 2005).

Tabela 3: Classificação da SMD segundo os critérios do WPSS de 2011.

VARIÁVEL	GRUPO DE RISCO / ESCORES			
	Muito Baixo 0	Baixo 1	Intermediário 2	Alto 3
Classificação OMS	CRDU, ARSA, 5q ISOLADA	CRDM	AREB I	AREB II
Cariótipo	Favorável: Normal, -Y, del(5q), del(20q)	Intermediário: Demais alterações	Desfavorável: Complexo e del(7q)/-7	
Anemia severa Homens: Hb < 9g/dL Mulheres: Hb < 8g/dL	Ausência	Presença		

Fonte: Adaptado de Malcovati et al (2011)

1.4. Epidemiologia

A SMD ocorre predominantemente em pacientes idosos, com idade superior a 65 anos ao diagnóstico, menos de 10% dos casos ocorre em pacientes com idade inferior a 50 anos, com um predomínio de pacientes do sexo masculino (ADES et al, 2014; LEE et al, 2016). A incidência da SMD varia muito de acordo com a região geográfica (BEJAR E STEENSMA, 2014).

De acordo com um levantamento do SEERS (*Surveillance, Epidemiology and End Results*) a taxa de incidência global pode chegar a 36 casos por 100.000 habitantes em pacientes com idade superior a 80 anos (SEKERES, 2010; COGLE, 2015). Na China e região Sul da Ásia, pacientes mais jovens são mais frequentemente diagnosticados com SMD e a presença de cariótipo complexo é mais comum, podendo estar relacionados a causas genéticas ou ambientais (ADES et al, 2014; BEJAR E STEENSMA, 2014).

O primeiro estudo da incidência da SMD no Brasil foi realizado por Magalhães e colaboradores em 2010, onde foram avaliados 476 casos de SMD oriundos de 12 instituições das regiões Nordeste, Sudeste, Sul e Centro-Oeste, detectando uma mediana de idade de 68 anos, sendo a maioria de origem urbana (MAGALHAES et al, 2010).

Em 2015 Belli e colaboradores, dentre eles o nosso grupo de pesquisadores compostos pelos professores Ronald Feitosa Pinheiro e Silvia Maria Meira Magalhaes, realizaram um

estudo epidemiológico na América do Sul, avaliando 1080 pacientes do Brasil, Argentina e Chile (BELLI, et al., 2015). A média de idade dos pacientes brasileiros foi de 68 anos, da Argentina 69 e do Chile 64 anos, com predomínio de pacientes do sexo masculino, do subgrupo CRDM (OMS 2008) e de baixo risco, segundo o IPSS-R (BELLI, et al., 2015).

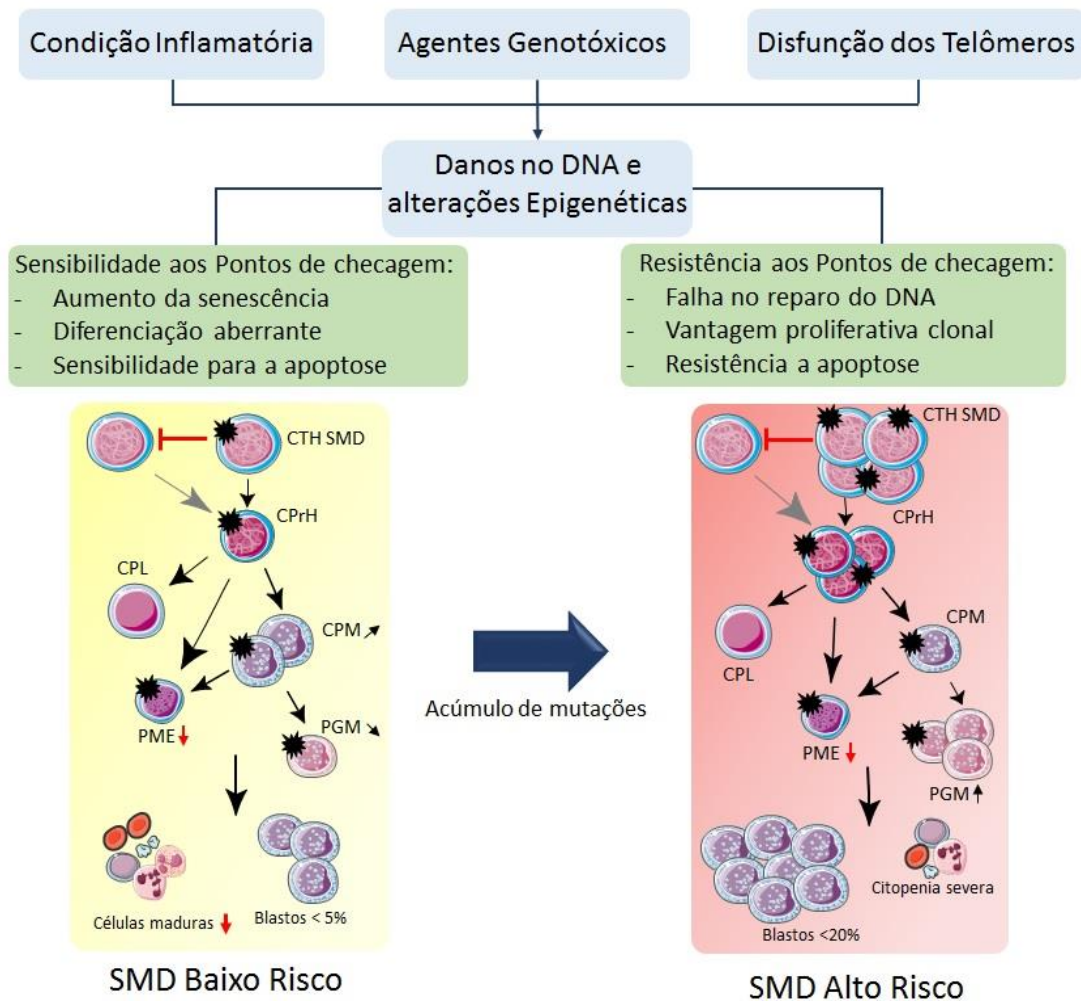
1.5. Patogênese

A patogênese da SMD ainda é pouco compreendida. O clone anômalo e geneticamente instável de precursor de células hematopoiéticas se desenvolve após sofrer alterações genéticas, citogenéticas e epigenéticas, gerando mudanças funcionais nas células, e, conseqüentemente, evolução da doença (NAEM et al., 2008; VASSALO e MAGALHAES, 2009). Essas alterações podem ser causadas pela idade (devido ao encurtamento dos telômeros), pela exposição a agentes genotóxicos ou por alguma condição inflamatória (ADES et al, 2014; CHAMSEDDINE et al, 2016).

Acredita-se que mutações somáticas nas células-tronco pluripotentes contribuem para a patogênese dessa doença. Aproximadamente 80% dos pacientes com SMD apresentam mutação em mais de um gene, dos quais a maioria apresenta mutações que alteram a sequência e a função de oncogenes e genes supressores tumorais (BEJAR et al, 2011; PAPAEMMANUILL et al, 2013; VISCONTE et al, 2014; CHAMSEDDINE et al, 2016).

As transformações malignas ocorrem em várias etapas, devido a um acúmulo de defeitos de maturação e alterações cromossômicas, que dá origem a alterações moleculares e na função das células (BEJAR et al, 2011; ELIAS et al, 2013; UYANIK et al, 2016). Segundo Bejar e colaboradores (2011) as etapas associadas à patogênese da SMD incluem: auto-renovação de uma célula-tronco hematopoiética, aumento da capacidade proliferativa do clone, defeitos ou bloqueio de diferenciação, instabilidade genética e epigenética e supressão da hematopoiese normal.

As lesões genéticas induzem uma resposta ao dano nas células tronco hematopoiéticas, o controle desta resposta é realizado pelas proteínas dos pontos de checagem, interrompendo o ciclo celular com o intuito de prevenir ou retardar a instabilidade genética, aumentando a senescência e provocando a apoptose. Porém, dependendo do estágio da doença, os pontos de checagem podem não ser ativados (Figura 3) (ZHOU et al, 2015; CHAMSEDDINE et al, 2016).

Figura 3: Estágios do desenvolvimento da SMD.

Legenda: Danos no DNA e alterações epigenéticas são causados pela exposição prolongada a condições inflamatórias, exposição a agentes genotóxicos e disfunção dos telômeros, o que, juntamente com o monitoramento dos pontos de checagem, pode ser responsável pelo desenvolvimento da SMD. Na SMD de baixo risco, há um aumento da apoptose e o desenvolvimento de um clone aberrante com mudanças funcionais, o que leva a supressão das células saudáveis, levando a presença de citopenias periféricas. Na SMD de alto risco há uma resistência aos mecanismos de reparo do DNA e a apoptose, o que aumenta o surgimento de novas mutações genéticas e epigenéticas, que levam ao risco aumentado de transformação para LMA.

★ Células com alterações fenotípicas e mudanças funcionais que levam a supressão da CTH saudável e geração de células aberrantes.

Abreviações: CTH = Célula tronco hematopoiética; CPrH = Célula Progenitora Hematopoiética; CPL = Célula Precursora Linfóide; CPM = Célula Precursora Mielóide; PME = Célula Precursora de Megacariócitos e Eritrócitos; PGM = Célula Precursora de Granulócitos e Monócitos.

Fonte: Adaptado de Elias et al (2013) e Chamseddine et al (2016)

1.6. Citogenética

A SMD apresenta uma grande heterogeneidade, não apenas no aspecto morfológico e clínico, mas também na apresentação genética (HAASE, 2008). Cerca de 50% dos pacientes com SMD *de novo* apresentam alterações cromossômicas, enquanto nas t-SMD esse número pode chegar a 80% dos casos, com uma maior porcentagem de cariótipo complexo. Durante o decorrer da doença, a citogenética contribui para avaliação da resposta a terapia e evolução clonal como um sinal de progressão da doença (BERNASCONI et al, 2013; VISCONTE et al, 2014; PELLAGATTI E BOUTWOOD, 2014; BACHER et al, 2015).

Devido à heterogeneidade da doença, estudos sobre a influência das alterações citogenéticas têm se restringido às alterações mais frequentes (-5/5q-, -7/7q-, +8, 20q- e -Y), que são encontradas em 40 a 60% dos casos, porém, ainda não se sabe ao certo se essas alterações são responsáveis por iniciar eventos que levam ao desenvolvimento da SMD, com exceção da del(5q), que representa a base fisiopatológica da síndrome do 5q- (HAASE 2008; GREENBERG et al, 2012; CAZZOLA et al, 2013; VISCONTE et al, 2014; PELLAGATTI E BOUTWOOD, 2014).

A frequência e o tipo de alteração citogenética está relacionada à área geográfica e a características étnicas. Alterações no cromossomo 5 (-5/5q-) são as mais comumente reportadas em várias regiões do mundo, incluindo o Brasil, seguida das alterações no cromossomo 7 (-7/7q-) (KAWANKAR e VOUNDINI, 2011). No Brasil a frequência de alterações citogenéticas é cerca de 69% e nos Estados Unidos, cerca de 45%, sendo a trissomia do cromossomo 8 a mais prevalente (BORGONOVO et al, 2005; PINHEIRO E CHAUFFAILLE, 2009; KAWANKAR e VOUNDINI, 2011).

Apesar da associação da del(5q) com prognóstico favorável (GREENBERG et al, 1997; 2012), existem duas regiões distintas comumente deletadas neste cromossomo, com impacto prognósticos diferentes (HAASE, 2008; BEJAR et al, 2014). A deleção que ocorre mais próxima ao centrômero está relacionada a SMD secundária à terapia, tendo uma forma mais agressiva, já a área mais próxima da região 5q32 está relacionada com a síndrome 5q- e apresenta prognóstico favorável (HAASE, 2008; BEJAR et al, 2014).

O estudo da citogenética tem proporcionado a base molecular para a descoberta dos genes envolvidos na transformação leucêmica da SMD e se mantém relevante para a avaliação clínica do paciente, mesmo na era genômica (CAZZOLA et al, 2013; SOUZA et al, 2014).

1.7. Controle e regulação do Ciclo Celular

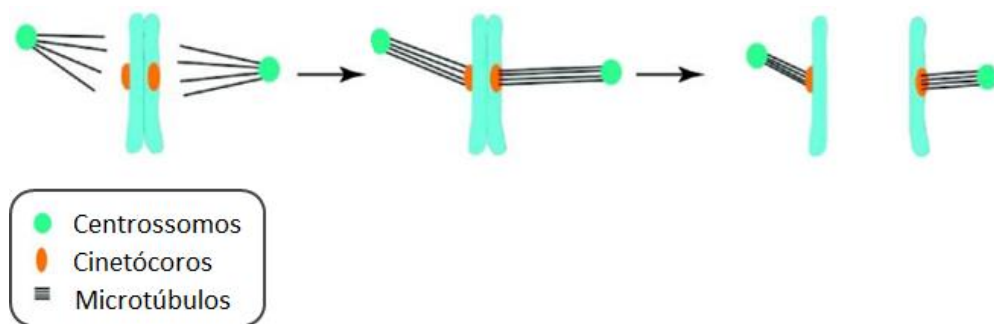
O desenvolvimento de neoplasias está relacionado ao mal funcionamento do ciclo celular, resultante de mutações nas vias de sinalização ou por lesões nos genes que codificam proteínas do ciclo celular (OTTO E SICINSKI, 2017).

O processo de divisão celular é estritamente regulado para manter a estabilidade cromossômica, garantindo a separação correta dos cromossomos entre duas células filhas (LONDON E BIGGINS, 2014; CHEN E LIU, 2015; CHEN E LIU, 2016). A correta segregação cromossômica ocorre quando as cromátides irmãs são ligadas após a replicação e depois são segregadas para polos opostos antes do processo de citocinese (divisão das células). Essa segregação é mediada por microtúbulos do fuso, que estabelece uma conexão estável e bi

orientada com cada cromossomo através dos cinetócoros, grandes complexos proteicos que se reúnem no DNA centromérico, permitindo o alinhamento dos cromossomos (LONDON E BIGGINS, 2014; CHEN E LIU, 2016).

Para que a segregação ocorra corretamente, deve existir uma conexão estável entre o cinetócoro e o fuso, pois os cinetócoros não ligados durante a segregação podem causar perdas cromossômicas (Figura 4) (CHEN E LIU, 2016). Para evitar erros, o processo de divisão celular é monitorado por um mecanismo de vigilância, o ponto checagem mitótico, que detecta o estado de ligação dos cinetócoros e é silenciado quando todos os cinetócoros estão ligados de forma estável (SCHVARTZMAN et al, 2010; LONDON E BIGGINS, 2014; CHEN E LIU, 2016).

Figura 4: Ligação dos cinetócoros ao fuso mitótico e separação dos cromossomos.



Legenda: Os centrossomos migram para as extremidades da célula para a formação do fuso mitótico, que irá se ligar aos cinetócoros para a correta segregação dos cromossomos.

Fonte: Adaptado de Gregan et al (2011)

Vários genes e proteínas estão envolvidos na regulação dos pontos de checagem mitóticos, sendo que um aumento ou diminuição da expressão dessas proteínas podem levar à danos no sistema de checagem, podendo contribuir para a instabilidade cromossômica (SCHUYLER et al, 2012).

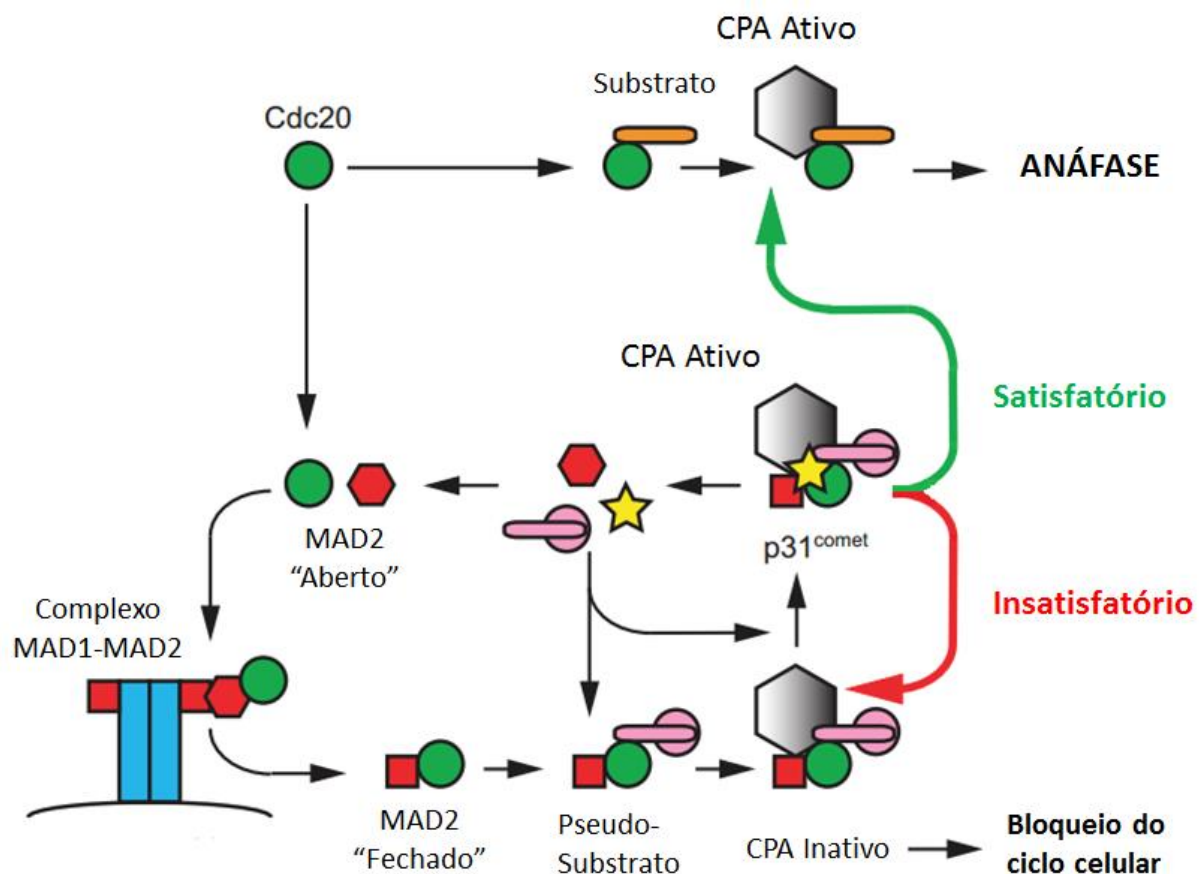
1.7.1. Genes relacionados ao ponto de checagem mitótico

O Complexo Promotor da Anáfase (CPA) é um regulador primário do ciclo celular, que é ativado pelo *CDC20* (*Cell division cycle 20*), que permite que o CPA se ligue aos seus substratos, tais como securina e ciclina B, e assim leva à anáfase (SCHUYLER et al, 2012; WANG et al, 2013). Quando o ponto de checagem é ativado a atividade do CPA é inibida, impedindo a transição da metáfase para a anáfase (SCHUYLER et al, 2012; HEINRICH et al, 2013).

O *CDC20* é sintetizado continuamente durante a prometáfase e a metáfase, se o resultado do ponto de checagem for satisfatório, o *CDC20* poderá ativar o CPA e promover a anáfase. Por outro lado, o ponto de checagem inibe as funções do CPA através da inativação do *CDC20*

pelo complexo de checagem mitótico (CCM) (constituído pelo *MAD2*, *BUB1* e *BUB3*) que se liga ao *CDC20* impedindo a ativação do CPA (SCHUYLER et al, 2012; LONDON E BIGGINS, 2014; FAESEN et al, 2017). Essa inativação ocorre devido a ligação do *MAD2* em sua forma livre (“aberta”) com o *CDC20*, formando o CCM, que se liga ao CPA, tornando-o inativo e levando ao bloqueio do ciclo celular até o completo e correto alinhamento dos cromossomos ao fuso mitótico (Figura 5). A formação do complexo Mad2-Cdc20 envolve a conversão de *MAD2* de uma conformação “aberta” para uma conformação “fechada” com o *CDC20* (Figura 5) (SCHUYLER et al, 2012; HEINRICH et al; 2013; LONDON E BIGGINS, 2014; FAESEN et al, 2017).

Figura 5: Regulação do CPA pelo complexo *MAD2* e *CDC20*



Legenda: Se o ponto de checagem mitótico for realizado de forma satisfatória, o *CDC20* se ligará ao substrato e poderá ativar a CPA, promovendo a entrada na anáfase. Se os cinetócoros não estiverem ligados corretamente, o ponto de checagem é insatisfatório, levando a ligação do *MAD2* ao *CDC20*, tornando a CPA inativa e, conseqüentemente, levando ao bloqueio do ciclo celular até sua reativação pelo *p31^{comet}*, que irá desfazer a ligação entre *MAD2* e *CDC20*.

Fonte: Adaptado de Schuyler et al (2012)

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

Vários estudos têm relatado o papel oncogênico do *CDC20*, estando relacionado ao desenvolvimento e progressão de cânceres humanos. Devido a isso, estudos têm sido realizados para o desenvolvimento de medicamentos alvo específicos (WANG et al, 2015). *MAD2* tem se apresentado hiperexpresso em vários tipos de cânceres, geralmente associado com prognóstico desfavorável e promovendo a instabilidade genética em estudos com cultura de células (SOTILLO et al, 2007).

Heredia e colaboradores (2014) demonstraram a associação do aumento da expressão dos genes *MAD2* e *CDC20* com o aumento das chances de desenvolvimento de medula óssea normo ou hiperclonal em pacientes com SMD, relacionado a um pior prognóstico. Este estudo também demonstrou que os genes *MAD2* e *CDC20* estão hiperexpressos em pacientes mais velhos (com idade superior a 60 anos) (HEREDIA et al, 2014).

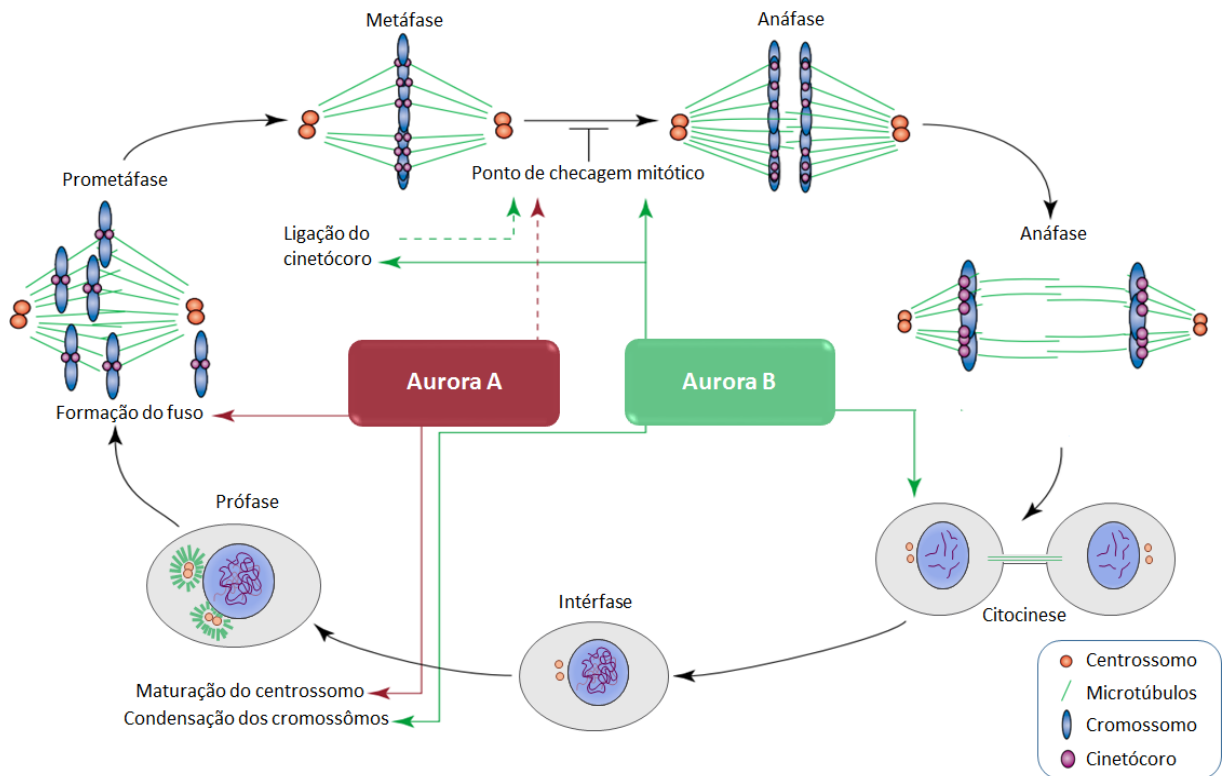
Genga e colaboradores (2015) também encontraram associações significativas entre os níveis de expressão desses genes em pacientes portadores de SMD. Dentre elas, o aumento da expressão proteica do *MAD2* e do *CDC20* foi associada a trombocitopenia severa e óbito. O aumento da expressão proteica do *CDC20* também foi associado à presença de cariótipo complexo (GENGA et al, 2015).

1.7.2. Genes relacionados ao fuso mitótico

Outros grupos de genes e proteínas relacionados ao controle e regulação do ciclo celular tem sido amplamente estudados, dentre eles se destacam a família das Auroras quinases. As auroras quinases são uma família de serinas/treoninas que participam ativamente na regulação do alinhamento e segregação cromossômica durante a mitose (KITZEN et al, 2010; GOLDENSON e CRISPINO, 2014; HEREDIA et al, 2014; GENGA et al, 2015). As funções da Aurora A e da Aurora B estão associadas com a instabilidade cromossômica, monitoramento dos pontos de checagem mitóticos e formação do fuso mitótico (GOLDENSON e CRISPINO, 2014; HEREDIA et al, 2014).

A Aurora A (*AURKA*) está localizada nos centrossomos e nos polos do fuso mitótico e atua, durante a mitose, na maturação e separação dos centrossomos, formação do fuso mitótico e na dinâmica dos microtúbulos. Já a Aurora B (*AURKB*) está localizada nos centrômeros, e atua no alinhamento dos cromossomos e no monitoramento do ponto de checagem mitótico (KITZEN et al, 2010; AFONSO et al, 2016). A Figura 6 representa um resumo das funções da Aurora A e da Aurora B.

Figura 6: Ação da Aurora A e Aurora B na progressão mitótica.



Legenda: Locais de atuação das Auroras A e B durante a progressão mitótica. As funções da Aurora A estão relacionadas a maturação do cromossomo, formação do fuso mitótico e também auxiliam indiretamente no ponto de checagem mitótico. Já a Aurora B atua na condensação dos cromossomos, na ligação do cinetócoro, no processo de citocinese e auxiliam no ponto de checagem mitótico.

Fonte: Adaptado de Meraldi et al (2004)

1.7.2.1. Aurora B

Durante a mitose, a Aurora B tem um importante papel na condensação dos cromossomos, segregação e orientação bipolar (KITZEN et al, 2010; GOLDENSON E CRISPINO, 2015). A Aurora B fosforila proteínas da cromatina para auxiliar na condensação dos cromossomos e contribui para o ponto de checagem mitótico através do direcionamento da conexão entre o cinetócoro e microtúbulos. Enquanto todos os cromossomos não estiverem bi orientados, através da ação da *AURKB*, o CPA permanece desativado, apenas sendo liberado pelo ponto de checagem após a correta reorganização cromossômica, possibilitando a anáfase. Assim, o ponto de checagem mitótico é comprometido pela falta de atividade de Aurora B (VADER E LENS, 2008; KITZEN et al, 2010; GOLDENSON E CRISPINO, 2015).

Aurora B também é essencial para a realização correta da citocinese. Sem a ação da *AURKB*, as células filhas permanecem ligadas através de pontes citoplasmáticas, gerando defeitos de formação cromossômicos (PORTELLA et al, 2011; GOLDENSON E CRISPINO, 2015).

Esse gene encontra-se hiperexpresso em diversos tipos de tumores e está correlacionado com múltiplos defeitos na maquinaria mitótica, podendo dar origem a aneuploidias e outras alterações citogenéticas (GOLDENSON E CRISPINO, 2015). Ainda não se sabe se o aumento dos níveis de expressão da *AURKB* em tumores é um reflexo da elevada proliferação das células neoplásicas ou se ela está relacionada com mecanismos da tumorigênese (PORTELLA et al, 2011).

Embora a hiperexpressão da Aurora B esteja relacionada a um prognóstico desfavorável em diversos tipos de tumores, um estudo realizado por Heredia e colaboradores em pacientes portadores de SMD no Brasil não mostrou correlação clínica entre o aumento da expressão deste gene e o impacto prognóstico (HEREDIA et al, 2012).

1.7.2.2. Aurora A

As auroras quinases têm sido amplamente estudadas devido a suas funções essenciais na mitose, porém a Aurora A tem sido mais estudada devido a sua hiperexpressão em diversos tipos de neoplasias, esse aumento da expressão se encontra associado ao aumento do número de centrossomos e de fusos mitóticos, que permanecem na célula como consequência da falha na citocinese (KITZEN et al, 2010; NIKONOVA et al, 2013; LINDON et al, 2016).

Dentre as funções da Aurora A estão a maturação e separação dos centrossomos, formação do fuso mitótico, promotor da inicialização da mitose, alinhamento dos cromossomos na metáfase e citocinese (NIKONOVA et al, 2013; LINDON et al, 2016). Na ausência da Aurora A, o ponto de checagem detecta defeitos no alinhamento dos cromossomos e interrompe a divisão celular, porém, algumas células com defeitos na *AURKA* podem escapar do bloqueio e terminar o processo de divisão, levando a erros de segregação cromossômicas (GOLDENSON E CRISPINO, 2015).

Quando a Aurora A se encontra hiperexpressa, ela age suprimindo a proteína MAD2 e estimulando a CDC20, alterando o funcionamento correto do CPA e sobrepondo o ponto de checagem mitótico, como consequência, seu aumento de expressão interfere em diversos processos celulares que resultam na instabilidade genômica (GOLDENSON E CRISPINO, 2015). O aumento dos níveis de expressão da Aurora A pode ser o resultado da amplificação de genes, indução de transcrição gênica ou modificações pós traducionais (KITZEN et al, 2010).

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

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

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

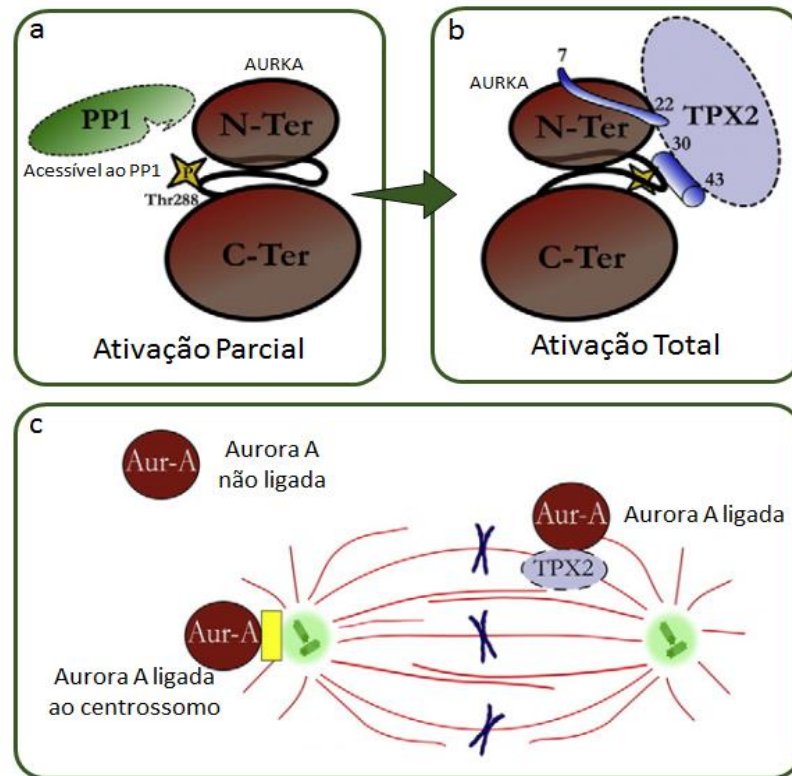
1.7.2.3. TPX2

TPX2 é uma proteína associada aos microtúbulos e desempenha um papel importante na formação do fuso mitótico (LIANG et al, 2016). A sua expressão é rigorosamente controlada durante a progressão do ciclo celular, ou seja, aparece entre as fases G1 e S e desaparece após a conclusão da citocinese das células (LIANG et al, 2016). As funções e localização do *TPX2* estão relacionadas a sua função como regulador da Aurora A (DE LUCA et al, 2016). Além de permitir que a Aurora A realize suas funções, a *TPX2* também a protege contra a degradação prematura (GARRIDO E VERNOS, 2016).

A Aurora A é ativada pela fosforilação durante a mitose e inativada por desfosforilação (MARUMOTO et al, 2002) A autoativação da Aurora A depende da fosforilação do resíduo Thr288. A fosforilação da Thr288 não é obrigatória para a ligação do *TPX2* a *AURKA*, porém, a ativação só é completa quando *TPX2* se liga à Aurora A fosforilada, pois o *TPX2* protege o resíduo Thr288 de ser desfosforilado pela ação da Proteína Fosfatase 1 (PP1) (ASTERITI et al, 2010; LEE et al, 2014; BERTOLIN et al, 2016).

Quando Aurora A não está ligada ao *TPX2*, o resíduo Thr288 é neutralizado pela fosfatase PP1, gerando uma ativação parcial da Aurora A. Com a ligação do *TPX2*, a Aurora A sofre uma mudança na sua forma, fazendo com que o resíduo Thr288 esteja inacessível ao PP1, tornando a Aurora A totalmente ativada e podendo então se ligar aos microtúbulos do fuso e realizar suas funções corretamente (Figura 7) (ASTERITI et al, 2010; BERTOLIN et al, 2016).

Figura 7: Ativação da *AURKA* pela *TPX2*.



Legenda: a. Ativação parcial da Aurora A, causada pela fosforilação do resíduo Thr288. b. Ativação total da Aurora A através da ligação da molécula do *TPX2*. c. O complexo *TPX2-AURKA* permite a ligação da Aurora A ao centrôssomo e sua migração pelo fuso mitótico.

Fonte: Adaptado de Asteriti et al (2010)

A associação da *TPX2* com Aurora A resulta em uma unidade funcional que, quando hiperexpressa, tem propriedades cancerígenas, provavelmente devido a ativação oncogênica da Aurora A pelo *TPX2* (GUPTA et al, 2015).

O aumento da expressão do *TPX2* está relacionado à instabilidade cromossômica, o que pode levar ao desenvolvimento de tumores (CASTRO e MALUMBRES, 2013; NEUMAYER et al, 2014). Muitos estudos têm demonstrado que o *TPX2* se encontra hiperexpresso nos cânceres de colo, de fígado, de mama, entre outros, evidenciando seu papel como possível marcador da proliferação de tumores (NEUMAYER et al, 2014).

A hiperexpressão do *TPX2* nesses tumores tem sido associada à amplificação anormal dos centrôssomos, presença de aneuploidias, proliferação celular e a redução da apoptose. Além disso, esse aumento de expressão também tem sido associado com a presença de metástase tumoral em várias neoplasias (LIANG et al, 2016; LEE et al, 2016). Este é o primeiro estudo a avaliar os níveis de expressão gênica do *TPX2* em pacientes portadores de SMD.

1.7.3. Genes reguladores do ciclo celular (*CDKN1A*)

Estudos recentes têm demonstrado que a Aurora B pode fosforilar p53, suprimindo a ação desse supressor tumoral. Da mesma forma, a inativação da *AURKB* leva a um aumento da atividade do p53 e indução do *CDKN1A* (também conhecido como P21), uma proteína inibidora de ciclinas dependentes de quinases e, conseqüentemente, inibidora do ciclo celular, que é regulada pelo p53 (PRIVES E GOTTIFREDI, 2008; CAZZALINI et al, 2010; TRAKALA et al, 2013; KARIMIAN et al, 2016).

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

Níveis muito elevados de *CDKN1A*, devido a lesões no DNA, resultam no bloqueio do ciclo celular em G2 ou em uma saída prematura da mitose, sem que haja a segregação cromossômica. O aumento intermediário dos níveis de *CDKN1A* permitem que a célula inicie a mitose, porém, resultam em uma saída prematura, devido a baixa atividade das CDKs (TRAKALA et al, 2013).

Além disso, o *CDKN1A* tem apresentado influência na expressão de genes relacionados ao ciclo celular, ao reparo do DNA e na regulação da apoptose (PRIVES E GOTTIFREDI, 2008; CAZZALINI et al, 2010; KARIMIAN et al, 2016). O *CDKN1A* tem uma forte afinidade pelo antígeno nuclear de proliferação celular (ANPC), tornando-o o principal mediador do bloqueio do ciclo celular em resposta a danos no DNA (CAZZALINI et al, 2010).

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

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Avaliar os níveis de expressão do mRNA dos genes relacionados aos mecanismos de regulação do ciclo celular (*CDKN1A*), ponto de checagem mitótico (*MAD2* e *CDC20*) e fuso mitótico (*AURKA*, *AURKB* e *TPX2*) em pacientes portadores de síndrome mielodisplásica (SMD).

2.2. Objetivos Específicos

1. Comparar os níveis de expressão dos genes *TPX2*, *AURKA*, *AURKB*, *MAD2*, *CDC20* e *CDKN1A* entre indivíduos saudáveis e pacientes portadores de SMD;
2. Correlacionar os níveis de expressão dos genes com as alterações citogenética encontradas;
3. Correlacionar os níveis de expressão dos genes com as características clínico-laboratoriais dos pacientes portadores de SMD;
4. Correlacionar os níveis de expressão dos genes com a sobrevida e evolução para LMA.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Seleção de amostras

Neste estudo foram incluídas 134 amostras de medula óssea de pacientes portadores de SMD, diagnosticados de acordo com os critérios da Organização Mundial de Saúde (SWERDLOW et al, 2008), e regularmente inscritos no ambulatório de hematologia do Hospital Universitário Walter Cantídio, da Universidade Federal do Ceará HUWC/UFC, no período de 2008 a 2015. Foram utilizados como controles 10 amostras de medula óssea de voluntários saudáveis, após consentimento informado.

3.2. Aspectos Éticos

A presente pesquisa foi submetida e aprovada (Nº do processo: 1.292.509) pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos do Hospital Universitário Walter Cantídio, através do sistema da Plataforma Brasil, utilizando-se de Termos de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) apresentados na sessão apêndice deste projeto.

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

3.3. Coleta das amostras

Todas as amostras foram coletadas por médico hematologista experiente. Para a avaliação do Cariótipo por banda G, as amostras foram coletadas em seringa heparinizada. As amostras para a obtenção do *pool* celular foram coletadas em tubos Vacutainer® contendo EDTA.

Para a separação das células do *pool* celular da medula óssea, realizou-se a transferência da amostra para um tubo do tipo Falcon de 50 mL onde foi lavada com solução de lise (25mL de solução de cloreto de amônio 0,144M e bicarbonato de amônio 0,01 M). O conteúdo foi agitado lentamente, deixado em banho de gelo por 15 minutos e centrifugado a 3000 rpm por 10 minutos a 4° C. Em seguida foi desprezada a fase aquosa e acrescentado 250µL de PBS e, posteriormente, 750uL de *Trizol LS Reagent*® (Invitrogen, EUA). O material foi homogeneizando com pipeta até dissolução completa. Após este procedimento, o material foi armazenado no freezer a -80°C.

3.4. Cariótipo por Banda G

Os cariótipos foram realizados de acordo com os protocolos já estabelecidos pelo Laboratório de Citogenômica do Câncer, segundo a técnica descrita por Chauffaille e adaptada por Pinheiro (PINHEIRO et al, 2009). 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), 3 mL de soro fetal bovino e 100µL de L-glutamina. Este material foi cultivado por 24 horas em estufa a 37°C. Uma hora antes do término da cultura foram adicionados 50 uL de colchicina (Colcemid®), por 30 minutos. Em seguida, o material foi centrifugado e ressuspensão em solução hipotônica de KCl 0,075 M e fixado em solução de ácido acético e metanol (3:1), por 4 vezes.

Para confecção das lâminas para análise, o material foi gotejado em lâminas de microscopia óptica e em seguida foram aquecidas por 3 minutos em micro-ondas na potência alta. O bandeamento será realizado pela técnica de tripsina e as bandas coradas com o kit Panótico®. Foram analisadas pelo menos 20 metáfases de cada paciente, sendo capturadas e analisadas em sistema computadorizado com software para cariotipagem CytoVision®. Os resultados das análises citogenética de medula óssea foram estabelecidos de acordo com os critérios do Sistema Internacional de Nomenclatura Citogenética Humana (ISCN) (Shaffer e Tommerup 2014).

3.5. Extração de RNA total

A extração de RNA das células do *pool* medular dos pacientes com SMD e dos controles foi realizada a partir da utilização do Trizol LS Reagente® de acordo com o protocolo fornecido pelo fabricante. Para cada 10⁶ células armazenadas em 1mL de Trizol Reagente® foram adicionados 200µL de Clorofórmio para desproteíntização e 10µL de glicogênio, foram homogeneizadas em vórtex e, em seguida, centrifugadas a 14.000rpm por 15 minutos a 4°C. Retirou-se o sobrenadante de cada amostra, transferindo para novos tubos, seguidos de precipitação com 400µL de isopropanol, e incubado por 60 minutos a -20°C, após esse período, foi realizada outra centrifugação a 14.000rpm por 30 minutos a 4°C e o sobrenadante foi descartado por inversão. O pellet formado foi ressuspensão em etanol 70% (v/v) e novamente centrifugado por 10 minutos. Em seguida, o sobrenadante foi novamente descartado por inversão e, após seco, o pellet foi diluído em água livre de RNase.

Foram realizadas leituras espectrofotométricas nos comprimentos de ondas de 230, 260 e 280 nm, obtendo-se suas relações para posterior aferição de contaminação das amostras. A qualidade das amostras de RNA também foi verificada por eletroforese em gel de agarose 2%.

3.6. Síntese de cDNA

Após a extração do RNA, 2000ng de cada amostra foram utilizados na síntese do cDNA. A síntese do cDNA foi realizada com a utilização do Kit para Transcrição Reversa da *Applied Biosystems® (High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit Applied Biosystems®)*, de acordo com as recomendações do fabricante. O cDNA foi diluído cinco vezes para a ser utilizado nas reações de qPCR e armazenado a -20°C.

3.7. qPCR (PCR quantitativa em tempo real)

As reações foram realizadas no aparelho 7500 Fast Real-Time PCR System® (*Applied Biosystems, Foster City, CA, USA*), em placas transparentes de 96 poços (*MicroAmp 96-well Plates, Applied Biosystems, Inc., Foster City, CA, USA*). As reações de PCR em tempo real foram realizadas em duplicata utilizando sondas *TaqMan assay®* com marcação FAM-MGB pela Applied Biosystems (Tabela 4). A representação esquemática da metodologia utilizada na análise de expressão gênica encontra-se na figura 7. O volume final de cada reação foi de 10µl, sendo 7µl de TaqMan Universal, 0,5µl de primer (*TaqMan Assay*) e 2,5µl de cDNA. As condições de termociclagem compreenderam uma incubação a 50°C por 2 minutos, 95°C por 10 minutos (para ativação da DNA polimerase), seguidos por 40 ciclos de 95°C por 15 segundos (desnaturação) e 60°C por 1 minuto (anelamento e extensão simultâneos).

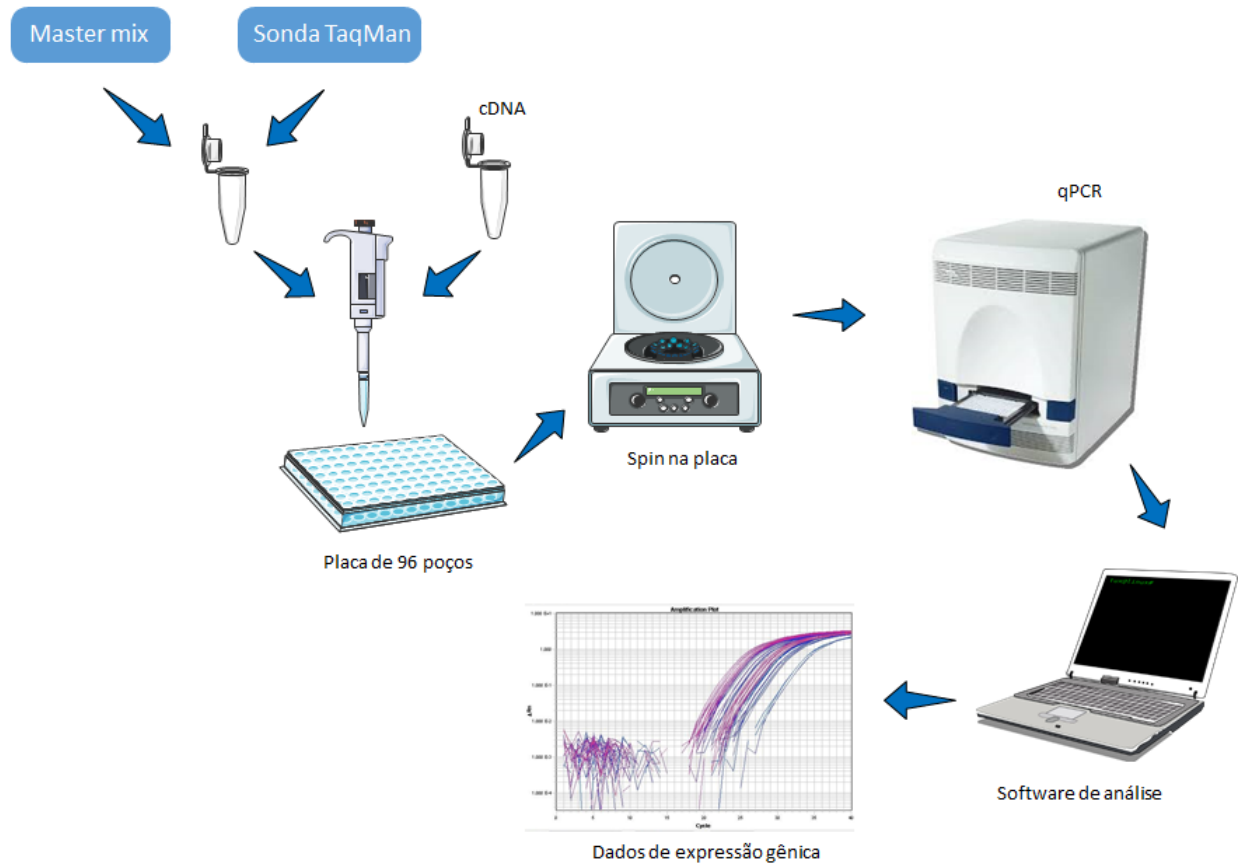
Tabela 4: Sondas utilizadas na avaliação da expressão gênica por PCR em Tempo Real

GENES	CÓDIGO DE REFERÊNCIA (Applied Biosystems)
Genes Normalizadores	
UBC (<i>Ubiquitina C</i>)	Hs00824723_m1
B2M (<i>β2-Microglobulina</i>)	Hs99999907_m1
GAPDH (<i>Gliceraldeído fosfato desidrogenase</i>)	Hs02786624_g1
Genes de Estudo	
AURKA (<i>Aurora kinase A</i>)	Hs01582072_m1
AURKB (<i>Aurora kinase B</i>)	Hs00945858_g1
TPX2 (<i>Xenopus kinesin-like protein 2</i>)	Hs00201616_m1
MAD2 (<i>Mitotic arrest defective</i>)	Hs01554513_g1
CDC20 (<i>Cell division cycle 20</i>)	Hs00426680_mH
CDKN1A (<i>Cyclin-dependent kinase inhibitor 1A</i>)	Hs0035782_m1

Todas as amostras (casos, controles normais e controle interno das reações) foram realizadas em duplicatas. Uma amostra calibradora quantitativa foi incluída em todas as placas de qPCR (*pool* de duas linhagens celulares oriundas de tumores humanos, disponibilizada pela Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - FMRP/USP) para minimizar

as diferenças de amplificação entre as reações. Como controle de contaminantes da PCR, foram utilizados NTCs (*no-templante controls*) adicionando-se água no lugar do cDNA, em cada placa. A representação da metodologia da expressão gênica por qPCR encontra-se na figura 8.

Figura 8: Representação esquemática dos procedimentos de expressão gênica por qPCR.



Para validar a estabilidade dos níveis de expressão gênica, foram utilizados três genes de referência: $\beta 2$ -microglobulina (*B2M*), *Ubiquitina C (UBC)* e *Gliceraldeído fosfato desidrogenase (GAPDH)*. Para a escolha do par de genes de referência mais estáveis, foi calculado o desvio padrão de cada gene de referência com base em valores brutos (*Cq - quantification cycle*). Entende-se como gene endógeno mais estável, aquele ou aqueles que obtiverem o menor valor de desvio padrão. Após a análise do desvio padrão, foi realizado um cálculo de coeficiente de correlação de Pearson para cada par de genes de referência candidatos. Em seguida, foi feita a média geométrica de todos os genes, conhecida como média de tendência central (*INDEX*), e feita correlação de Pearson de cada gene, separadamente, com o *INDEX* obtido. Os genes de referência que apresentaram menor valor de desvio padrão e maior correlação entre si e com o valor *INDEX* ($r > 0,7$) (VANDESOMPELE et al, 2002), foram

considerados os mais estáveis. Assim, para este estudo, obtivemos que os genes mais estáveis nas amostras de cDNA utilizadas foram a *B2M* e o *GAPDH*.

Os resultados foram avaliados através do software *Sequence Detection System v1.3* (*Applied Biosystems, Inc.*, Foster City, CA, USA) para obtenção dos valores de *quantitative cycle* (*Cq*). A partir do *threshold* estabelecido, os valores de *Cq* foram fornecidos pelo software do aparelho *7500 Real-Time PCR System®* (*Applied Biosystems, Inc.*, Foster City, CA, USA). Para normalizar os valores de *Cq*, de forma a considerar diferenças causadas por quantidades distintas de cDNA utilizadas nas reações, o *Cq* determinado para uma amostra foi subtraído da média geométrica dos *Cq*'s dos genes de referência utilizados (*B2M* e *GAPDH*) da mesma amostra, gerando assim os valores de ΔCq e $2^{-\Delta Cq}$ (LIVAK et al, 2001). A nomenclatura padrão utilizada para os experimentos da PCR quantitativa em tempo real foi baseada no MIQE (*Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments*) (BUSTIN et. al., 2009).

Sabe-se que a ocorrência de dados com valores em *outliers* frente as amostras avaliadas em um dado estudo podem interferir na precisão da estimativa correta das análises realizadas. Assim, inicialmente, antes de quaisquer avaliações dos dados para realização de análises estatísticas, a fim de determinar a qualidade, integridade e estabilidade do nível de expressão das amostras dos pacientes avaliadas, foram retirados do estudo todas as amostras que apresentaram elevados valores de desvio padrão. Neste sentido, iniciamos este estudo com um total de 134 amostras de cDNA, mantendo-se, o total de 101 amostras para prosseguimento das análises estatísticas.

3.8. Análise Estatística

3.8.1. Análise dos dados de expressão gênica

O teste de Shapiro-Wilk foi utilizado para verificar se os dados de cada variável analisada se apresentavam com distribuição normal (dados paramétricos, com grupos com menos de 50 casos). Os valores de *outliers* foram retirados (quando ocorreram) por não representarem aqueles resultados aos quais o estudo tinha o objetivo de generalizar (p-valor >0.05 para o teste de Shapiro-Wilk).

Os dados paramétricos foram analisados através do teste *t* de Student, para a comparação da média entre dois grupos, e do teste de ANOVA *one-way*, para a comparação das médias em variáveis com mais de dois grupos. O pós-teste (*post-hoc*) para a ANOVA *one-way* foi definido a partir da análise da homogeneidade de variâncias através do teste de Levene. Caso houvesse homogeneidade de variâncias (p-valor $\geq 0,05$), foi definido como pós-teste para a ANOVA *one-*

way o teste de Tukey. Caso não houvesse homogeneidade de variâncias entre os dados (p -valor $<0,05$), foi definido como pós-teste para a ANOVA o teste de Games-Howell.

O teste de correlação de *Pearson* foi utilizado para a obtenção dos valores de r e *r-square* (r^2) que demonstra a influência do nível de expressão de um dado gene sobre o outro na população avaliada, buscando demonstrar se tais genes são regulados pelo mesmo mecanismo molecular.

Os dados sobre os níveis de expressão gênica (valores de $2^{-\Delta Cq}$) foram expressos em média \pm desvio padrão (SD), com intervalo de confiança (CI) (máximo e mínimo), a fim de determinar a possível associação entre o nível de expressão dos genes frente cada variável analisada. O nível de significância estatística utilizado foi de $p<0,05$ e todas as análises foram efetuadas com recurso do software SPSS para Windows (versão 21.0).

3.8.2. Avaliação da associação entre os dados de expressão e a sobrevida dos pacientes

As sobrevidas globais dos pacientes com SMD em relação ao nível de expressão dos genes foram avaliadas pelo método de Kaplan-Meier, considerando-se como evento o óbito por qualquer causa, sendo o tempo de acompanhamento calculado a partir da data de diagnóstico até a data do óbito. As diferenças entre as curvas de sobrevivência foram feitas pelo teste de *LogRank*. Para esta análise, a variável de expressão gênica foi reajustada para pontos de corte (*Cutoff points*) estabelecidos pelo algoritmo do software *Cutoff Finder* (BUDCZIES et al., 2012).

O *Cutoff Finder* é uma ferramenta on-line disponível gratuitamente (<http://molpath.charite.de/cutoff>) que disponibiliza um conjunto de métodos de otimização e visualização de pontos de *cut-off* para avaliação de novos potenciais biomarcadores moleculares (BUDCZIES et al., 2012), tais como os dados provenientes de análises de expressão gênica e proteica, utilizando-se da estatística R como suporte para a visualização e computação estatística (CORE TEAM, 2012). Para as análises de sobrevida, foi utilizada a ferramenta de análise de significância de correlação com a variável de sobrevivência pelo teste de log-rank proveniente do software *Cutoff Finder* (BUDCZIES et al., 2012).

O ponto de corte ideal é definido como o ponto com o desdobramento mais significativo obtido pelo teste de *log-rank* (BUDCZIES et al., 2012) aumentando o poder do teste em afastar a hipótese nula dos resultados. O *odds-ratio*, incluindo intervalos de confiança de 95%, também são calculados por essa ferramenta do software *Cutoff Finder* (BUDCZIES et al., 2012).

3.9. Variáveis analisadas

As variáveis analisadas neste estudo foram assim subdivididas:

- Grupo: Caso e controle
- Seguimento: Ao diagnóstico e após seguimento;
- Sexo: masculino e feminino;
- Idade (categorização 1): ≤ 60 anos e > 60 anos;
- Idade (categorização 2): ≤ 60 anos, $> 60 - \leq 70$ anos, > 70 anos;
- Origem: urbano e rural;
- Quanto à classificação da OMS (2008): CRDU (Citopenia Refratária com Displasia de Única Linhagem), ARSA (Anemia Refratária com Sideroblastos em Anel), CRDM (Citopenia Refratária com Displasia em Múltiplas Linhagens), AREB I (Anemia Refratária com Excesso de Blastos I), AREB II (Anemia Refratária com Excesso de Blastos II), t-SMD (SMD Secundária ao tratamento), LMMC (Leucemia Mielomonocítica Crônica);
- Forma da SMD: Iniciais (CRDU, ARSA e CRDM) e Avançadas (AREB I e AREB II);
- Celularidade da medula óssea: Hipocelular, Normocelular e Hipercelular;
- Fibrose na medula óssea: Presença e Ausência;
- Displasias na medula óssea: 0, 1 displasia, 2 displasias e 3 displasias;
- Diseritropoiese: Sim e Não;
- Disgranulopoiese: Sim e Não;
- Dismegacariopoiese: Sim e Não;
- Presença de Micromegacariócito: Sim e Não;
- Sideroblastos em anel: Presença e ausência;
- Faixas de porcentagens de Sideroblastos em anel: 0, 1-14% e $> 15\%$;
- Porcentagens de Blastos (IPSS-R): $\leq 2\%$, $> 2\% - < 5\%$, 5%-10% e $> 10\%$;
- Cariótipo:
 - Quanto à alteração: normal e alterado;
 - Cariótipo (Aneuploidia): normal, alterado não aneuplóide e alterado aneuplóide;
 - Cariótipo (Alteração no cromossomo 5): normal, alterado com -5/5q e alterado sem -5/5q;
 - Cariótipo (Alteração no cromossomo 7): normal, alterado com -7/7q e alterado sem -7/7q;
 - Cariótipo (Número de alterações): normal, 1 alteração, 2 alterações e Complexo (3 ou mais alterações);
- Quanto ao prognóstico (IPSS-R): muito favorável, favorável, intermediário, desfavorável e muito desfavorável;
- Classificação dos valores de hemoglobina (Hb) (IPSS-R): $\geq 10\text{g/dL}$, $8 - < 10\text{g/dL}$ e $< 8\text{g/dL}$;

- Classificação dos valores de neutrófilos (ANC) (IPSS-R): ≥ 800 por mm^3 e < 800 por mm^3 ;
- Classificação dos valores de plaquetas (IPSS-R): ≥ 100.000 por mm^3 , $50.000 - < 100.000$ por mm^3 e ≤ 50.000 por mm^3 ;
- Classificação do número de citopenias no sangue periférico: 0/1 citopenia e 2/3 citopenias;
- Classificação do grupo de risco de acordo com o IPSS-R: muito baixo, baixo, intermediário, alto e muito alto;
- Classificação do grupo de risco de acordo com o WPSS: muito baixo, baixo, intermediário, alto e muito alto;
- Dependência Transfusional: sim e não (utilizando-se o critério de 1 transfusão a cada 8 semanas durante período de 4 meses (MALCOVATI et al., 2005);
- Tratamento com Eritropoietina: Com resposta e sem resposta;
- Óbito: sim e não;
- Evolução para LMA: sim e não.

4. RESULTADOS

4.1. Caracterização dos pacientes

Dos 101 pacientes incluídos neste estudo, 46 indivíduos (45,54%) são do sexo feminino e 55 indivíduos (54,45%) são do sexo masculino (Tabela 5). Com relação a idade dos pacientes, a média foi de 65 anos e a mediana 67 anos (mínimo de 23 anos e máximo de 96 anos) com uma predominância de pacientes com idade superior a 60 anos em 67,32% (68/101) dos casos (Tabela 5). Noventa e sete pacientes informaram a origem de moradia, sendo 64 (65,98%) de origem urbana e 33 (34,02%) de origem rural.

Dos 101 pacientes avaliados, 71 apresentavam biópsia de medula óssea. Desses 71 pacientes, 44 (61,98%) apresentaram medula hiperclular, 12 (16,90%) hipocelular e 15 (21,12%) normocelular (Tabela 5), com predomínio de pacientes com ausência de fibrose (55/77,46%) (Tabela 5).

Dos achados da medula óssea referentes ao Mielograma, observou-se predomínio de displasia da linhagem eritróide, em 73 (93,59%) pacientes, seguida por 39 (50%) pacientes com disgranulopoiese e 38 (49,72%) pacientes apresentando dismegacariopoiese. Quanto à porcentagem de blastos, obtivemos resultado de 100 dos 101 pacientes, destes, 72 (72%) pacientes estavam inclusos na faixa de $\leq 2\%$, seguido de 11 (11%) pacientes na faixa de 5 a 10%, 9 (9%) na faixa de $>10\%$ e, por fim, 8 (8%) pacientes incluídos na faixa de >2 a $<5\%$ (Tabela 5).

Quanto à porcentagem de sideroblastos em anel, não foi observada a presença em 76 (77,55%) pacientes, e dos 22 (22,45%) pacientes que apresentaram, houve um predomínio da faixa que corresponde a $>15\%$, com 16 (72,73%) pacientes, seguida de 6 (27,27%) pacientes na faixa de 1-14% (Tabela 5). A tabela 6 demonstra a frequência das variáveis clínicas dos pacientes.

Tabela 5: Frequência das variáveis clínicas dos pacientes.

Variáveis	Número de Pacientes	Porcentagem
IDADE		
≤60	33	32,70%
>60-70	25	24,75%
>70-80	25	24,75%
>80	18	17,80%
HEMOGLOBINA (g/dL)		
≥10	27	26,73%
8-<10	23	22,77%
<8	51	50,50%
Contagem absoluta de neutrófilos (ANC)		
≥ 800	65	65%
<800	35	35%
PLAQUETAS		
≥ 100	50	49,50%
50-<100	21	20,79%
<50	30	29,70%
BLASTOS MO		
≤ 2	72	72%
>2% - <5%	8	8%
5%-10%	11	11%
>10%	9	9%
SIDEROBLASTOS EM ANEL		
0	76	77,55%
>1-<15%	6	6,12%
≥ 15%	16	16,33%
CELULARIDADE MO		
Hipocelular	12	16,90%
Normocelular	15	21,12%
Hipercelular	44	61,98%
FIBROSE MEDULAR		
Presença de fibrose	16	22,54%
Ausência de fibrose	55	77,46%

Todos os 101 pacientes avaliados foram classificados de acordo com a OMS 2008, sendo 91 (90,10%) pacientes classificados como SMD primária, 6 (5,94%) como SMD relacionada a terapia e 4 (3,96%) classificados como LMMC. Dentre os pacientes classificados como SMD primária, o subtipo mais frequente foi a CRDM com 52 (51,48%) pacientes, seguida pelo subtipo ARSA com 12 (11,88%) pacientes, CRDU e AREB 1, ambos com 9 (8,91%) pacientes, AREB 2 com 8 (7,92%) pacientes e, por fim, síndrome do 5q com 1 (0,99%) paciente (Tabela 6).

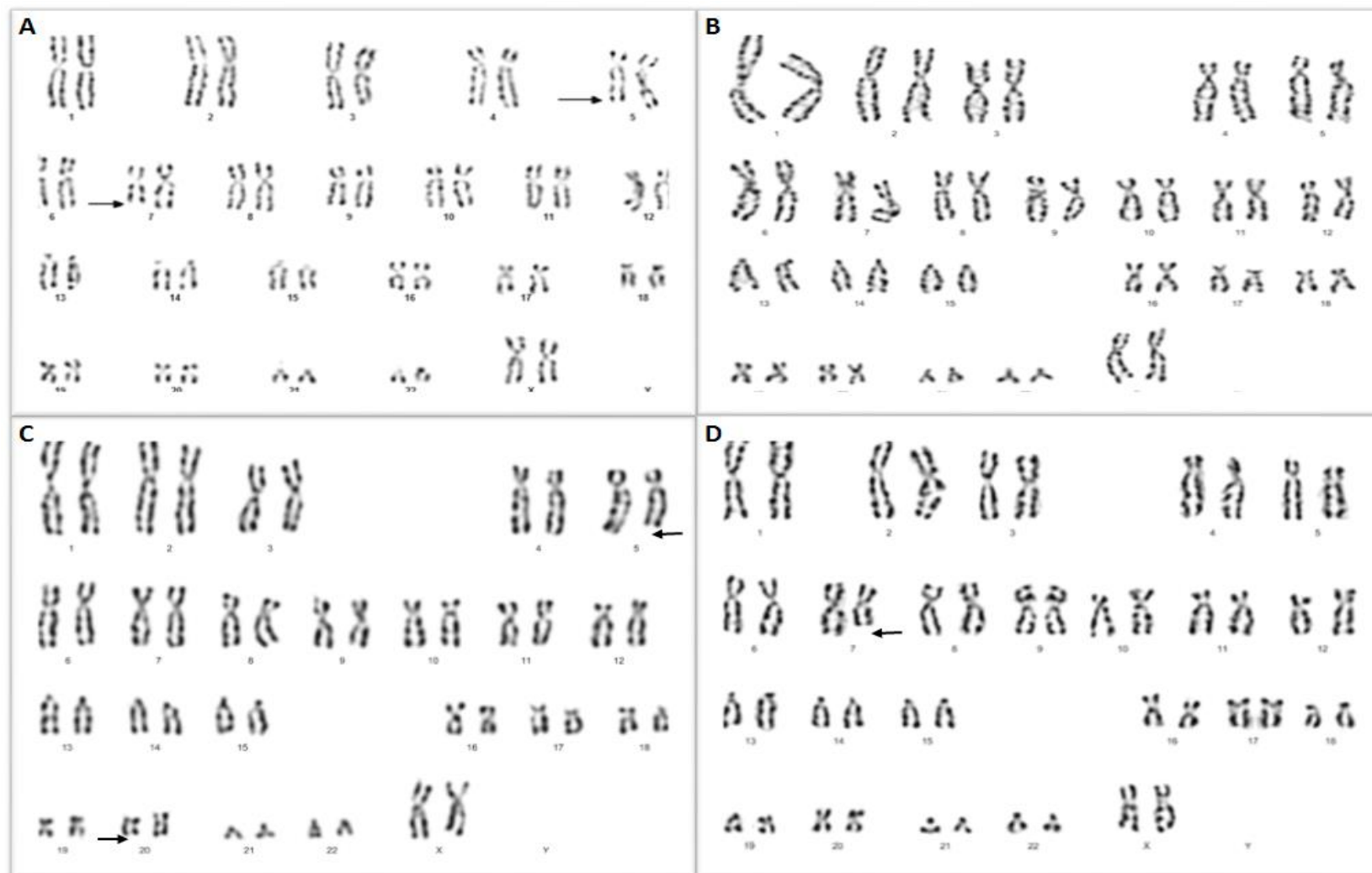
Tabela 6: Caracterização dos pacientes segundo a classificação da OMS 2008

Variáveis	Número de Pacientes	Porcentagem
Classificação da OMS		
CRDU	9	8,91%
ARSA	12	11,88%
CRDM	52	51,48%
AREB I	9	8,91%
AREB II	8	7,92%
Síndrome do 5q	1	0,99%
SMD relacionada a terapia	6	5,94%
LMMC	4	3,97%
Formas da SMD		
Iniciais	73	81,11%
Avançadas	17	18,89%

A citogenética por banda G foi realizada para todos os 101 pacientes, sendo que 69 (68,32%) pacientes apresentaram resultado e 32 (31,68%) pacientes apresentaram ausência de metáfases (Tabela 7). Dos 69 pacientes com resultado citogenético, 40 (57,97%) apresentaram cariótipo normal, frente a 29 (42,03%) de pacientes com alterações, sendo que 11 (15,94%) pacientes apresentaram alteração relacionada ao cromossomo 5 (-5/5q-), 4 (5,79%) pacientes apresentaram alteração relacionada ao cromossomo 7 (-7/7q-) e 11 (15,94%) dos pacientes apresentaram cariótipo com aneuploidia (Tabela 7). A figura 9 exemplifica os resultados da análise citogenética encontrados nesse estudo.

Quanto ao número de alterações, 12 (17,91%) pacientes apresentaram apenas 1 alteração, 9 (13,43%) pacientes apresentaram 2 alterações e 6 (8,96%) pacientes apresentaram cariótipo complexo, com 3 ou mais alterações em um mesmo clone (Tabela 7). Quanto ao prognóstico, estabelecido pelo IPSS-R (GREENBERG *et al*, 2012) houve um predomínio de pacientes com prognóstico favorável (45/72,58%) (Tabela 7).

Figura 9: Representação dos resultados encontrados na citogenética por banda G.



A. Paciente do sexo feminino apresentando cariótipo alterado com del(5q) e del(7q). **B.** Paciente do sexo feminino apresentando cariótipo normal 46,XX [20]. **C.** Paciente do sexo feminino apresentando cariótipo alterado com del(5q) e del(20q). **D.** Paciente do sexo feminino apresentando cariótipo alterado com del(7q).

Tabela 7: Caracterização da citogenética e impacto prognóstico.

Variáveis	Número de Pacientes	Porcentagem
Cariótipo (Normal/Alterado)		
Normal	40	57,97%
Alterado	29	42,03%
Cariótipo (Aneuploidia)		
Normal	40	57,97%
Alterado Aneuplóide	18	26,09%
Alterado não Aneuplóide	11	15,94%
Cariótipo (Deleção do 5q)		
Normal	40	57,97%
Alterado com deleção do 5q	11	15,94%
Alterado sem deleção do 5q	18	26,09%
Cariótipo (Deleção do 7q)		
Normal	40	57,97%
Alterado com deleção do 7q	4	5,79%
Alterado sem deleção do 7q	25	36,24%
Cariótipo (Alterações)		
Normal	40	59,70%
1 alteração	12	17,91%
2 alterações	9	13,43%
3 ou mais alterações (Complexo)	6	8,96%
Prognóstico segundo o IPSS-R		
Muito favorável	1	1,61%
Favorável	45	72,58%
Intermediário	12	19,35%
Desfavorável	1	1,61%
Muito desfavorável	3	4,85%

Com relação ao grupo de risco, os pacientes foram classificados de acordo com o IPSS-R e com o WPSS. Na classificação pelo IPSS-R, houve o predomínio de pacientes de baixo risco e risco intermediário, ambos com 24 (39,34%) pacientes, na classificação pelo WPSS também houve o predomínio de pacientes de baixo risco e de risco intermediário, ambos com 39,34% (24 pacientes) (Tabela 8).

Tabela 8: Caracterização dos grupos de risco dos pacientes com SMD.

Variáveis	Número de Pacientes	Porcentagem
Grupo de risco de acordo com o IPSS-R		
Muito Baixo	6	9,84%
Baixo	24	39,34%
Intermediário	24	39,34%
Alto	4	6,56%
Muito Alto	3	4,92%
Grupo de risco de acordo com o WPSS		
Muito Baixo	4	6,56%
Baixo	24	39,34%
Intermediário	21	34,42%
Alto	10	16,39%
Muito Alto	2	3,29%

Quanto à sobrevida dos pacientes, obtivemos informação sobre o seguimento de 100 dos 101 pacientes, destes, 63 (63%) pacientes foram a óbito. Quanto à evolução para LMA, obtivemos informação de 98 dos 101 pacientes, destes 98, apenas 13 (13,26%) pacientes evoluíram para LMA (Tabela 9).

Tabela 9: Descrição clínica dos pacientes.

Paciente	Sexo	Idade	Celularidade	Cariótipo	OMS	IPSS-R	DT	Ev. LMA	Óbito
1	F	28	-	46,XX[20]	ARSA	Baixo	Sim	Não	Sim
2	M	24	-	46,XY[9]	CRDM	Intermediário	Sim	Não	Sim
3	M	57	Hiper celular	Ausência de metáfases	CRDM	-	Sim	Não	Sim
4	F	78	-	46,X,i(x)(q10),del(17)(q22q23.3)[7]/46,XX[13]	CRDU	Baixo	Não	Não	Sim
5	F	69	Normocelular	46,XX,del(5)(q12q33)[18]/46,XX[2]	SINDROME 5q	Baixo	Sim	Não	Não
6	F	41	Hipocelular	Ausência de metáfases	CRDM	-	Sim		Sim
7	F	84	Normocelular	46,XX[20]	CRDU	Muito Baixo	Não	Não	Sim
8	F	77	-	46,XX[20]	CRDM	Baixo	Sim	Sim	Sim
9	M	76	Hiper celular	178~182<7N>,XXXXXXXXXXYYYYYYY...[24]/46,XY[5]	LMMC	-	Sim	Não	Sim
10	M	85	Hiper celular	46,XY[15]	ARSA	Baixo	Sim	Não	Sim
11	M	48	Normocelular	46,XY,del(4)(q31)[4]/46,XY,del(5)(q21q33)[3]/46,XY[15]	CRDM	Intermediário	Sim	Não	Sim
12	M	67	Normocelular	Ausência de metáfases	AREB II	-	-	Sim	Sim
13	M	31	-	46,XY[24]	CRDM	Intermediário	Não	Não	Não
14	M	74	Hipocelular	46,XY[20]	AREB I	Intermediário	Não	Não	Não
15	M	62	-	Ausência de metáfases	CRDM	-	Sim	Não	Sim
16	M	53	-	46,XY[20]	CRDM	Intermediário	Sim	Não	
17	F	65	Hiper celular	46,XX[20]	CRDM	Baixo	Não	Não	Não
18	M	67	-	Ausência de metáfases	AREB I	-	Sim	Não	Sim
19	M	64	Normocelular	46,XY[17]	LMMC	-	Não	Sim	Sim
20	M	91	-	46,X-Y[4]/46,XY[16]	ARSA	Baixo	Não	Não	Sim
21	M	62	Hiper celular	47,XY,+8[6]/47,XY,del(7)(q32),+8[7]/46,XY[2].	AREB II	Muito Alto	Sim	Não	Sim
22	M	85	Normocelular	46,XY[20]	AREB I	Intermediário	Não	Não	Sim
23	F	65	-	46,XY[9]	t-SMD	-	Não	Não	Não
24	M	33	Normocelular	46,XY[5]	CRDM	Intermediário	Sim	Não	Sim
25	F	84	-	46,XX,del(20)(q13.1)[7]/46,XX[16]	CRDU	Muito Baixo	-	Não	Sim
26	F	72	Hiper celular	46,XX[6]	CRDU	Muito Baixo	Não	Não	Não
27	F	51	Hiper celular	46,XX[11]	ARSA	Muito Baixo	Não	Não	Não

28	M	62	Hiper celular	47,XY,+15[10]/46,XY[10]	CRDM	Intermediário	Sim	Não	Sim
29	M	45	Hipo celular	47,XY,+mar[3]/46,XY[17]	CRDM	Intermediário	Não	Não	Não
30	M	67	Hiper celular	46,XY[20]	AREB I	Intermediário	Não	Não	Sim
31	M	70	Hiper celular	Ausência de metáfases	CRDM	-	Não	Não	Sim
32	M	89	-	46,XY[17]	AREB II	Intermediário	Sim	Sim	Sim
33	M	82	Hiper celular	46,XX[20]	ARSA	Baixo	Sim	Não	Sim
34	F	77	-	Ausência de metáfases	AREB I	-	Sim	Não	Sim
35	M	68	Hiper celular	Ausência de metáfases	AREB II	-	Sim	Sim	Sim
36	M	80	-	47,XY,+8[12]/46,XY[8]	AREB I	Intermediário	Não	Não	Sim
37	M	89	Hiper celular	46,XY,del(5)(q31q35)[6]/46,XY[17]	CRDM	Intermediário	Sim	Sim	Sim
38	F	87	-	46,XX[20]	AREB I	Intermediário	Não	Não	Sim
39	M	83	Normo celular	46,XY,del(17)(q22)[3]/47,XY,+mar[4]/46,XY[20]	CRDM	Baixo	Não	Não	Sim
40	F	42	Normo celular	Ausência de metáfases	ARSA	-	Sim	Não	Sim
41	M	76	Hiper celular	46,XY[20]	CRDM	Muito Baixo	Não	Não	Não
42	F	67	Hiper celular	46,XX[7]	CRDM	Baixo	Não	Não	Não
43	M	79	Hiper celular	Ausência de metáfases	CRDM	-	Sim	Sim	Sim
44	M	69	Hiper celular	46,XY,del(5)(q15q33)[7]/46,XY[11]	CRDM	Intermediário	Sim	Não	Sim
45	M	96	-	ausência de metáfases	CRDU	-	-	Não	Não
46	M	82	-	Ausência de metáfases	CRDM	-	Não	Não	Sim
47	F	30	Hipo celular	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]	AREB II	Muito Alto	Sim	Não	Sim
48	M	81	Hiper celular	46,XY[20]	LMMC	-	Não	Sim	Sim
49	M	62	-	Ausência de metáfases	CRDM	-	-	Não	Não
50	M	40	Hipo celular	46,XY[10]	CRDM	Intermediário	Não	Não	Não
51	M	66	Hiper celular	47,XY,+mar[5],46,XY[11]	CRDM	Alto	Sim	Não	Sim
52	M	45	Normo celular	46,XY,-?10,+mar[5]/46,XY[1]	CRDM	Intermediário	Sim	Não	Sim
53	M	43	Hiper celular	46,XY[5]	CRDM	Baixo	Sim	Não	Sim

54	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]	CRDM	Alto	Sim	Não	Sim
55	M	86	Hipocelular	Ausência de metáfases	CRDM	-	Sim	Não	Sim
56	M	79	Hiper celular	89,XXY,-20,-22,-Y[4]/46,XY,del(16)(?q22)[5]/46,XY[11]	CRDM	Intermediário	Sim	Não	Não
57	M	49	Hiper celular	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]	CRDM	Alto	Sim	Não	Sim
58	M	70	Hiper celular	47,XY,del(5)(q31),+mar[7]/46,XY,del(11)(q23)[3]/46,XY,del(5)(q31),del(11)(q23)[5].	CRDM	Baixo	Sim	Sim	Sim
59	M	87	Normocelular	46,XY[6]	CRDM	Baixo	Não	Não	Não
60	M	59	-	Ausência de metáfases	CRDM	-	Não	Não	Não
61	M	47	Hipocelular	46,XY[8]	CRDM	Baixo	Não	Sim	Sim
62	M	48	Hipocelular	46,XY	CRDM	Baixo	Não	Não	Não
63	M	64	Hiper celular	37,X,-2,-3,-9,-11,-12,-15,-16,-18,-Y[8]/46,XY,del(5)(q15q33)[5]/46,XY[6]	AREB II	Muito Alto	Sim	Não	Não
64	M	80	Hiper celular	Ausência de metáfases	CRDM	-	Não	Não	Sim
65	M	89	Hiper celular	46,XY[10]	CRDM	Baixo	Não		Sim
66	F	57	Hiper celular	46,XX[20]	CRDM	Baixo	Não	Não	Não
67	F	80	-	46,XX[20]	CRDM	Intermediário	Sim	Não	Sim
68	F	47	-	46,XX[15]	CRDU	Baixo	Sim	Não	Sim
69	F	59	Hiper celular	Ausência de metáfases	CRDM	-	Sim	Sim	Sim
70	F	41	-	46,XX,del(5)(q15q33)[9]/46,XX,del(5)(q15q33),del(11)(?q25)[7]/46,XX[4]	CRDM	Intermediário	Sim	Não	Sim
71	F	66	Hiper celular	Ausência de metáfases	ARSA	-	Sim	Não	Não
72	F	57	Hiper celular	46,XX[8]	CRDM	Intermediário	Sim	Não	Sim
73	F	71	Hiper celular	Ausência de metáfases	CRDM	-	Não		Não
74	F	65	-	Ausência de metáfases	t-SMD	-	-	Não	Não
75	F	83	Hiper celular	46,XX[20]	LMMC	-	Não	Não	Não
76	F	72	-	Ausência de metáfases	AREB II	-	Sim	Não	Sim
77	F	65	Normocelular	Ausência de metáfases	CRDM	-	Sim	Não	Não
78	F	41	Hipocelular	44,XX,-13,-17[4]/46,XX[5]	CRDM	Intermediário	Sim	Não	Não

79	F	71	-	175,XXXXXXXXX,-5,-6,-7,-8,-9,-11,-13,-14[4]/46,XX,del(5)(q15q33)[8]/46,XX[19]	t-SMD	-	-	Não	Nao
80	F	60	Normocelular	Ausência de metáfases	CRDU	-	-	Não	Nao
81	F	84	Hiper celular	Ausência de metáfases	ARSA	-	Não	Não	Sim
82	F	74	Hiper celular	Ausência de metáfases	CRDM	-	Não	Não	Nao
83	F	81	Hiper celular	46,XX[5]	ARSA	Baixo	Sim	Não	Sim
84	F	46	Hiper celular	46,XX[8]	CRDU	Baixo	Sim	Não	Nao
85	F	36	-	Ausência de metáfases	t-SMD	-	-	Não	Nao
86	M	59	Hipo celular	46,XY,del(5)(?q15q33)[8]/46,XY[12]	ARSA	Intermediário	Não	Sim	Sim
87	F	64	Hiper celular	Ausência de metáfases	CRDM	-	Sim	Não	Sim
88	M	74	Normocelular	46,XY[11]	AREB I	Alto	Sim	Não	Sim
89	F	23	Hipo celular	46,XX,del(5)(q15q33)[4]/46,XX[18]	CRDM	Baixo	Não	Não	Sim
90	F	40	-	Ausência de metáfases	CRDM	-	Não	Não	Nao
91	F	81	Hiper celular	47,XX,t(4;11)(q27;q32),+mar[4]/46,XX[16]	CRDM	Intermediário	Não	Não	Nao
92	F	77	Normocelular	46,XX[3]	CRDM	Baixo	Não	Não	Nao
93	F	26	Hipo celular	46,XX,del(17)(p11.2)93]/46,XX[4]	t-SMD	-	Não	Não	Nao
94	M	67	Hiper celular	Ausência de metáfases	CRDM	-	Sim	Não	Sim
95	F	73	Hiper celular	46,XX[12]	ARSA	Muito Baixo	Não	Não	Nao
96	F	59	-	46,XX[20]	CRDU	Baixo	Sim	Não	Nao
97	M	74	Hiper celular	46,XY[6]	ARSA	Baixo	Não	Não	Nao
98	M	73	-	Ausência de metáfases	AREB II	-	Sim	Não	Sim
99	M	66	Hiper celular	Ausência de metáfases	AREB I	-	Sim	Não	Sim
100	F	81	Hiper celular	46,XX[20]	t-SMD	-	Não	Não	Nao
101	F	70	-	Ausência de metáfases	CRDM	-	Não	Sim	Sim

Legenda: M (Masculino), F (Feminino), OMS (Organização Mundial de Saúde), IPSS-R (Sistema Internacional de Score Prognóstico Revisado), DT (Dependência Transfusional), Ev.LMA (Evolução para Leucemia Mielóide Aguda), CRDU (Citopenia Refratária com Displasia em Única linhagem), ARSA (Anemia Refratária com Sideroblastos em Anel), CRDM (Citopenia Refratária com Displasia em Múltiplas linhagens), AREB I (Anemia Refratária com Excesso de Blastos tipo I), AREB II ((Anemia Refratária com Excesso de Blastos tipo II), t-SMD (SMD relacionada a terapia), LMMC (Leucemia Mielomonocítica Crônica).

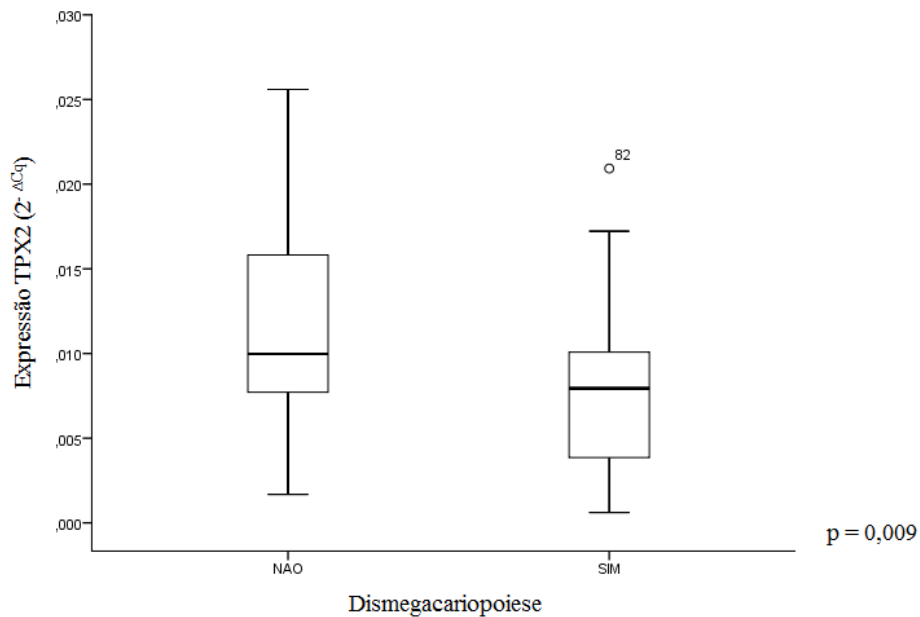
4.2. Análise da expressão gênica por qPCR

As associações entre os níveis de expressão gênica dos genes *TPX2*, *AURKA*, *AURKB*, *MAD2*, *CDC20* e *CDKN1A* e as variáveis clínico-laboratoriais, bem como a associação com os indivíduos controles, serão apresentados a seguir. Para melhor entendimento, os resultados serão apresentados separadamente para cada gene estudado.

4.2.1. Análise da expressão do gene *TPX2*

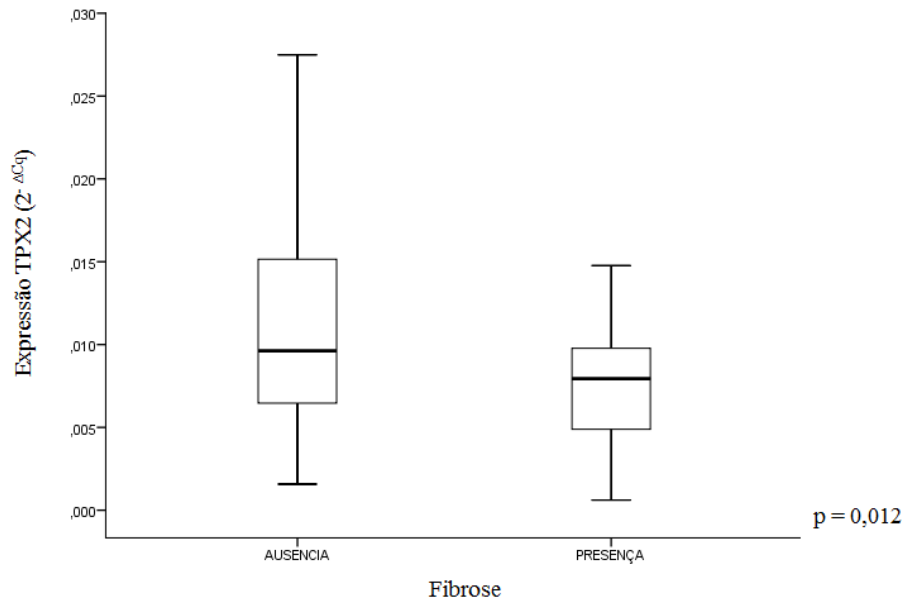
Para o gene *TPX2*, foram encontradas associações significantes com relação às variáveis dismegacariopoiese e fibrose medular. Quanto à variável dismegacariopoiese na medula óssea dos pacientes com SMD, foi observado um menor nível de expressão do gene *TPX2* em pacientes que apresentam displasia no setor megacariocítico ($p = 0,009$) (Figura 10).

Figura 10: Níveis de expressão do gene *TPX2* em pacientes com SMD em relação a presença de dismegacariopoiese na MO.



Quanto à variável que analisa a presença e ausência de fibrose medular, identificamos um menor nível de expressão do gene *TPX2* em pacientes que apresentavam fibrose na medula óssea ($p = 0,012$) (Figura 11).

Figura 11: Níveis de expressão do gene *TPX2* em relação a fibrose na MO.



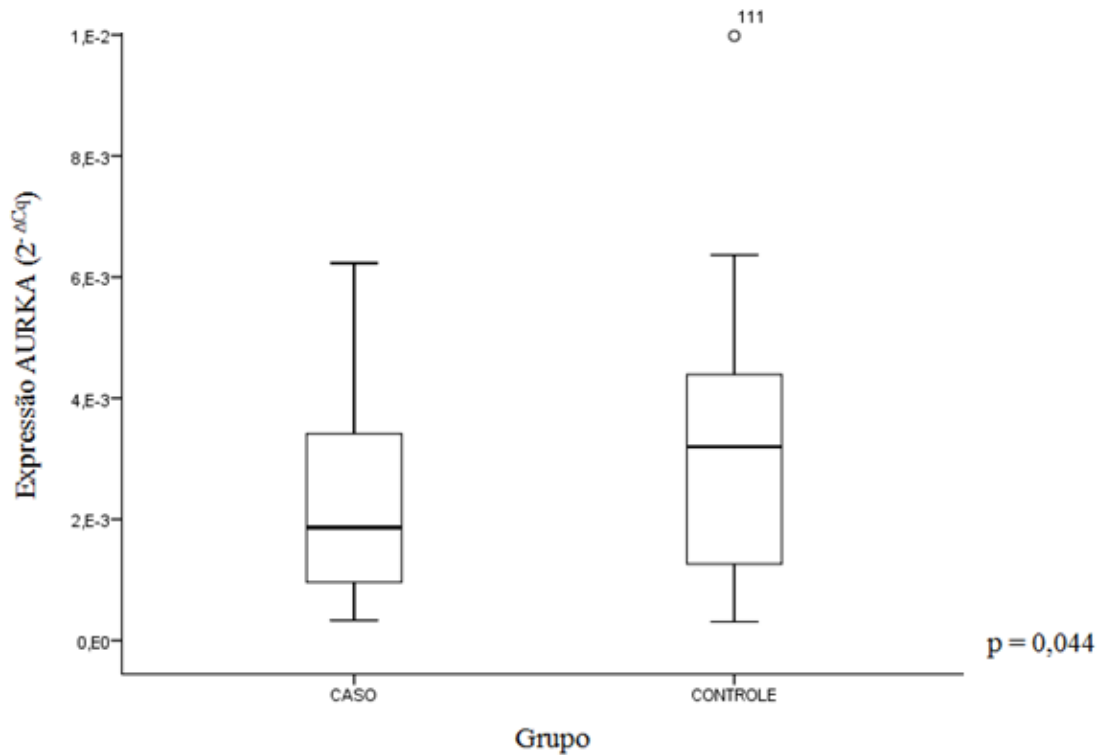
Não houve associações significantes com relação aos níveis de expressão do gene *TPX2* e as variáveis grupo, idade, classificação da OMS (2008), forma da SMD, celularidade da medula óssea, displasias na medula óssea, diseritropoiese, disgranulopoiese, presença de micromegacariócito, sideroblastos em anel, faixas de porcentagens de sideroblastos em anel, porcentagens de blastos (IPSS-R), cariótipo (normal e alterado), cariótipo (aneuploidia), cariótipo (alteração no cromossomo 5), cariótipo (alteração no cromossomo 7), cariótipo (número de alterações), Quanto ao prognóstico (IPSS-R), classificação dos valores de hemoglobina (IPSS-R), classificação dos valores de neutrófilos (IPSS-R), classificação dos valores de plaquetas (IPSS-R), classificação do número de citopenias no sangue periférico, classificação do grupo de risco de acordo com o IPSS-R, classificação do grupo de risco de acordo com o WPSS, dependência transfusional, tratamento com eritropoietina, óbito e evolução para LMA ($p > 0,05$).

4.2.2. Análise da expressão do gene *AURKA*

Para o gene *AURKA*, foram encontradas associações significantes com relação às variáveis grupo (caso e controle), celularidade, número de displasias, sideroblastos em anel e cariótipo (normal/ alterado, alteração no cromossomo 5, alteração no cromossomo 7, aneuploidia e número de alterações).

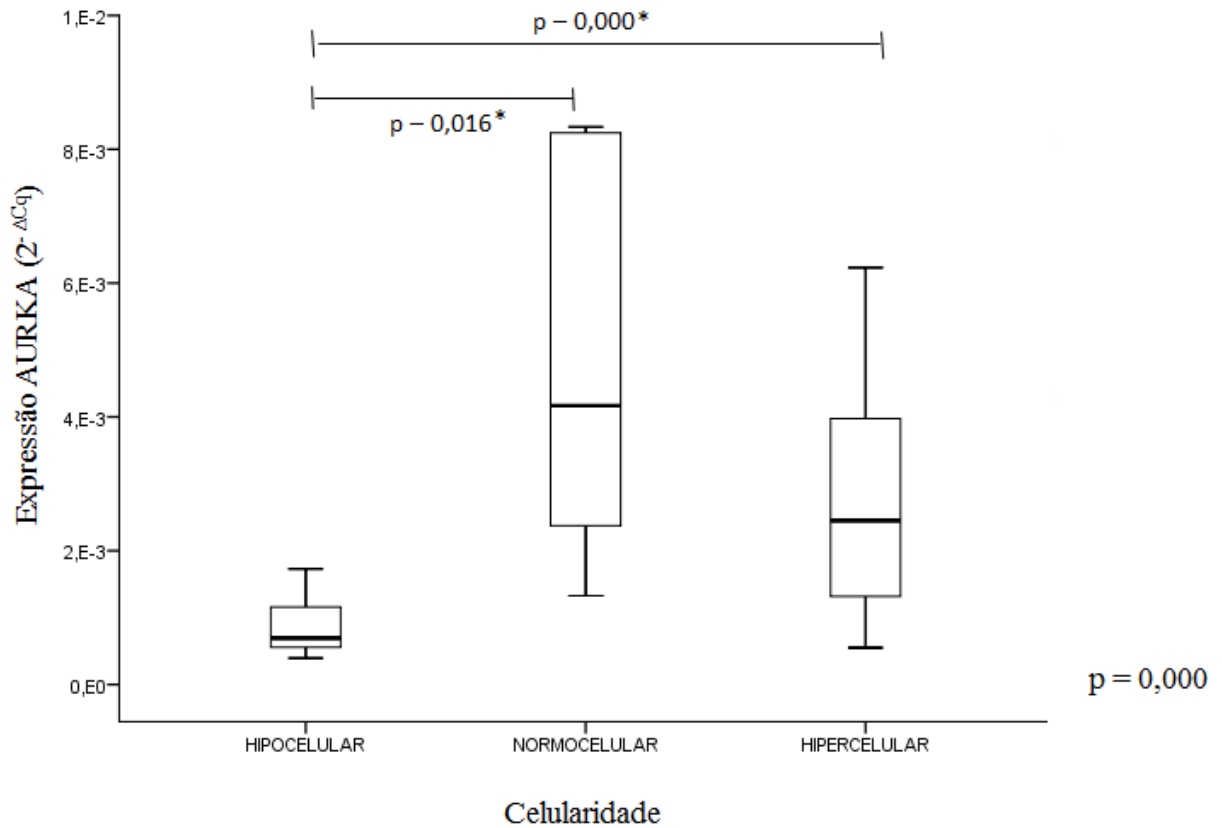
Quanto aos grupos avaliados, observou-se uma diminuição do nível de expressão do gene *AURKA* nos pacientes portadores de SMD, quando comparados aos controles saudáveis ($p = 0,044$) (Figura 12).

Figura 12: Níveis de expressão do gene *AURKA* em pacientes com SMD em relação aos indivíduos controle.



Quanto à celularidade, observou-se que um menor nível de expressão do gene *AURKA* está associado a pacientes com medula óssea hipocelular, quando comparados a pacientes com medula óssea normocelular ($p = 0,016$) (Figura 13) e quando comparados a pacientes com medula óssea hiper celular ($p = 0,000$) (Figura 13).

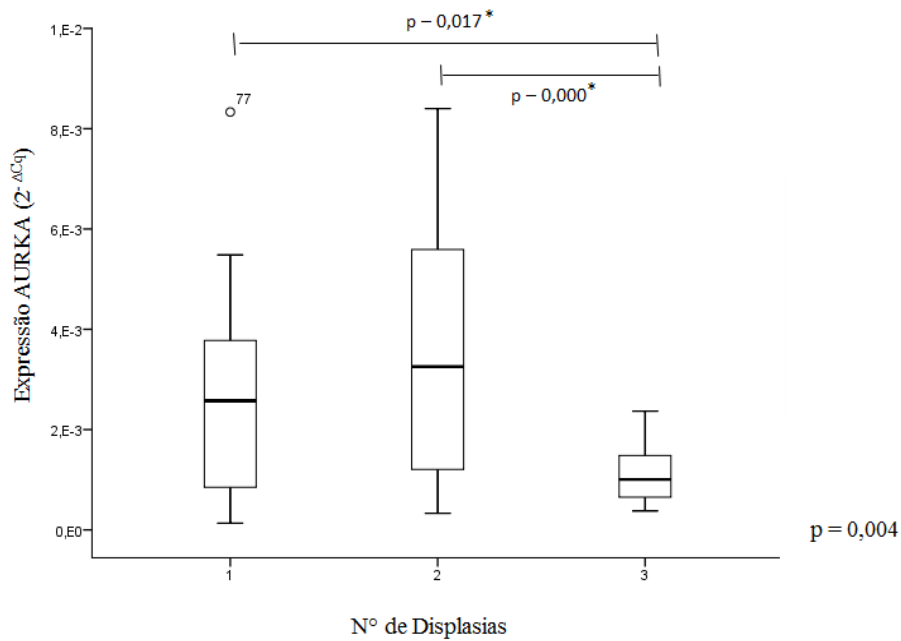
Figura 13: Níveis de expressão do gene *AURKA* em pacientes com SMD em relação a celularidade da MO.



*Valor do p para o teste de Games-Howell (comparação entre grupos)

Com relação ao número de displasias na medula óssea, os níveis de expressão do gene *AURKA* estão mais baixos em pacientes com 3 displasias na medula óssea, comparado com pacientes que apresentaram 2 displasias ($p = 0,000$) (Figura 14) e a pacientes que apresentaram apenas 1 displasia na medula óssea ($p = 0,017$) (Figura 14).

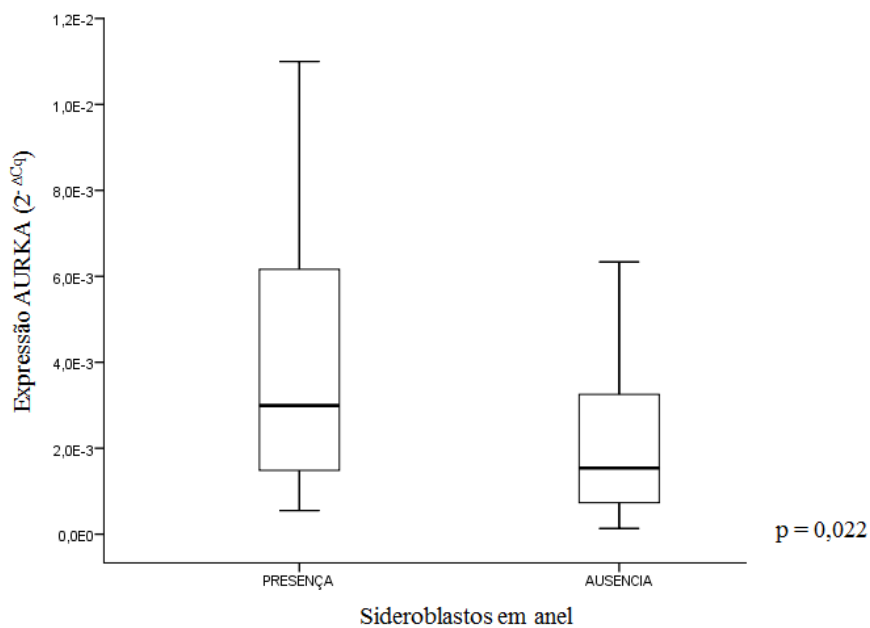
Figura 14: Níveis de expressão do gene *AURKA* em pacientes com SMD em relação ao número de displasias na MO.



*Valor do p para o teste de Games-Howell (comparação entre grupos)

Quanto à presença de sideroblastos em anel, observou-se um menor nível da expressão do gene *AURKA* em pacientes com ausência de sideroblastos em anel na medula óssea ($p = 0,022$) (Figura 15).

Figura 15: Níveis de expressão do gene *AURKA* em pacientes com SMD em relação a presença de sideroblastos em anel na MO.



Com relação ao cariótipo, os pacientes que apresentaram resultado normal apresentaram maior nível de expressão do gene *AURKA*, em comparação a pacientes com cariótipo alterado ($p = 0,000$) (Figura 16), a pacientes com alteração no cromossomo 5 ($p = 0,012$) (Figura 17), pacientes com alteração no cromossomo 7 ($p = 0,010$) (Figura 18), pacientes com aneuploidia ($p = 0,001$) (Figura 19) e pacientes com cariótipo complexo ($p = 0,008$) (Figura 20).

Figura 16: Níveis de expressão do gene *AURKA* em pacientes com SMD em relação ao cariótipo.

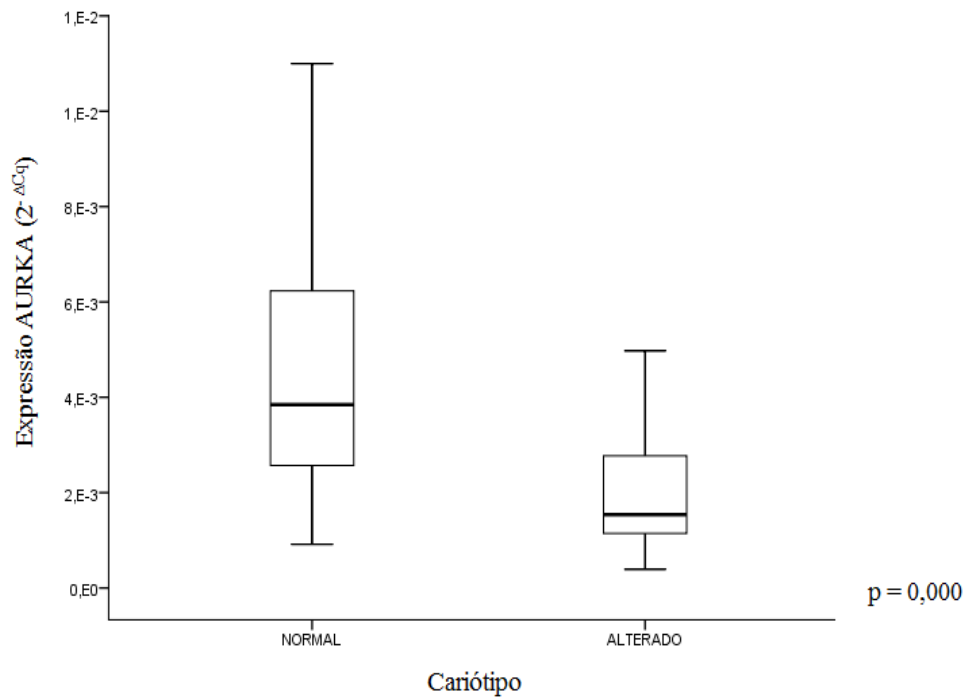
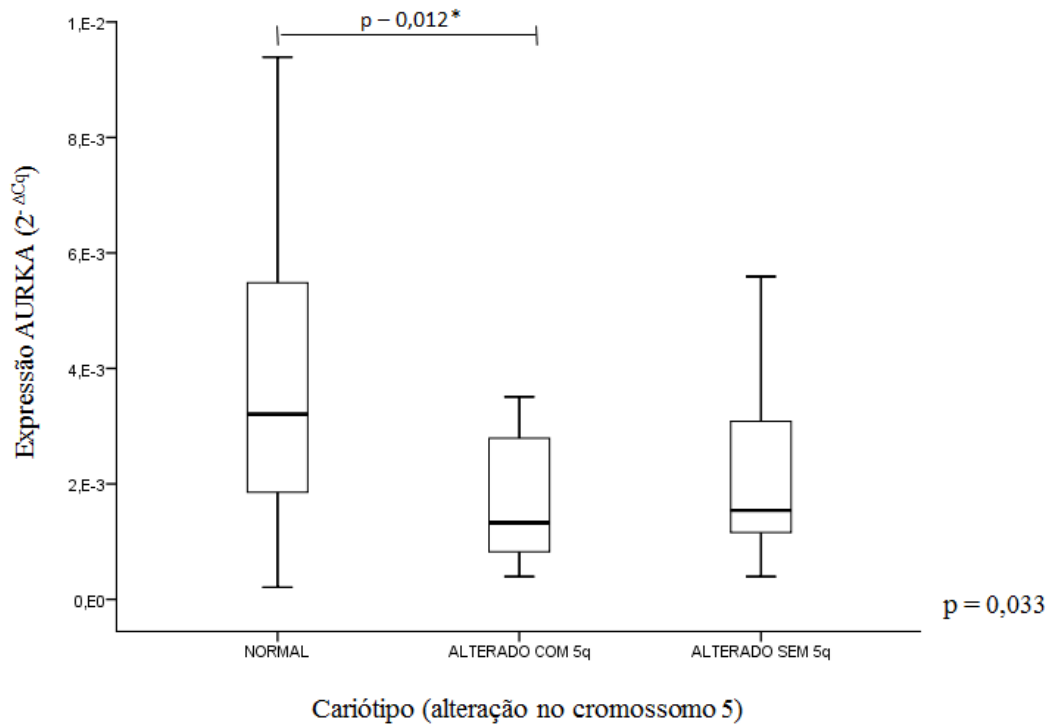
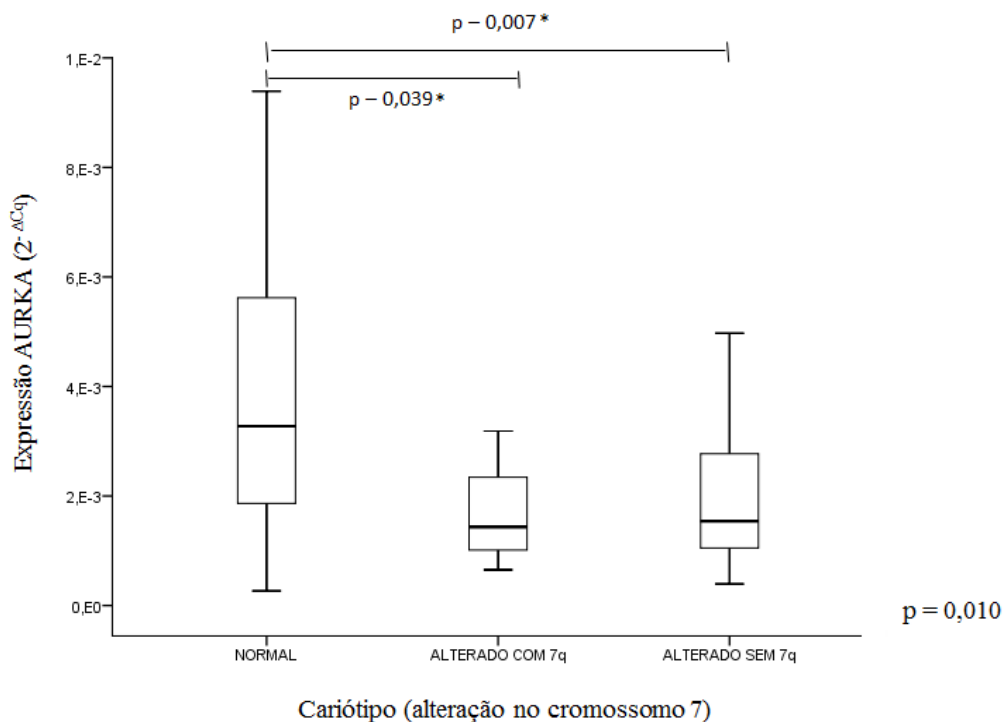


Figura 17: Níveis de expressão do gene *AURKA* em pacientes com SMD em relação ao cariótipo com alteração no cromossomo 5.



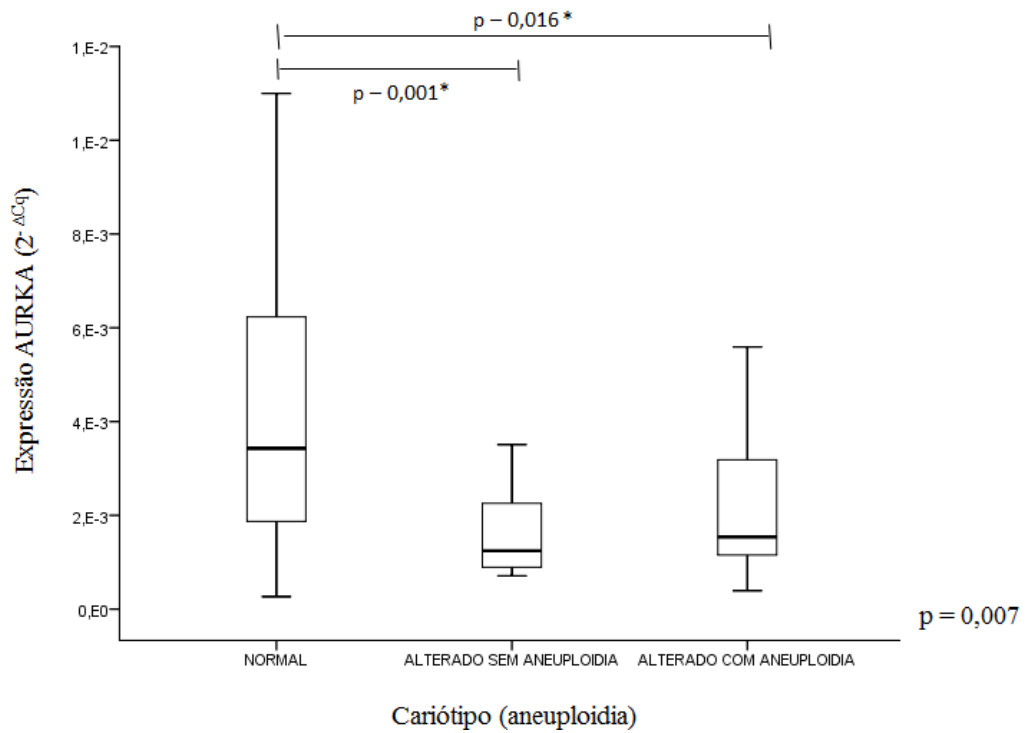
*Valor do p para o teste de Games-Howell (comparação entre grupos)

Figura 18: Níveis de expressão do gene *AURKA* em pacientes com SMD em relação ao cariótipo com alteração no cromossomo 7.



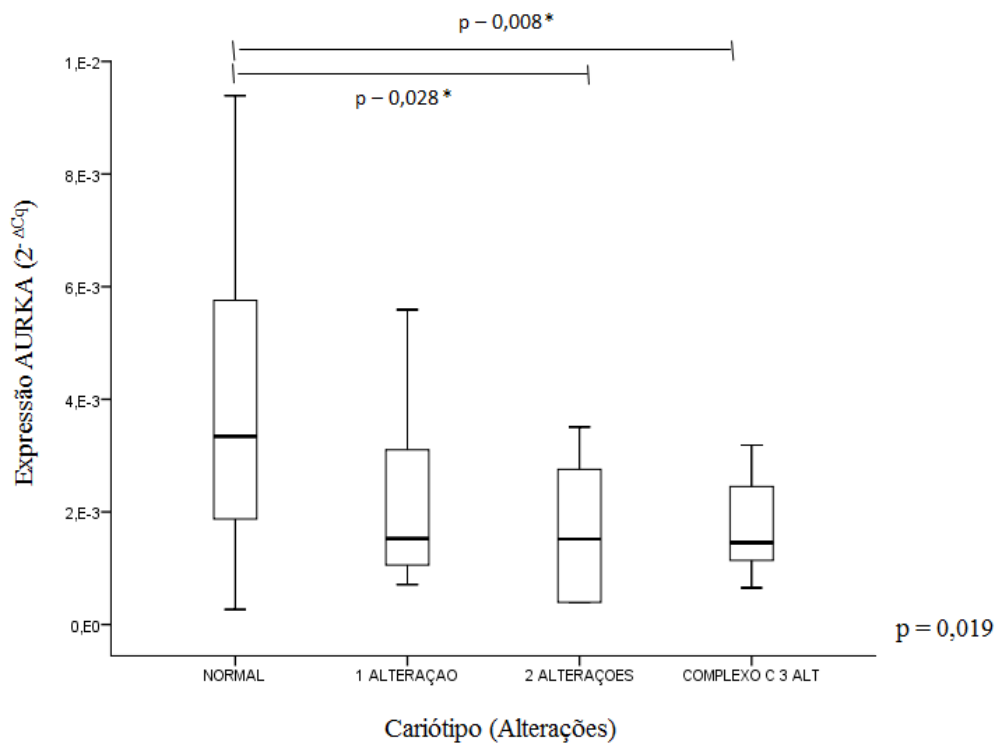
*Valor do p para o teste de Games-Howell (comparação entre grupos)

Figura 19: Níveis de expressão do gene *AURKA* em pacientes com SMD em relação ao cariótipo com aneuploidia.



*Valor do p para o teste de Games-Howell (comparação entre grupos)

Figura 20: Níveis de expressão do gene *AURKA* em pacientes com SMD em relação ao número de alterações no cariótipo.



*Valor do p para o teste de Games-Howell (comparação entre grupos)

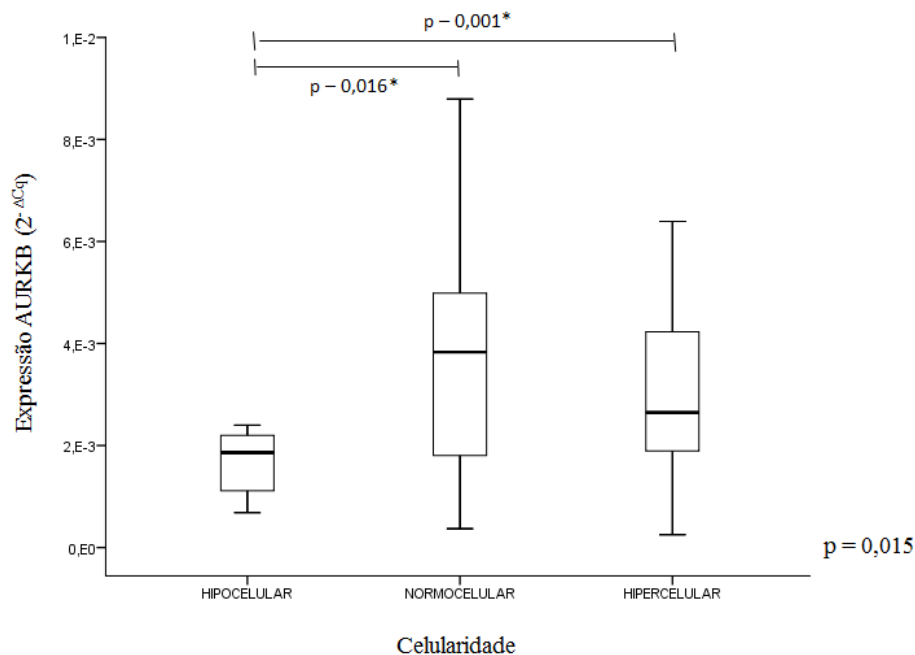
Não houve associações significantes com relação aos níveis de expressão do gene *AURKA* e as variáveis classificação da OMS (2008), idade, forma da SMD, fibrose na medula óssea, diseritropoiese, disgranulopoiese, dismegacariopoiese, presença de micromegacariócito, faixas de porcentagens de sideroblastos em anel, porcentagens de blastos (IPSS-R), Quanto à prognóstico (IPSS-R), classificação dos valores de hemoglobina (IPSS-R), classificação dos valores de neutrófilos (IPSS-R), classificação dos valores de plaquetas (IPSS-R), classificação do número de citopenias no sangue periférico, classificação do grupo de risco de acordo com o IPSS-R, classificação do grupo de risco de acordo com o WPSS, dependência transfusional, óbito, evolução para LMA e resposta ao tratamento com Eritropoietina ($p > 0,05$).

4.2.3. Análise da expressão do gene *AURKB*

Para o gene *AURKB*, foram encontradas associações significantes com relação às variáveis celularidade, fibrose, sideroblastos em anel, cariótipo, hemoglobina e número de citopenias.

Quanto à celularidade, observou-se que um menor nível de expressão do gene *AURKB* está associado a pacientes com medula óssea hipocelular, quando comparados a pacientes com medula óssea normocelular ($p = 0,016$) (Figura 21) e quando comparados a pacientes com medula óssea hipercelular ($p = 0,001$) (Figura 21).

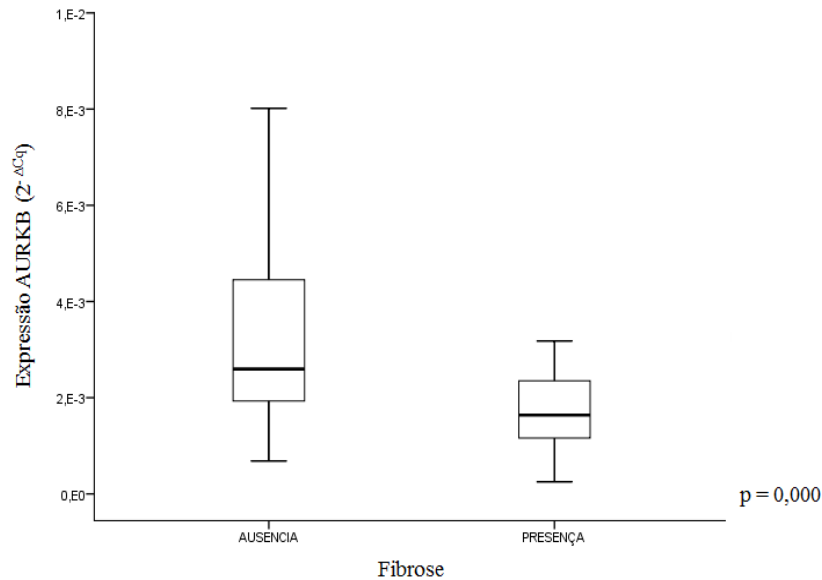
Figura 21: Níveis de expressão do gene *AURKB* em pacientes com SMD em relação celularidade da MO.



*Valor do p para o teste de Games-Howell (comparação entre grupos)

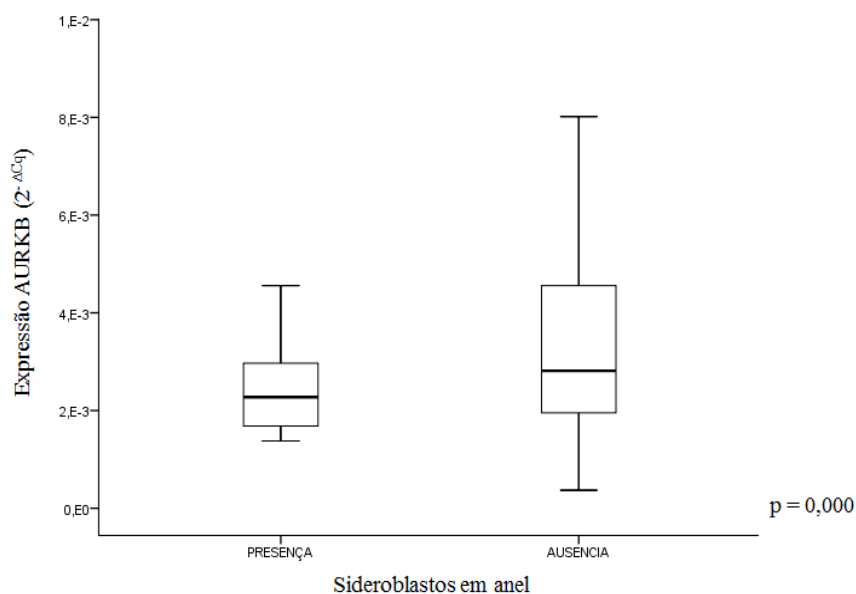
Quanto à fibrose medular, os níveis de expressão do gene *AURKB* estão diminuídos em pacientes que apresentaram fibrose na medula óssea ($p = 0,000$) (Figura 22).

Figura 22: Níveis de expressão do gene *AURKB* em pacientes com SMD em relação a fibrose na MO.



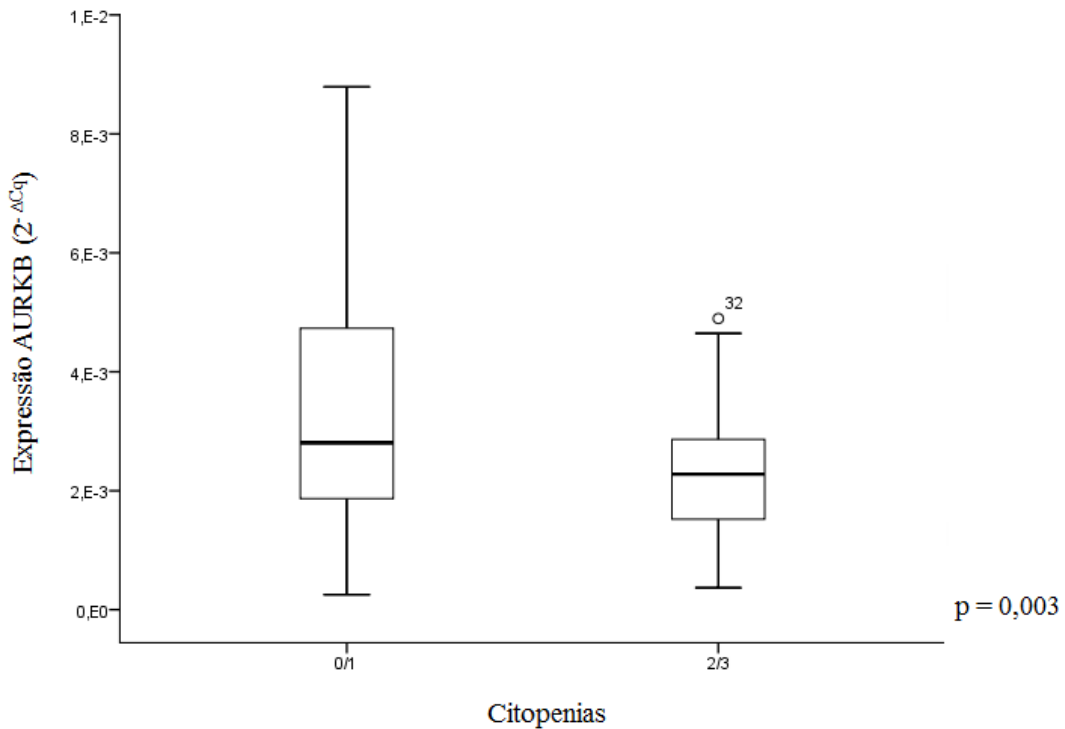
Ao analisarmos a presença de sideroblastos em anel, observou-se que um aumento dos níveis de expressão do gene *AURKB* em pacientes que apresentaram ausência de sideroblastos em anel na medula óssea ($p = 0,000$) (Figura 23).

Figura 23: Níveis de expressão do gene *AURKB* em pacientes com SMD em relação a presença de sideroblastos em anel na MO.



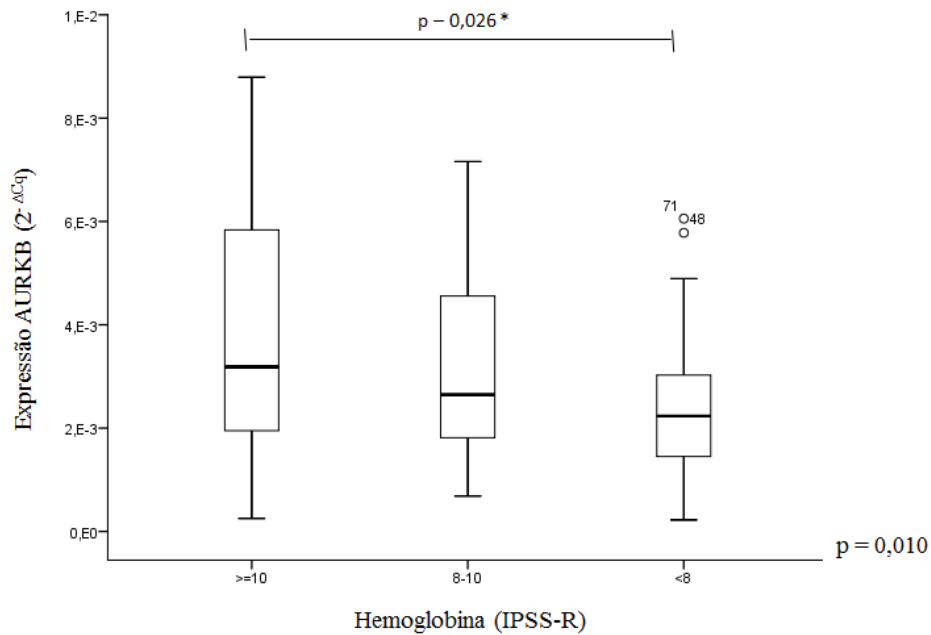
Quanto ao número de citopenias no sangue periférico, observou-se que os níveis de expressão do gene *AURKB* estão mais baixos em pacientes que apresentaram 2 ou 3 citopenias ($p = 0,003$) (Figura 24).

Figura 24: Níveis de expressão do gene *AURKB* em pacientes com SMD em relação ao número de citopenias no SP.



Com relação aos valores de hemoglobina, os níveis de expressão do gene *AURKB* apresentaram-se mais baixos em pacientes com hemoglobina inferior a 8 g/dL, quando comparado a pacientes com hemoglobina superior a 10 g/dL ($p = 0,026$) (Figura 25).

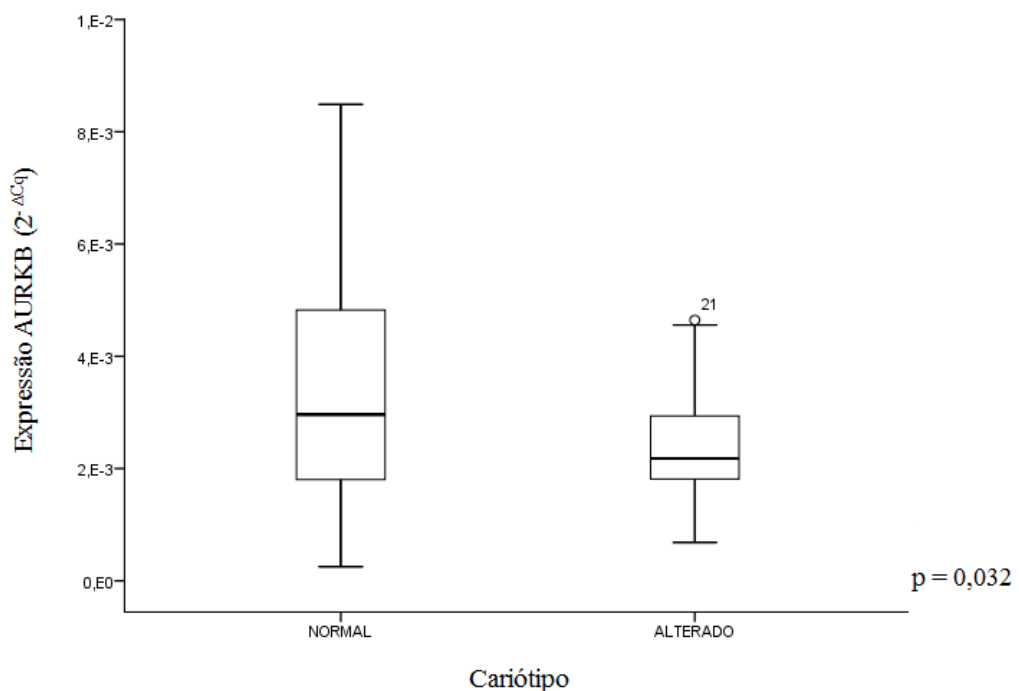
Figura 25: Níveis de expressão do gene *AURKB* em pacientes com SMD em relação a hemoglobina.



*Valor do p para o teste de Games-Howell (comparação entre grupos)

Quanto ao cariótipo, observou-se que níveis de expressão do gene *AURKB* estão diminuídos nos pacientes com cariótipo alterado, em comparação com os que apresentavam cariótipo normal ($p = 0,032$) (Figura 26).

Figura 26: Níveis de expressão do gene *AURKB* em pacientes com SMD em relação ao cariótipo



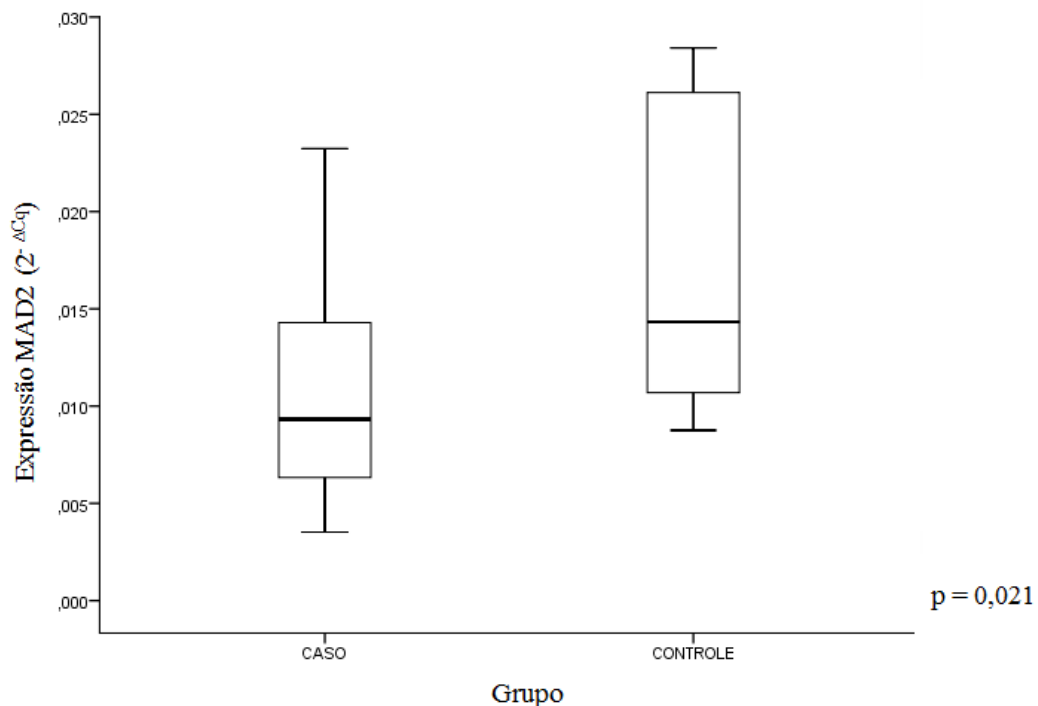
Não houveram associações significantes com relação ao nível de expressão do gene *AURKB* e as variáveis grupo, idade, classificação da OMS (2008), forma da SMD, displasias na medula óssea, diseritropoiese, disgranulopoiese, dismegacariopoiese, presença de micromegacariócito, faixas de porcentagens de sideroblastos em anel, porcentagens de blastos (IPSS-R), cariótipo (aneuploidia), cariótipo (alteração no cromossomo 5), cariótipo (alteração no cromossomo 7), cariótipo (número de alterações), Quanto ao prognóstico (IPSS-R), classificação dos valores de neutrófilos (IPSS-R), classificação dos valores de plaquetas (IPSS-R), classificação do grupo de risco de acordo com o IPSS-R, classificação do grupo de risco de acordo com o WPSS, dependência transfusional, óbito, evolução para LMA e resposta ao tratamento com Eritropoietina ($p > 0,05$).

4.2.4. Análise da expressão do gene *MAD2*

Para o gene *MAD*, foram encontradas associações significantes com relação às variáveis grupo, celularidade, contagem de neutrófilos e número de citopenias periféricas.

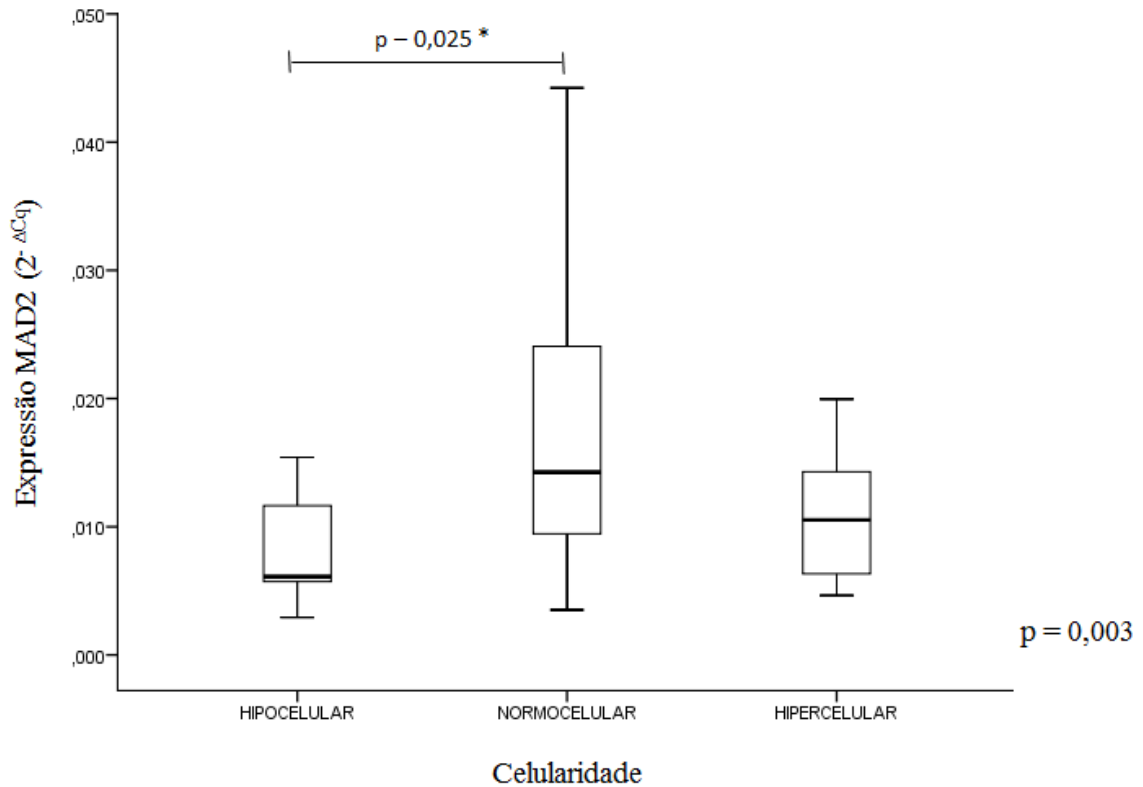
Ao compararmos os pacientes com SMD e o grupo controle, observamos que os níveis de expressão do gene *MAD2* estão menores nos pacientes com SMD ($p = 0,021$) (Figura 27).

Figura 27: Níveis de expressão do gene *MAD2* em pacientes com SMD em relação ao grupo controle



Quanto à celularidade, observou-se que um menor nível de expressão do gene *MAD2* está associado a pacientes com medula óssea hipocelular, quando comparados a pacientes com medula óssea normocelular ($p = 0,025$) (Figura 28).

Figura 28: Níveis de expressão do gene *MAD2* em pacientes com SMD em relação a celularidade da MO.



*Valor do p para o teste de Games-Howell (comparação entre grupos)

Com relação aos achados no sangue periférico, a expressão do gene *MAD2* mostrou-se menor em pacientes com contagem absoluta de neutrófilos (ANC) inferior a $800/\text{mm}^3$ ($p = 0,020$) (Figura 29) e com relação ao número de displasias, o gene *MAD2* também apresentou uma menor expressão nos pacientes com 2 ou 3 citopenias periféricas ($p = 0,000$) (Figura 30).

Figura 29: Níveis de expressão do gene *MAD2* em pacientes com SMD em relação a contagem de neutrófilos no SP.

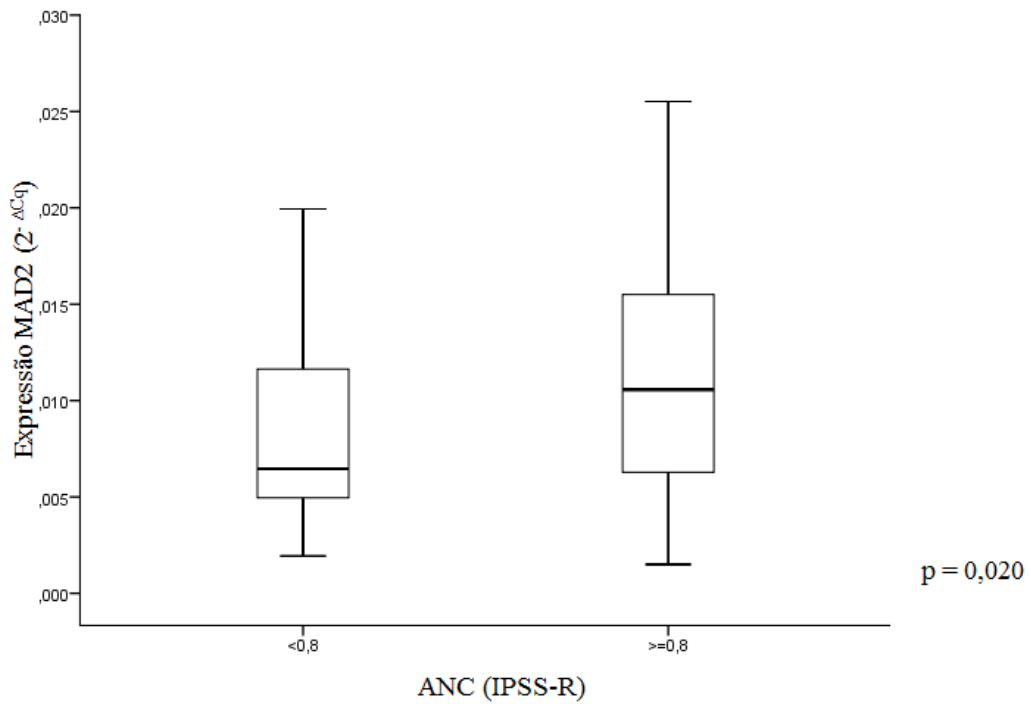
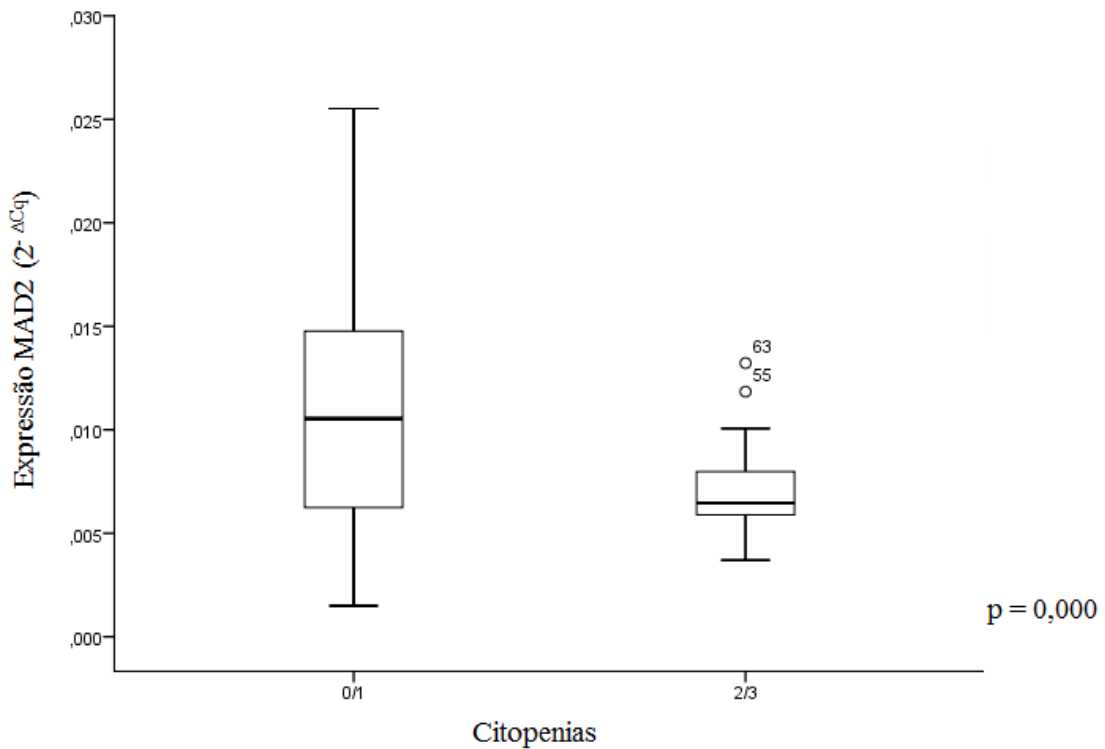


Figura 30: Níveis de expressão do gene *MAD2* em pacientes com SMD em relação ao número de citopenias no SP.



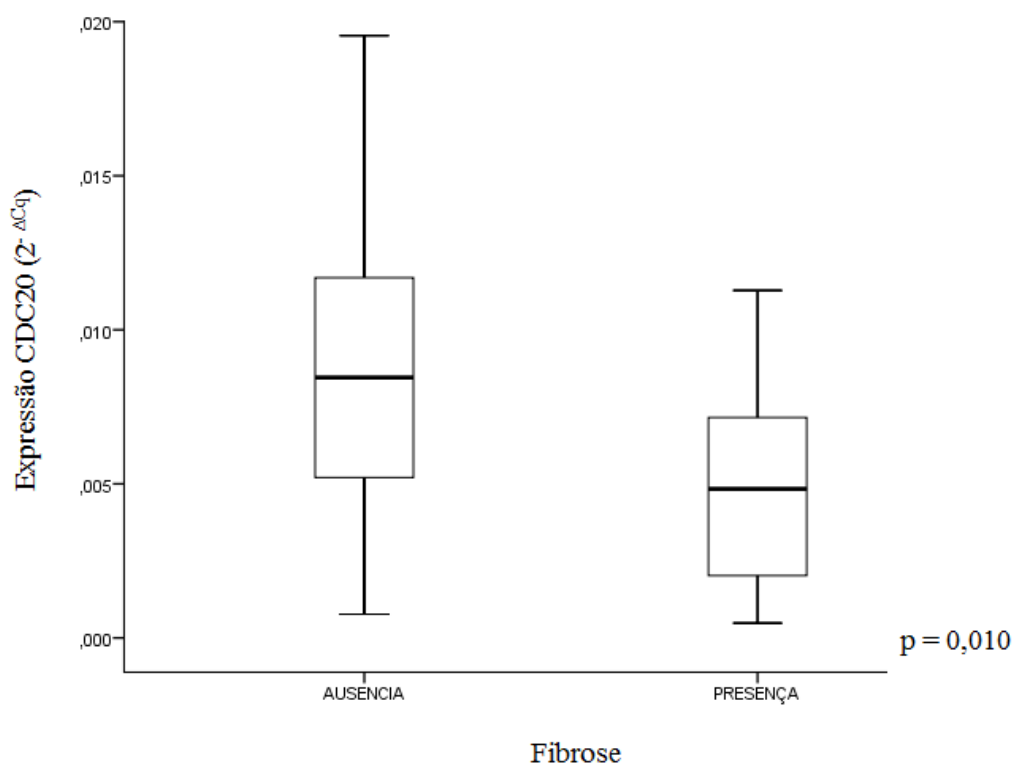
Não houve associações significantes com relação aos níveis de expressão do gene *MAD2* e as variáveis idade, classificação da OMS (2008), forma da SMD, fibrose na medula óssea, displasias na medula óssea, diseritropoiese, disgranulopoiese, dismegacariopoiese, presença de micromegacariócito, sideroblastos em anel, faixas de porcentagens de sideroblastos em anel, porcentagens de blastos (IPSS-R), cariótipo (normal e alterado), cariótipo (aneuploidia), cariótipo (alteração no cromossomo 5), cariótipo (alteração no cromossomo 7), cariótipo (número de alterações), Quanto ao prognóstico (IPSS-R), classificação dos valores de hemoglobina (IPSS-R), classificação dos valores de plaquetas (IPSS-R), classificação do grupo de risco de acordo com o IPSS-R, classificação do grupo de risco de acordo com o WPSS, dependência transfusional, tratamento com eritropoietina, óbito, evolução para LMA ($p > 0,05$).

4.2.5. Análise da expressão do gene *CDC20*

Para o gene *CDC20*, foram encontradas associações significantes com relação às variáveis, fibrose, dismegacariopoiese, contagem de plaquetas, grupo de risco segundo o IPSS-R e resposta ao tratamento com eritropoietina.

Com relação a fibrose medular, observou-se uma baixa expressão do gene *CDC20* nos pacientes com SMD que apresentaram fibrose na medula óssea ($p = 0,010$) (Figura 31).

Figura 31: Níveis de expressão do gene *CDC20* em pacientes com SMD em relação a fibrose medular.



Com relação ao setor megacariocítico, foram encontradas duas associações importantes. Quanto à displasia medular neste setor, observamos que os níveis de expressão do gene *CDC20* está mais alto nos pacientes com presença de dismegacariopoiese ($p = 0,024$) (Figura 32). Corroborando com esse achado, observamos que valores mais baixos de plaqueta no sangue periférico estão associados a um aumento dos níveis de expressão do gene *CDC20*, quando comparados a pacientes com contagem de plaquetas superior a $100.000/\text{mm}^3$ ($p = 0,016$) (Figura 33).

Figura 32: Níveis de expressão do gene *CDC20* em pacientes com SMD em relação a presença de dismegacariopoiese.

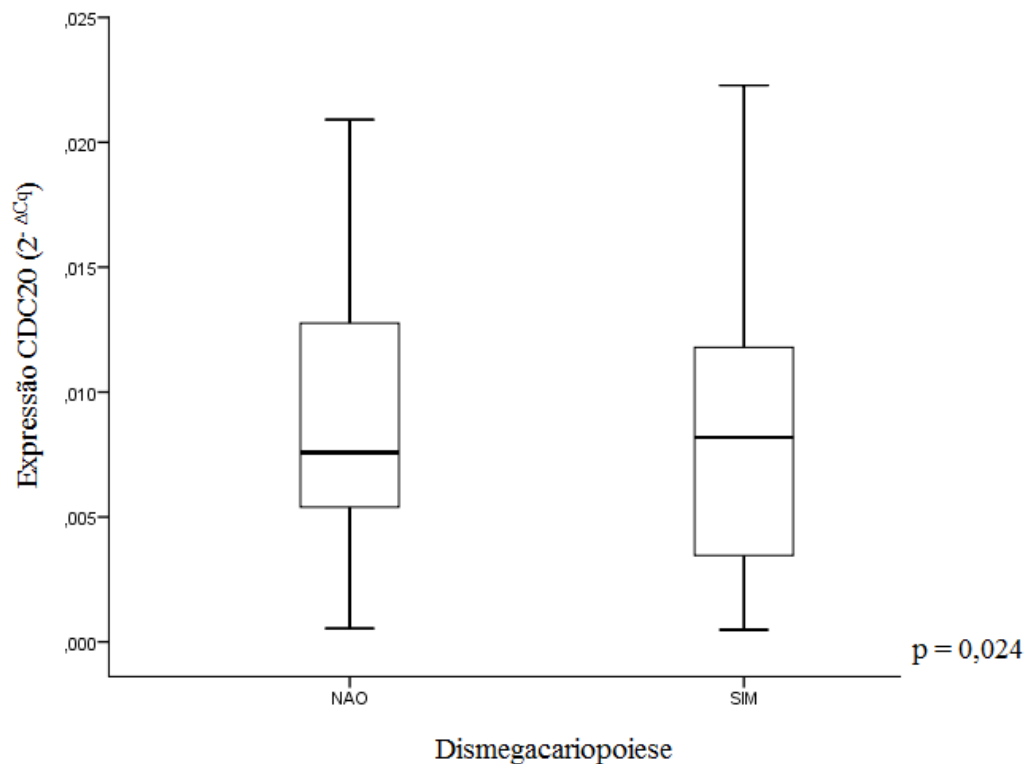
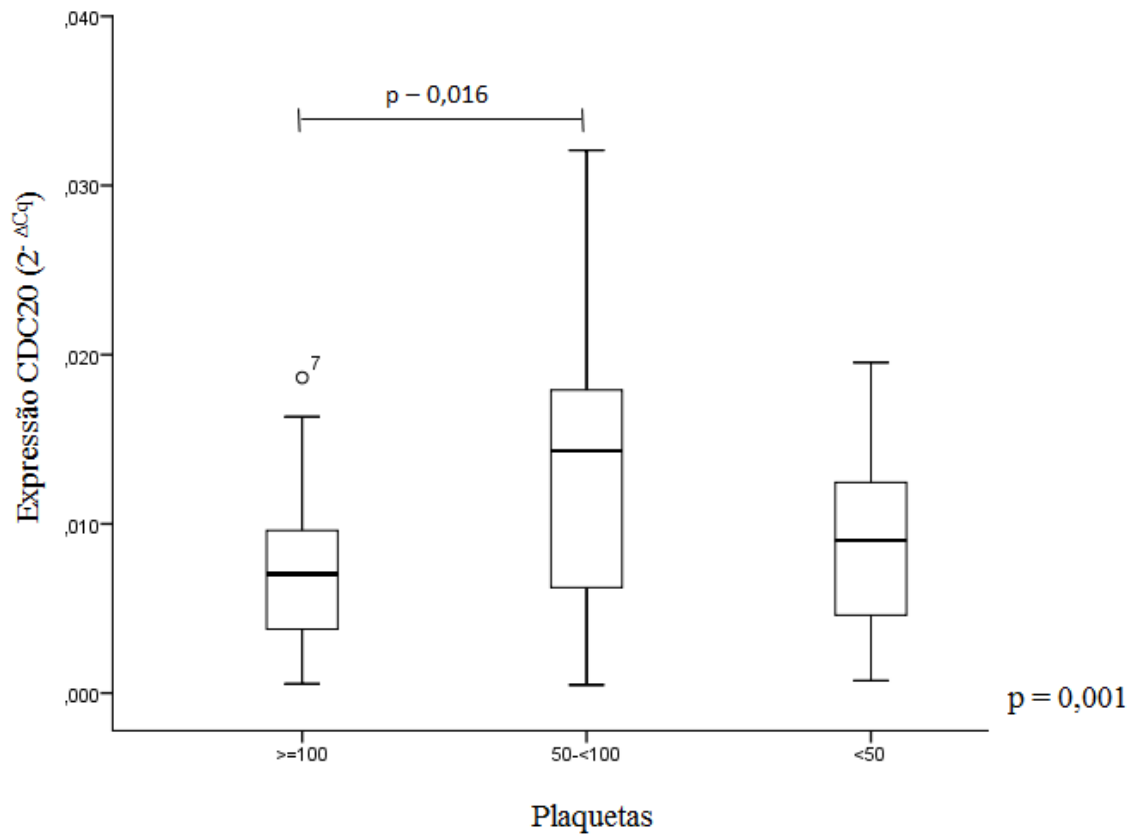


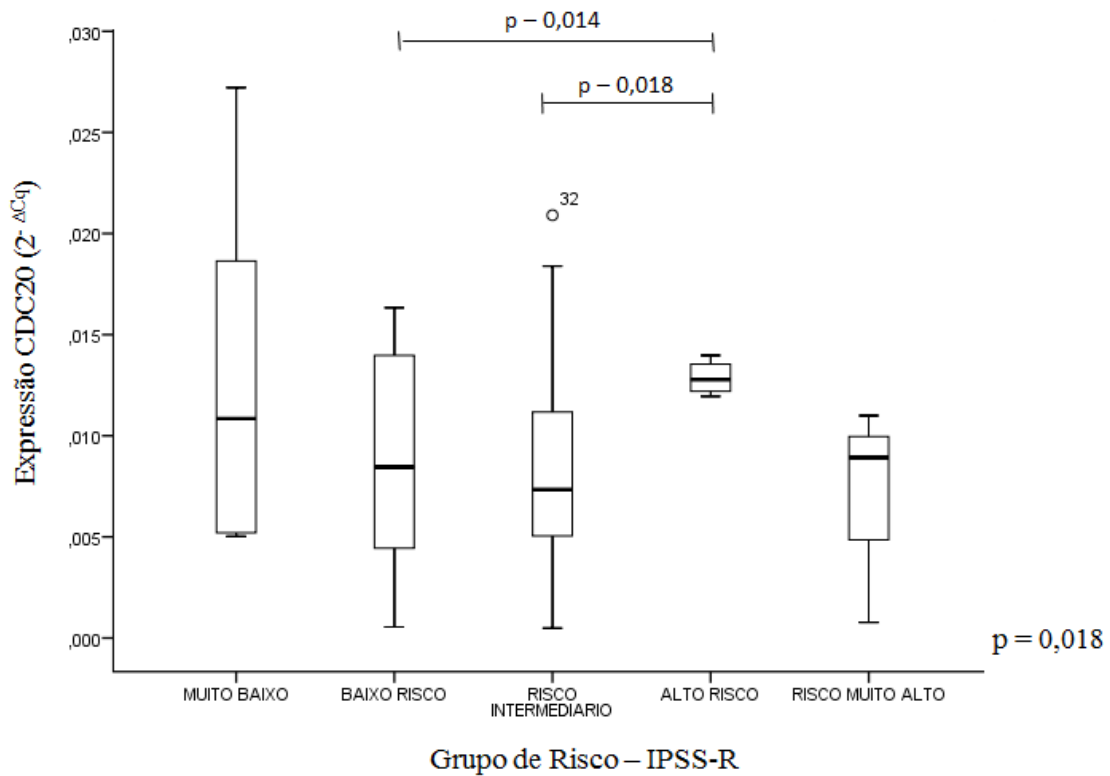
Figura 33: Níveis de expressão do gene *CDC20* em pacientes com SMD em relação a contagem de plaquetas no SP.



*Valor do p para o teste de Games-Howell (comparação entre grupos)

Quanto à classificação de risco segundo o IPSS-R, observou-se um aumento da expressão do gene *CDC20* nos pacientes incluídos na classificação de alto risco, quando comparados a pacientes de baixo risco ($p = 0,014$) (Figura 34) e a pacientes de risco intermediário ($p = 0,018$) (Figura 34).

Figura 34: Níveis de expressão do gene *CDC20* em pacientes com SMD em relação a classificação de risco segundo o IPSS-R.



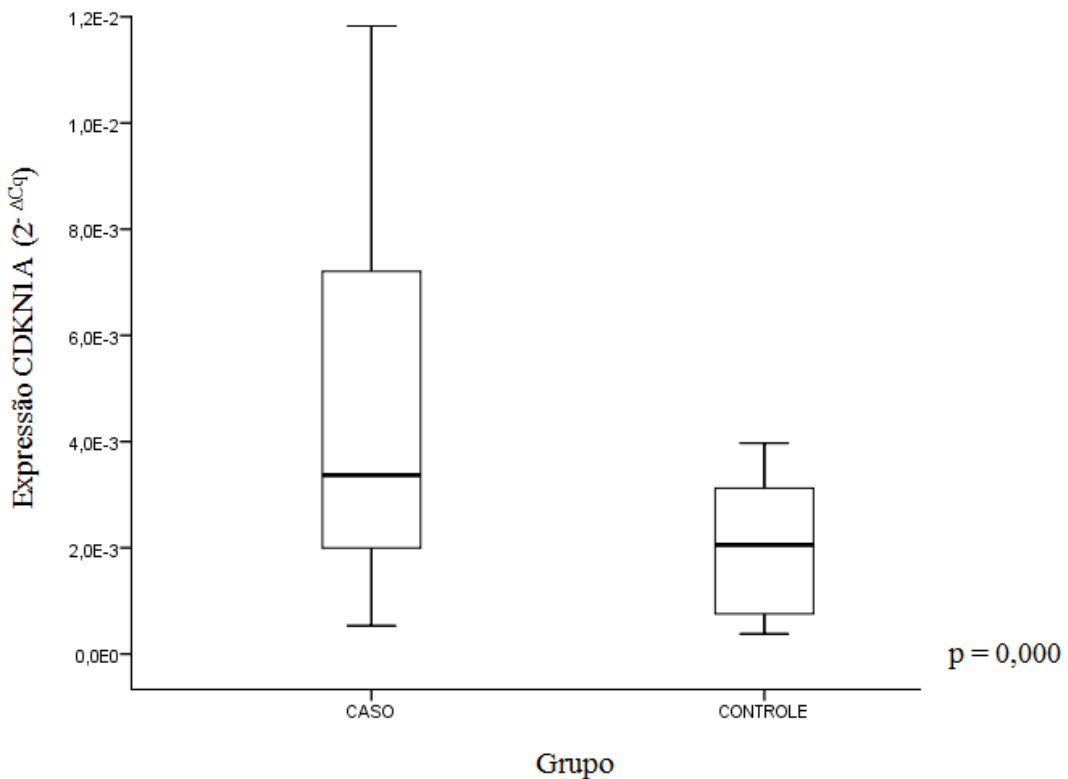
*Valor do p para o teste de Games-Howell (comparação entre grupos)

Não houve associação significativa com relação ao nível de expressão do gene *CDC20* e as variáveis grupo, idade, celularidade, classificação da OMS (2008), forma da SMD, displasias na medula óssea, diseritropoiese, disgranulopoiese, presença de micromegacariócito, sideroblastos em anel, faixas de porcentagens de sideroblastos em anel, porcentagens de blastos (IPSS-R), cariótipo (normal e alterado), cariótipo (aneuploidia), cariótipo (alteração no cromossomo 5), cariótipo (alteração no cromossomo 7), cariótipo (número de alterações), Quanto ao prognóstico (IPSS-R), classificação dos valores de hemoglobina (IPSS-R), classificação dos valores de neutrófilos (IPSS-R), classificação do número de citopenias no sangue periférico, classificação do grupo de risco de acordo com o WPSS, dependência transfusional, óbito, evolução para LMA ($p > 0,05$).

4.2.6. Análise da expressão do gene *CDKN1A*

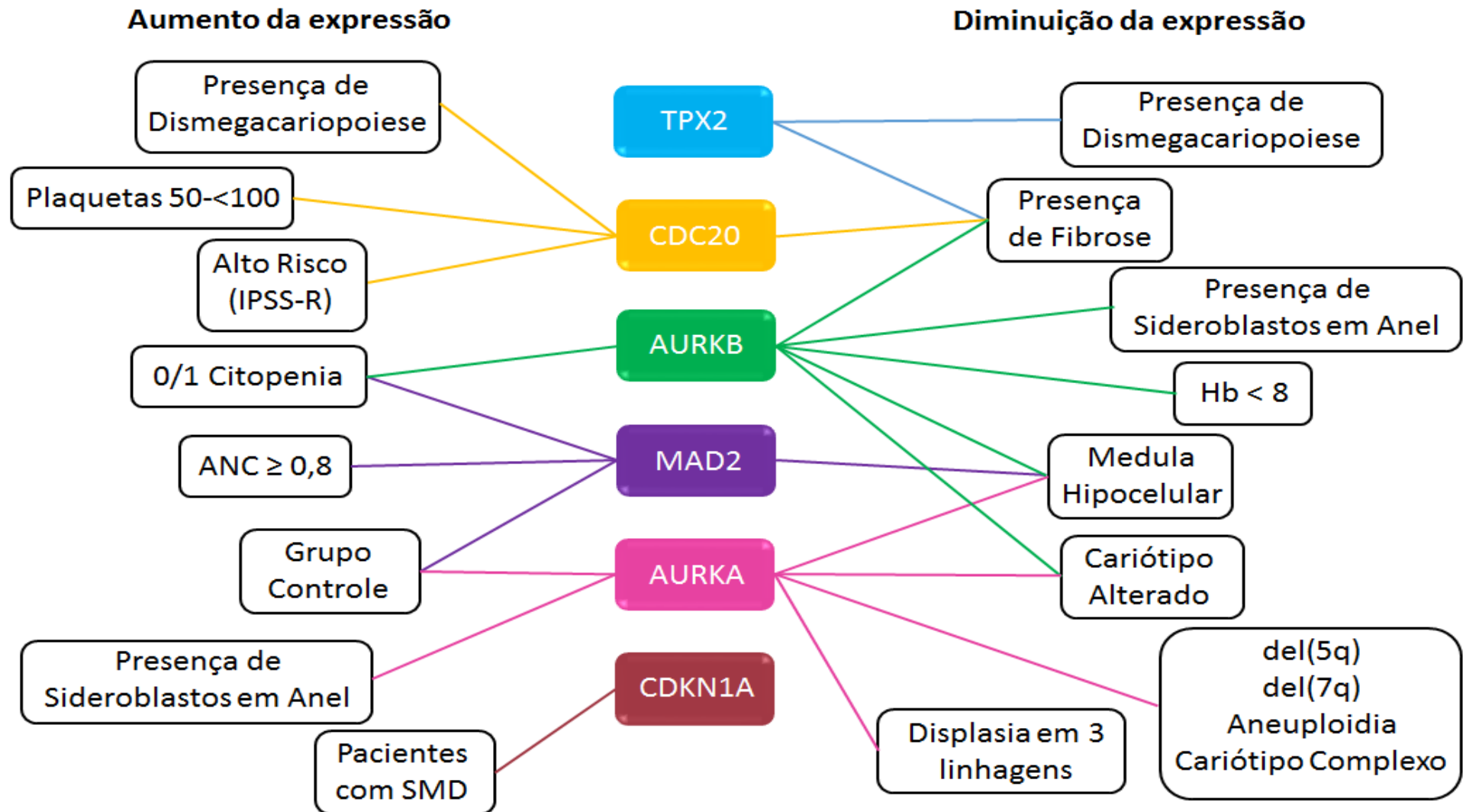
Para o gene *CDKN1A*, foram encontradas associações significantes com relação a comparação entre caso e controle, aonde observamos um aumento da expressão do gene nos pacientes portadores de SMD e uma baixa expressão nos indivíduos controle ($p = 0,000$) (Figura 35).

Figura 35: Níveis de expressão do gene *CDKN1A* em pacientes com SMD em relação ao grupo controle.



Não houve associação significativa com relação ao nível de expressão do gene *CDKN1A* e as variáveis idade, classificação da OMS (2008), forma da SMD, celularidade da medula óssea, fibrose na medula óssea, displasias na medula óssea, diseritropoiese, disgranulopoiese, dismegacariopoiese, presença de micromegacariócito, sideroblastos em anel, faixas de porcentagens de sideroblastos em anel, porcentagens de blastos (IPSS-R), cariótipo (normal e alterado), cariótipo (aneuploidia), cariótipo (alteração no cromossomo 5), cariótipo (alteração no cromossomo 7), cariótipo (número de alterações), Quanto ao prognóstico (IPSS-R), classificação dos valores de hemoglobina (IPSS-R), classificação dos valores de neutrófilos (IPSS-R), classificação dos valores de plaquetas (IPSS-R), classificação do número de citopenias no sangue periférico, classificação do grupo de risco de acordo com o IPSS-R, classificação do grupo de risco de acordo com o WPSS, dependência transfusional, tratamento com eritropoietina, óbito, evolução para LMA ($p > 0,05$).

Figura 36: Representação esquemática dos resultados encontrados



4.3. Análise de correlação entre os níveis de expressão gênica

O coeficiente de correlação de Pearson (r) foi realizado para se analisar a intensidade da associação linear existente entre os genes e o r^2 (r square) foi realizado para analisar a influência de um gene sobre outro.

Observou-se uma forte correlação entre os genes *TPX2* e *CDC20* ($r = 0,797$; $p = 0,000$), demonstrando uma influência de 63,5% ($r^2 = 0,635$) na variação dos níveis de expressão de um gene sobre o outro (Figura 37); *AURKA* e *AURKB* ($r = 0,652$; $p = 0,000$), apresentando uma influência de 42,5% ($r^2 = 0,425$) nos seus níveis de expressão gênica (Figura 38); e entre os genes *AURKB* e *CDC20* ($r = 0,645$; $p = 0,000$) que apresentaram uma influência de 41,6% ($r^2 = 0,416$) na variação dos seus níveis de expressão nos pacientes com SMD (Figura 39).

Figura 37: Análise de correlação dos níveis de expressão dos genes *TPX2* e *CDC20* em pacientes com SMD.

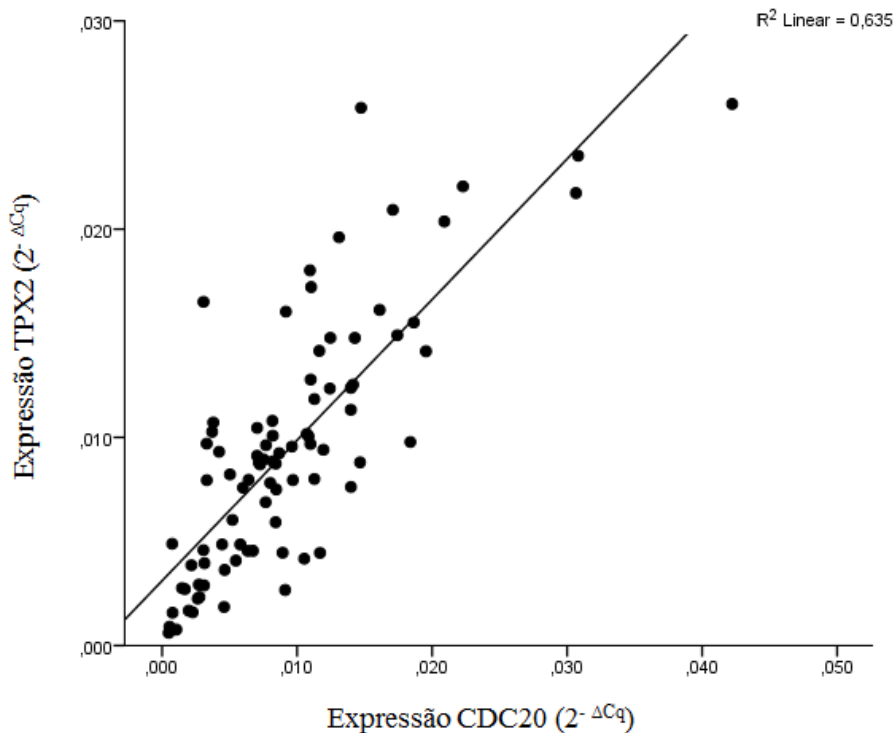


Figura 38: Análise de correlação dos níveis de expressão dos genes *AURKA* e *AURKB* em pacientes com SMD.

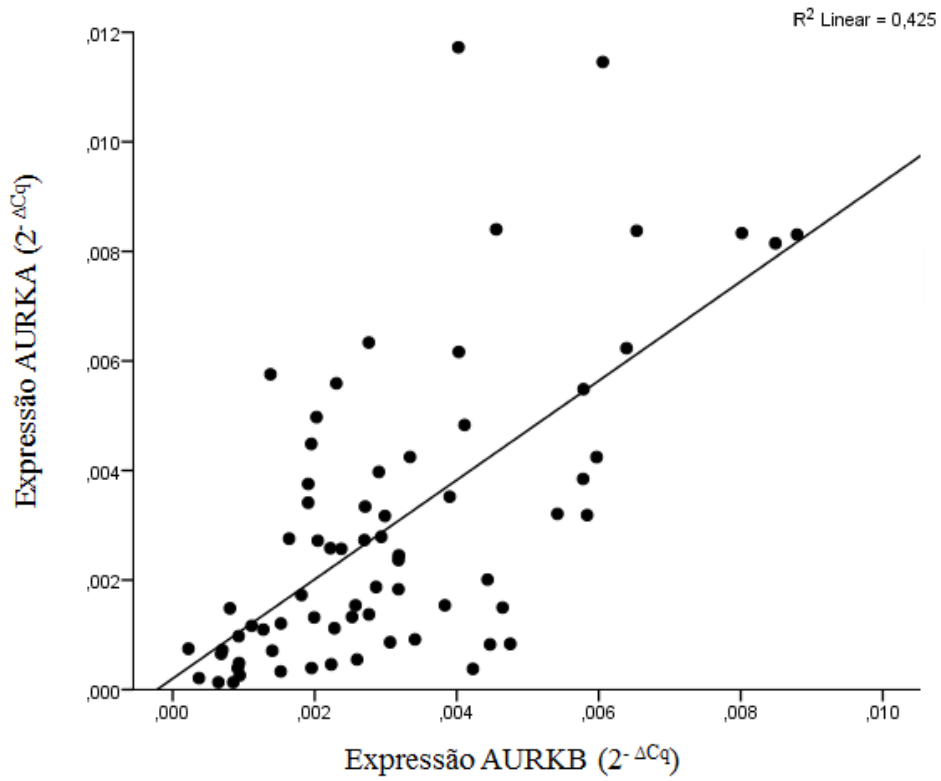
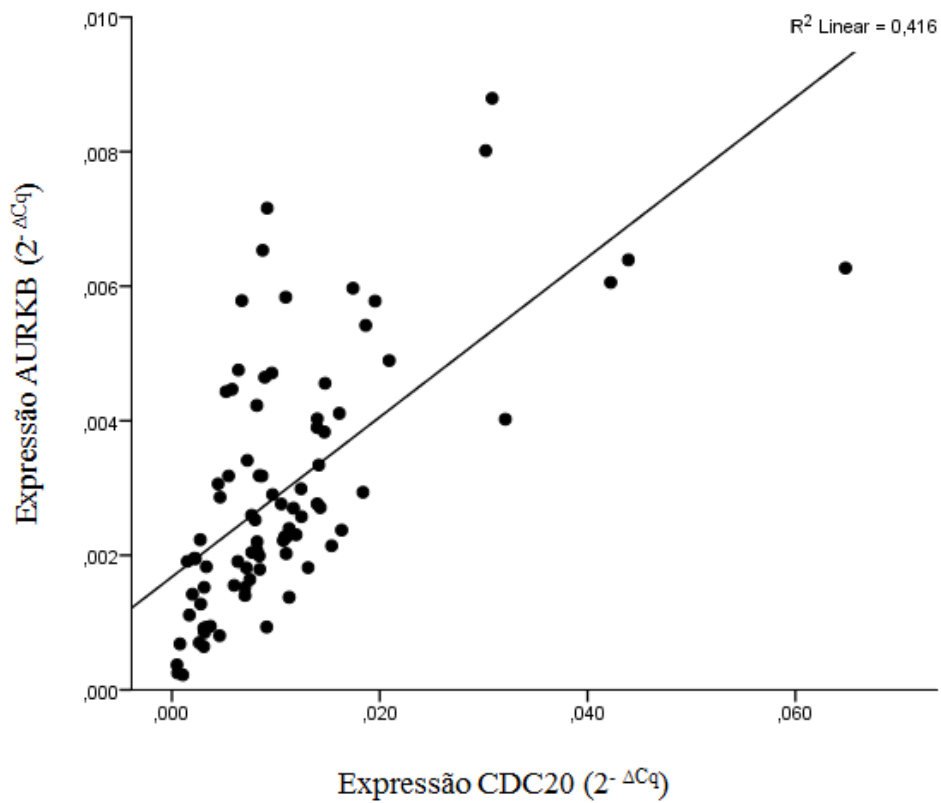


Figura 39: Análise de correlação dos níveis de expressão dos genes *AURKB* e *CDC20* em pacientes com SMD.



Uma correlação moderada foi observada entre os genes *TPX2* e *AURKA* ($r = 0,503$; $p = 0,000$) apresentando uma influência de 25,3% ($r^2 = 0,253$) na variação dos seus níveis de expressão (Figura 40); *TPX2* e *AURKB* ($r = 0,586$; $p = 0,000$) demonstrando uma influência de 34,3% ($r^2 = 0,343$) na variação dos seus níveis de expressão (Figura 41); *AURKA* e *MAD2* ($r = 0,421$; $p = 0,000$) apresentando uma influência de 17,8% ($r^2 = 0,178$) na variação dos seus níveis de expressão (Figura 42); e entre os genes *AURKA* e *CDC20* ($r = 0,566$; $p = 0,000$) demonstrando uma influência de 34,3% ($r^2 = 0,343$) na variação dos seus níveis de expressão nos pacientes com SMD (Figura 43).

Figura 40: Análise de correlação dos níveis de expressão dos genes *TPX2* e *AURKA* em pacientes com SMD.

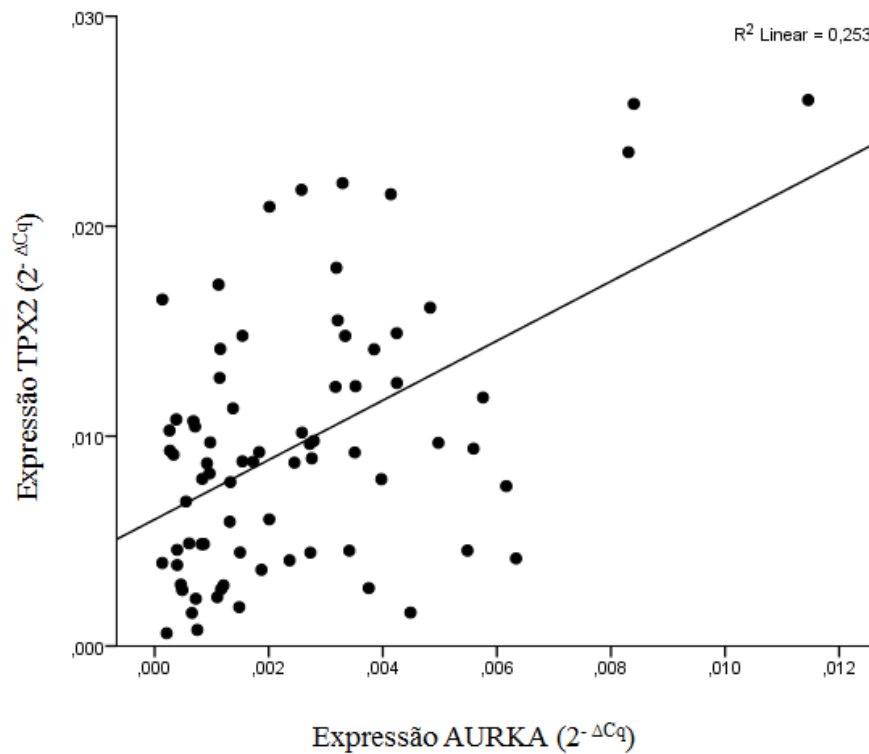


Figura 41: Análise de correlação dos níveis de expressão dos genes *TPX2* e *AURKB* em pacientes com SMD.

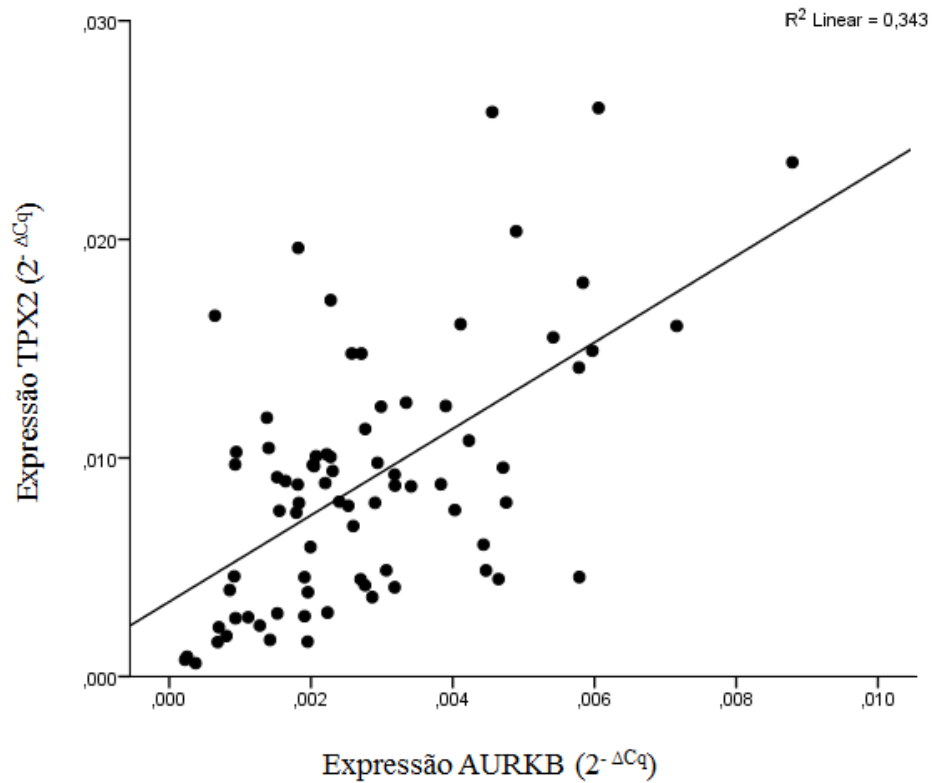


Figura 42: Análise de correlação dos níveis de expressão dos genes *AURKA* e *MAD2* em pacientes com SMD.

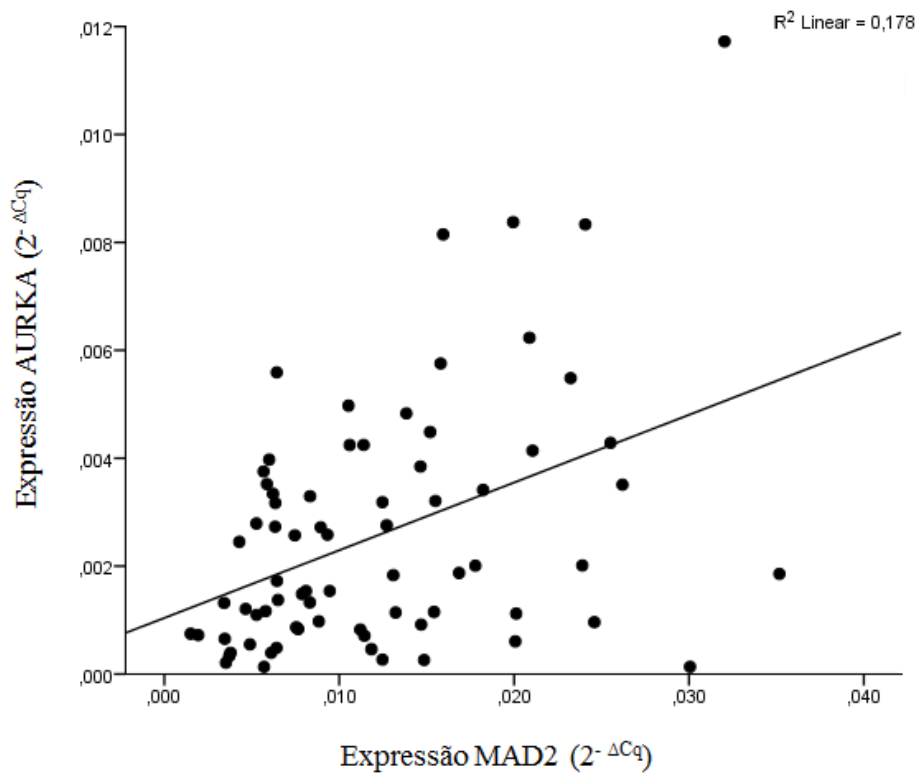
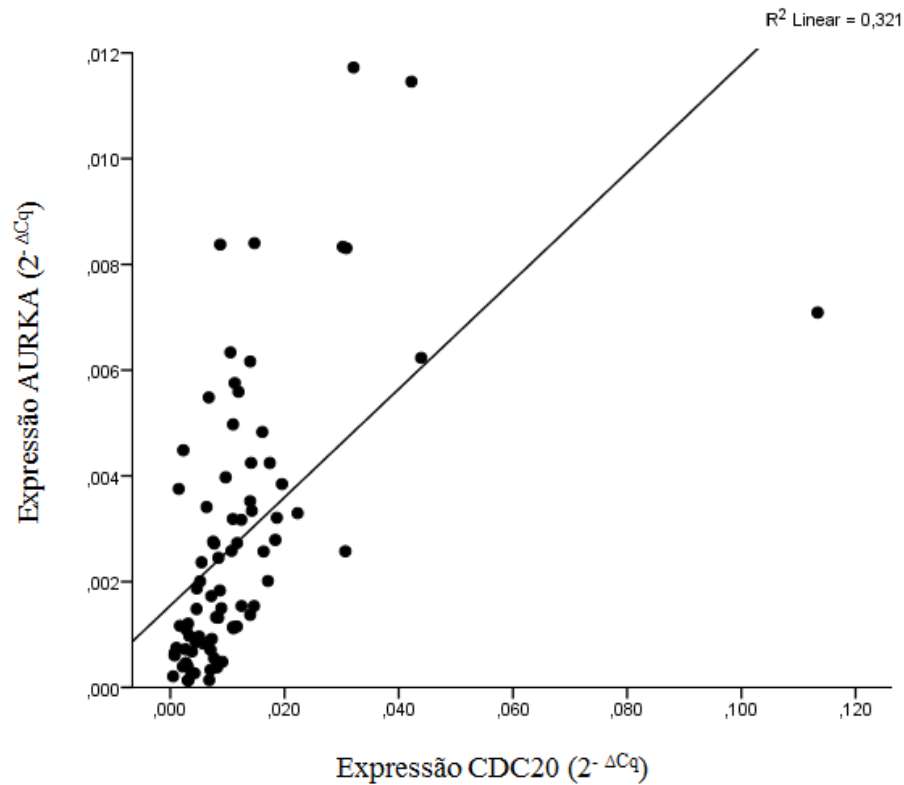


Figura 43: Análise de correlação dos níveis de expressão dos genes *AURKA* e *CDC20* em pacientes com SMD.



Por fim, observou-se uma correlação fraca entre os genes *TPX2* e *MAD2* ($r = 0,241$; $p = 0,035$) apresentando uma influência de apenas 5,8% ($r^2 = 0,058$) na variação dos seus níveis de expressão (Figura 44); *AURKA* e *CDKN1A* ($r = -0,223$; $p = 0,045$) demonstrando uma influência de apenas 5% ($r^2 = 0,050$) na variação dos seus níveis de expressão (Figura 45); *AURKB* e *MAD2* ($r = 0,326$; $p = 0,004$) apresentando uma influência de 10,6% ($r^2 = 0,106$) na variação dos seus níveis de expressão (Figura 46); *MAD2* e *CDC20* ($r = 0,242$ $p = 0,029$) demonstrando uma influência de apenas 5,8% ($r^2 = 0,058$) na variação dos seus níveis de expressão (Figura 47); e entre os genes *CDC20* e *CDKN1A* ($r = -0,221$ $p = 0,037$) demonstrando uma influência de apenas 4,9% ($r^2 = 0,049$) na variação dos seus níveis de expressão nos pacientes com SMD (Figura 48).

Figura 44: Análise de correlação dos níveis de expressão dos genes *TPX2* e *MAD2* em pacientes com SMD

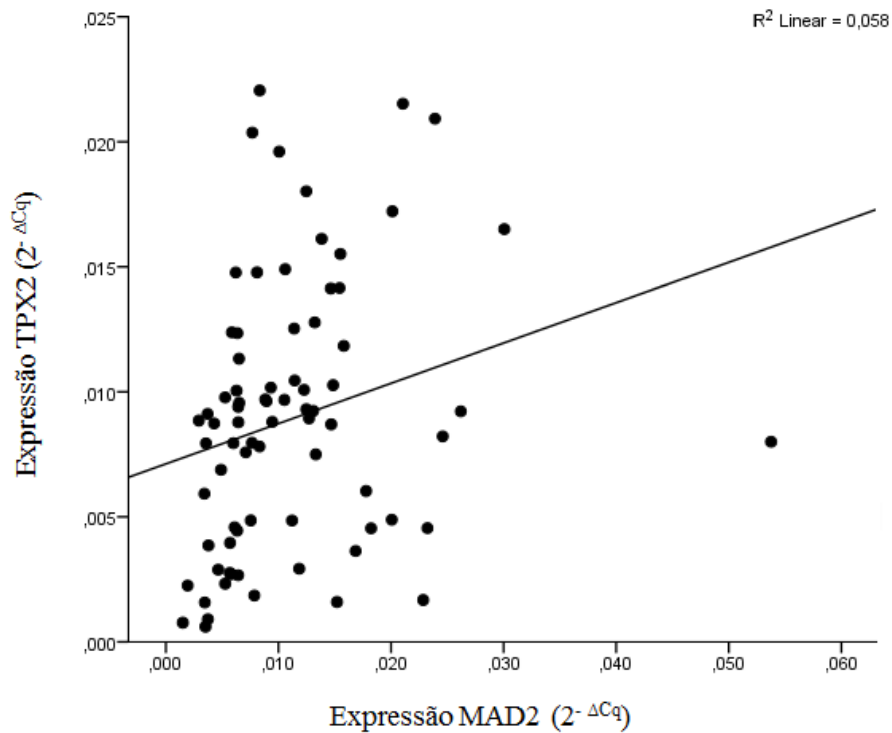


Figura 45: Análise de correlação dos níveis de expressão dos genes *AURKA* e *CDKN1A* em pacientes com SMD

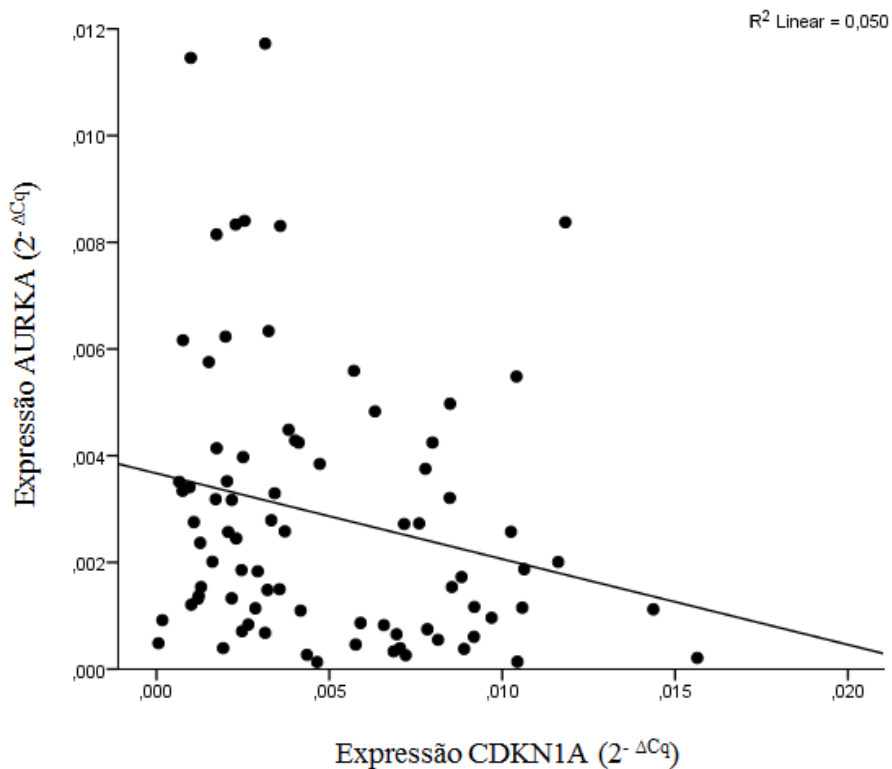


Figura 46: Análise de correlação dos níveis de expressão dos genes *AURKB* e *MAD2* em pacientes com SMD

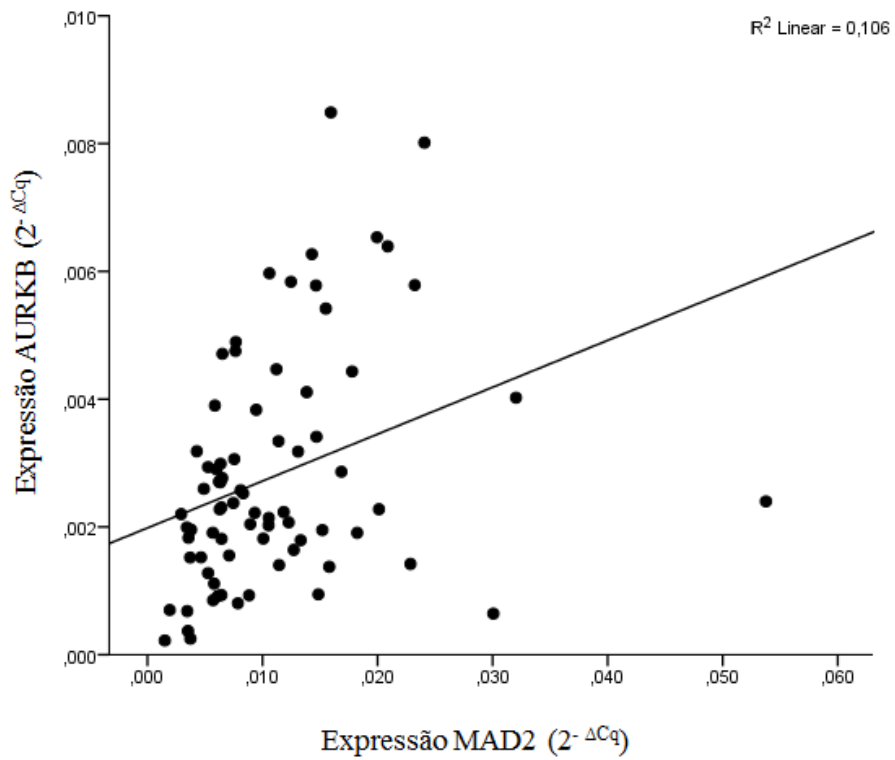


Figura 47: Análise de correlação dos níveis de expressão dos genes *MAD2* e *CDC20* em pacientes com SMD

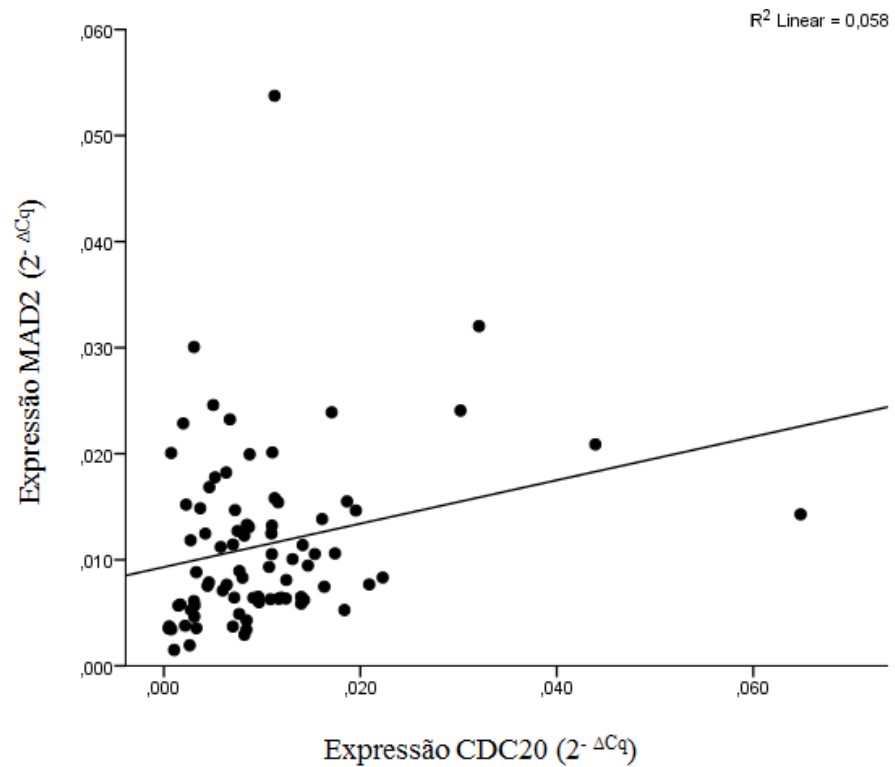
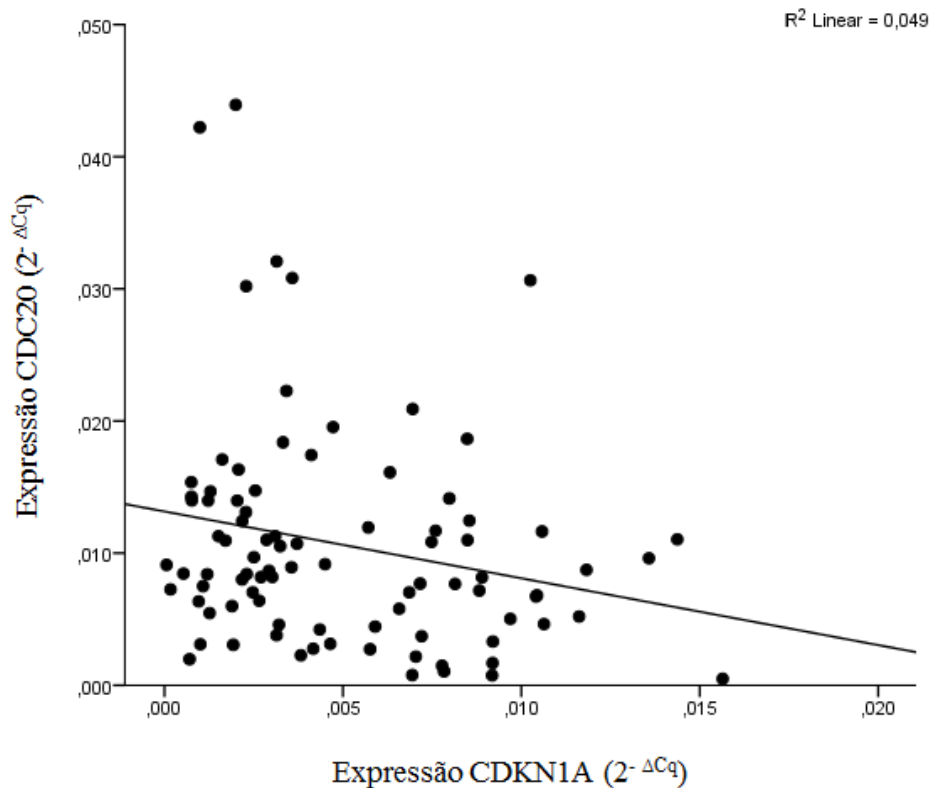


Figura 48: Análise de correlação dos níveis de expressão dos genes *CDC20* e *CDKN1A* em pacientes com SMD



4.4. Análise de sobrevida em relação aos níveis de expressão gênica

A análise de associação entre os níveis de expressão dos genes estudados e a sobrevida dos pacientes com SMD, foi feita a partir da definição do *cutoff* (baseado no algoritmo estabelecido pelo software *Cutoff Finder*) de cada perfil de expressão, por gene, e realização do teste de *log-rank* associado com o gráfico de curva de sobrevida estabelecido por *Kaplan-Meier*. Os dados dos *cutoffs*, por gene, estão apresentados na tabela 10.

Tabela 10: Caracterização dos *cutoffs* na análise de associação entre os níveis de expressão dos genes e a sobrevida dos pacientes com SMD

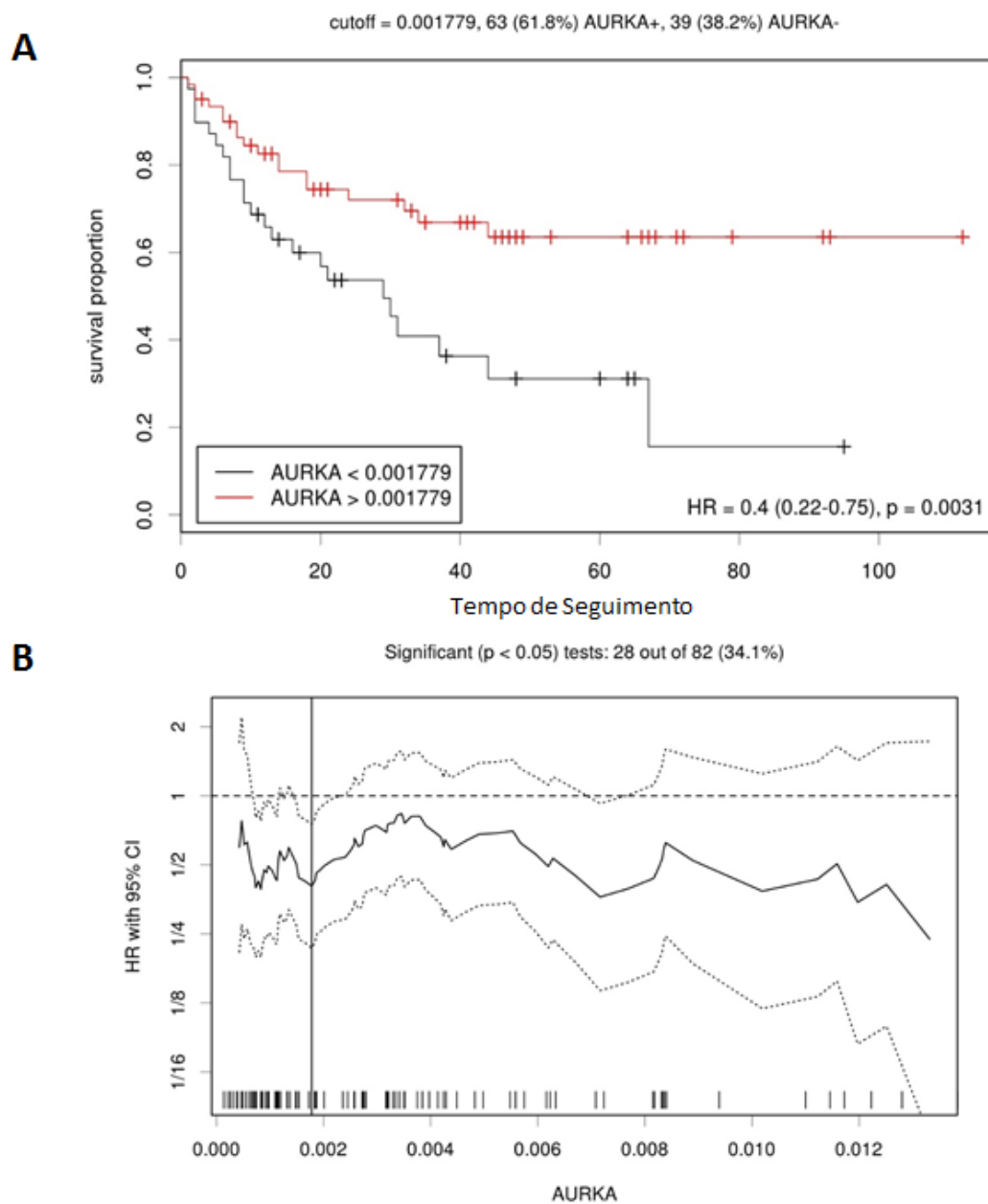
Gene	Cutoff*	Faixa**		Hazard Ratio (HR)	Intervalo de confiança	p-valor
		Superior	Inferior			
TPX2	0,004311	83(81,4%)	19(18,6%)	0,47	0,23 - 0,97	0,067
AURKA	0,001779	63(61,8%)	39(38,2%)	0,4	0,22 - 0,75	0,0031
AURKB	0,001539	83(81,4%)	19(18,6%)	0,46	0,23 - 0,92	0,025
MAD2	0,02505	21(20,6%)	81(79,4%)	1,74	0,85 - 3,56	0,13
CDC20	0,00433	80(78,4%)	22(21,6%)	0,57	0,29 - 1,15	0,11
CDKN1A	0,003062	61(59,8%)	41(40,2%)	1,99	1,04 - 3,83	0,034

* Algoritmo estabelecido pelo software *Cutoff Finder*

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

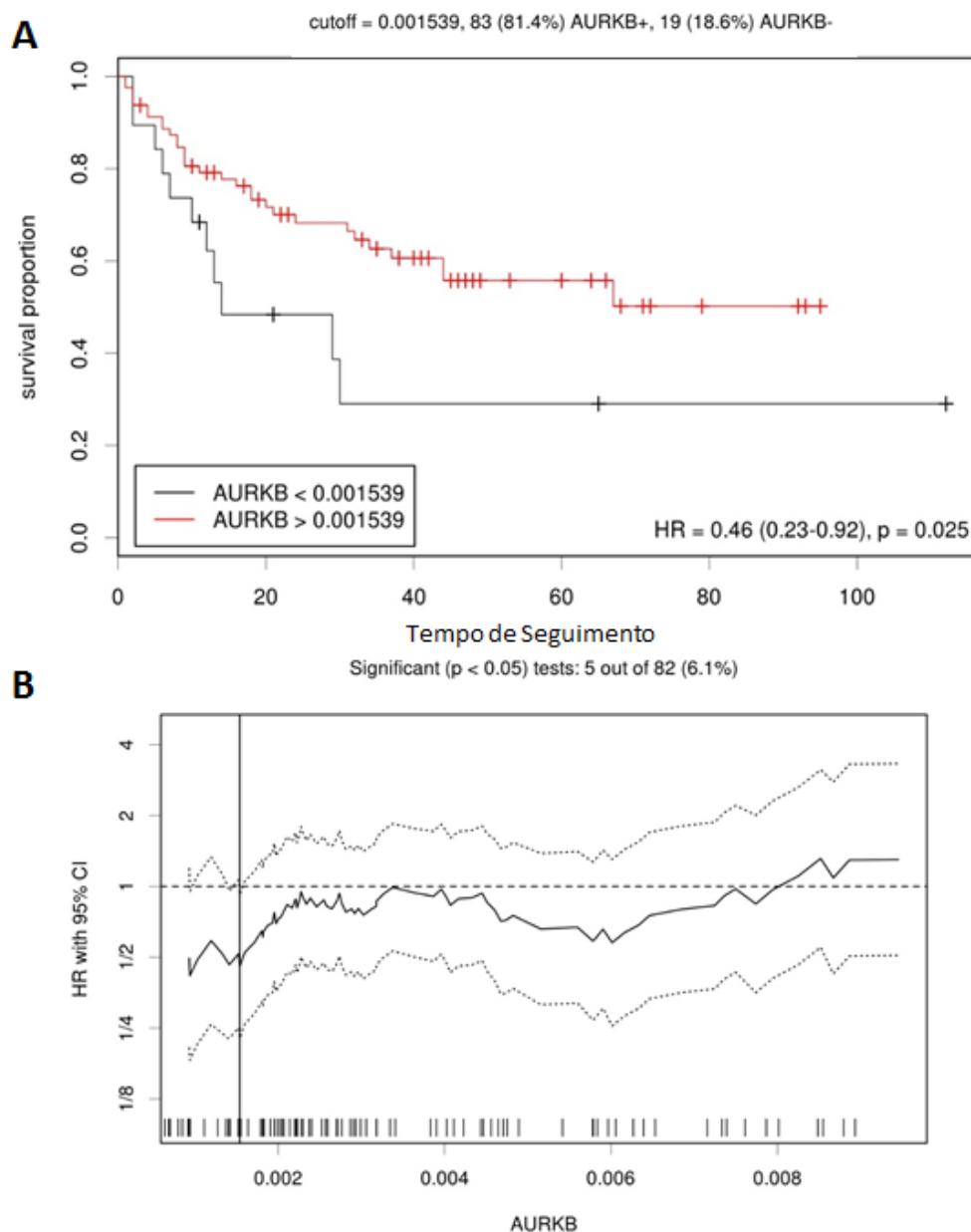
Com relação ao gene *AURKA*, observou-se que pacientes com expressão do gene inferior ao *cutoff* de 0,001779 possuem uma menor sobrevida quando comparado a pacientes com expressão superior a 0,001779 ($p = 0,0031$) (Figura 49A), apresentando uma taxa de risco (HR, *hazard ratio*) de 0,4 (Figura 49B, Tabela 10).

Figura 49: Análises de associação entre o nível de expressão do gene *AURKA* e a sobrevida dos pacientes com SMD. **A.** Gráfico de curva de sobrevida (Kaplan-Meier). **B.** Gráfico de obtenção de Cutoff a partir da otimização por correlação com a sobrevida.



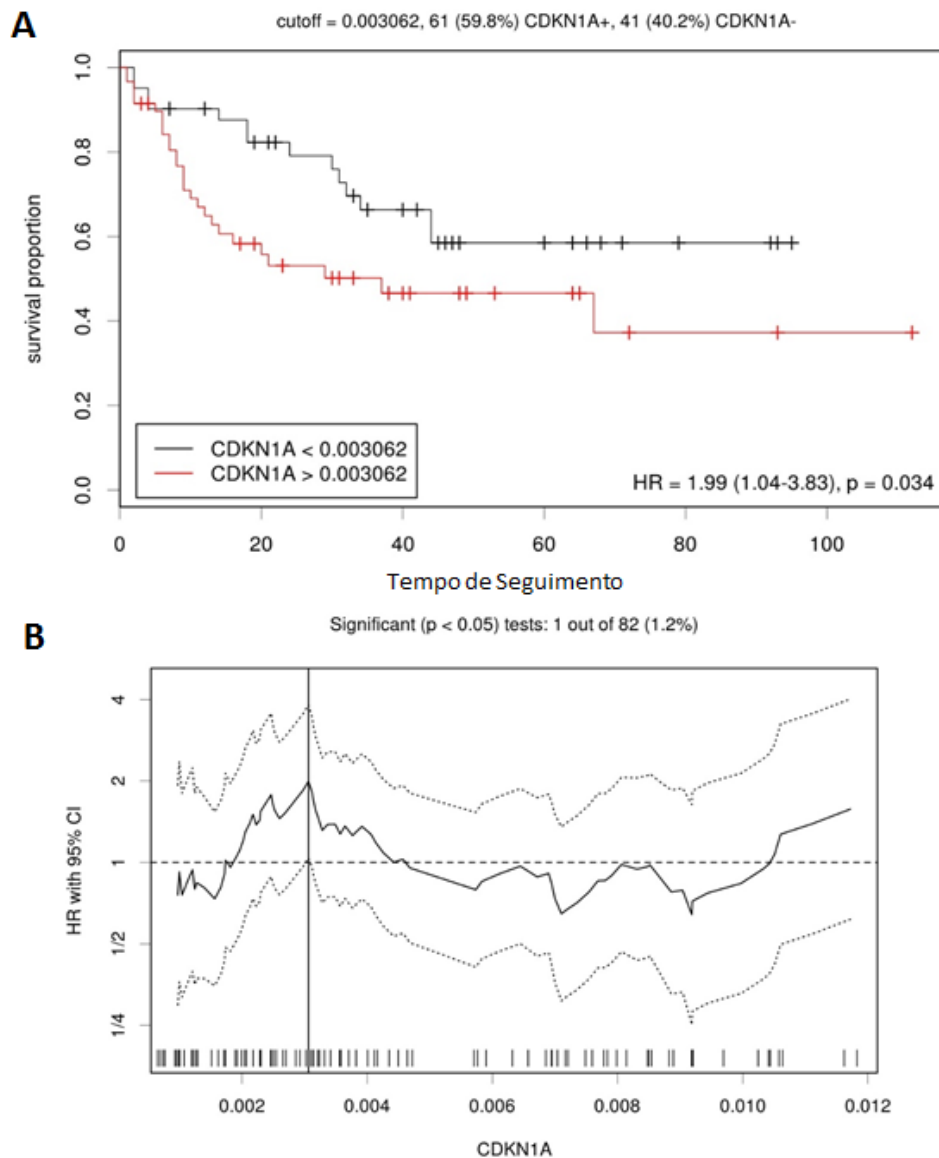
Em seguida, do gene *AURKB*, observou-se uma menor sobrevida em pacientes com expressão do gene inferior ao *cutoff* de 0,001539 quando comparado a pacientes com expressão superior a 0,001539 ($p = 0,025$) (Figura 50A), apresentando uma taxa de risco (HR, *hazard ratio*) de 0,46 (Figura 50B, Tabela 10).

Figura 50: Análises de associação entre o nível de expressão do gene *AURKB* e a sobrevida dos pacientes com SMD. **A.** Gráfico de curva de sobrevida (Kaplan-Meyer). **B.** Gráfico de obtenção de Cutoff a partir da otimização por correlação com a sobrevida.



Por fim, observou-se, observou-se uma menor sobrevida em pacientes com expressão do gene *CDKN1A* superior ao *cutoff* de 0,003062 quando comparado a pacientes com expressão inferior a 0,003062 ($p = 0,034$) (Figura 51A), apresentando uma taxa de risco (HR, *hazard ratio*) de 1,99 (Figura 51B, Tabela 10).

Figura 51: Análise de associação entre o nível de expressão do gene *CDKN1A* e a sobrevida dos pacientes com SMD. **A.** Gráfico de curva de sobrevida (Kaplan-Meyer). **B.** Gráfico de obtenção de Cutoff a partir da otimização por correlação com a sobrevida.



Não foram encontradas associações significantes entre os níveis de expressão dos genes *TPX2*, *MAD2* e *CDC20* em relação a sobrevida dos pacientes com SMD ($p > 0,05$) (Tabela 10).

5. DISCUSSÃO

Neste estudo foram avaliados os níveis de expressão de 6 genes relacionados à regulação do ciclo celular, ao fuso mitótico e ao ponto de checagem mitótico em 101 pacientes portadores de SMD correlacionando com variáveis clínicas e laboratoriais.

Quanto à caracterização dos pacientes, a média de idade encontrada foi de 65 anos (mediana de 67, mínimo de 23 e máximo de 96 anos), com predomínio do sexo masculino (razão de 1,2:1). Esses dados corroboram com os estudos de Magalhães e colaboradores (2010), que encontrou uma mediana de idade de 68 anos e Belli e colaboradores (2015), que demonstrou uma média de idade de 68 anos em pacientes brasileiros, com predomínio do sexo masculino em ambos estudos.

Com relação à classificação, houve um predomínio de pacientes do subgrupo CRDM (51,48%), seguido por AREB (16,83%). Quanto à classificação prognóstica, houve um predomínio dos subgrupos de baixo risco e risco intermediário (ambos com 39,34% dos casos) segundo o IPSS-R. Esses achados corroboram com o estudo de Belli et al (2015), que obteve um predomínio de pacientes classificados como CRDM, seguido pelo subtipo AREB e de pacientes classificados como baixo risco pelo IPSS-R.

Quanto à análise citogenética, observamos um predomínio de pacientes apresentando cariótipo normal (57,97%) em comparação aos que apresentaram alterações (42,03%). Esses dados corroboram com o estudo de Greenberg e colaboradores (1997) em que 60% dos pacientes do estudo do IPSS apresentavam cariótipo normal e com os estudos de Ades e colaboradores (2014), Bacher e colaboradores (2015) e Uyanik e colaboradores (2016) que descrevem que a presença de alterações cromossômicas na SMD é de 40-60%.

A deleção do braço longo do cromossomo 5 tem sido amplamente relatada como a alteração mais comum na SMD por Greenberg e colaboradores (1997 e 2012), Haase (2008) entre outros. Uma análise epidemiológica realizada por Kawankar e Voudini (2011) mostrou uma frequência dessa alteração em 12,5% dos pacientes brasileiro. No presente estudo a del(5q) também foi a alteração cromossômica mais frequente, aparecendo em 15,94% dos pacientes com resultados citogenéticos.

A Síndrome Mielodisplásica é caracterizada pela insuficiência medular, que leva a presença de citopenias em até três linhagens. O aumento das citopenias pode levar a dependência transfusional, infecções e hemorragias (MALCOVATI et al, 2011; GREENBERG et al, 2013, 2017). Em estudos anteriores, nosso grupo demonstrou que o aumento da expressão proteica do CDC20 está associado com a presença de trombocitopenia, citopenia em três

linhagens e presença de cariótipo complexo em pacientes com SMD (GENGA et al, 2015). No presente estudo, avaliamos os níveis de expressão do mRNA do gene *CDC20* e encontramos um aumento na expressão desse gene em pacientes com trombocitopenia (plaquetas $<1000.000/\text{mm}^3$), dismegacariopoiese e em pacientes de alto risco, de acordo com o IPSS-R (GREENBERG et al, 2012). Sabe-se que valores de plaquetas inferiores a $100.000/\text{mm}^3$ são considerados marcador de prognóstico desfavorável e pacientes que apresentaram baixa contagem de plaquetas possuem uma baixa taxa de sobrevida (GREENBERG et al, 2012).

Portanto, o aumento da expressão do *CDC20*, tanto do mRNA quanto da proteína (Genga et al, 2015), confirmam que esse alvo é um marcador molecular de prognóstico desfavorável na SMD. O *CDC20* tem um papel central na regulação e progressão da mitose, sendo responsável pela atividade da APC (ACQUAVIVA et al, 2004; AMADOR et al, 2007; WÄSCH et al, 2010). A expressão do *CDC20* é rigorosamente controlada (MALUREANU et al, 2010) e o aumento da sua expressão está associado a presença de aneuploidias e é preditor de prognóstico desfavorável em várias neoplasias humanas (LI et al, 2009; WEAVER et al, 2009; MALUREANU et al, 2010), como pulmão (SHI et al, 2017), estômago (DING et al, 2014), pâncreas (CHANG et al, 2012), e ovário (OUELLET et al, 2006). Consequentemente, *CDC20* tem sido considerado um alvo molecular no tratamento do câncer (WANG et al, 2013; WANG et al, 2015).

Assim como o *CDC20*, *TPX2* também apresentou um aumento na expressão em pacientes com dismegacariopoiese. Esses dois genes também apresentaram uma correlação forte, provavelmente devido ao fato de o *TPX2* ser um dos substratos da APC (STEWART et al, 2005), que é regulado pela *CDC20*. Esses resultados demonstram que os dois genes trabalham de maneira dependente em cascata. A expressão de *TPX2* também é rigorosamente regulada durante o ciclo celular e seus níveis de variação da expressão são idênticos aos do *CDC20* (HEIDEBRECHT et al, 1997; STEWART et al, 2005). O aumento da expressão de *CDC20* leva à ativação inadequada da APC e à instabilidade cromossômica, o mal funcionamento da APC pode diminuir a estabilidade do *TPX2* (STEWART et al, 2005), podendo levar a formação anormal do fuso mitótico e ao bloqueio do ciclo celular (STEWART et al, 2005; LEE et al, 2010; LIU et al, 2010).

TPX2 é essencial para a formação dos microtúbulos e dos cinetócoros (GRUSS et al, 2002; TULU et al, 2006). A desregulação de *TPX2* está associada a tumorigênese em modelos murinos (AGUIRRE-PORTOLÉS et al, 2012) e progressão de neoplasias de colon (WEI et al, 2013), estômago (LIANG et al, 2016; TOMII et al, 2017), pulmão (MA et al, 2006) e cérebro (LI et al, 2010).

MAD2, outro gene relacionado ao ponto de checagem mitótico, apresentou associações importantes. *MAD2* recruta o CDC20 e impede sua ligação com outros substratos da APC, o que impede a ativação do complexo, impedindo a entrada da célula na anáfase (SCHUYLER et al, 2012). *MAD2* apresentou uma diminuição na expressão em pacientes com 2 ou 3 citopenias e com contagem de neutrófilos inferior a $800/\text{mm}^3$, ambos característicos de prognóstico desfavorável na SMD (GREENBERG et al, 2012). Diversos estudos em modelos murinos têm apresentado resultados controversos com relação ao *MAD2*: tanto o aumento quanto a diminuição dos níveis de expressão do *MAD2* podem levar a aneuploidia e a tumorigênese (MICHEL et al, 2001; IWANAGA et al, 2007; SOTILLO et al, 2007). Esses dados reafirmam a necessidade de uma regulação rigorosa das proteínas envolvidas no ponto de checagem mitótico, como demonstrado anteriormente para o CDC20 e TPX2.

Apesar das descobertas contraditórias sobre a expressão do *MAD2*, achados clínicos em outras neoplasias corroboram com nossos estudos. Diaz-Rodriguez e colaboradores (2011) associaram a diminuição da expressão do *MAD2* a instabilidade cromossômica e aumento de aneuploidias, devido ao monitoramento incorreto do ponto de checagem mitótico em pacientes com Mieloma Múltiplo. Burum-Auensen e colaboradores (2010) também associaram a diminuição da expressão do *MAD2* com a presença de alterações cromossômicas em pacientes com tumor de células germinativas testiculares, o que sugere que a diminuição da expressão desse gene pode representar um evento prévio na tumorigênese dessa doença estando relacionada a um pior prognóstico. Por fim, Furlong e colaboradores (2012) associaram a diminuição da expressão proteica de *MAD2* com uma pior taxa de sobrevida em pacientes com câncer epitelial de ovário de alto grau.

Nosso resultado mais intrigante envolve a análise de expressão das Auroras A e B. As Auroras são as principais reguladoras da progressão do ciclo celular. Encontramos uma diminuição da expressão das Auroras A e b em pacientes com alterações cromossômicas, incluindo presença de cariótipo complexo para *AURKA*. O estudo das alterações citogenéticas é o principal marcador de prognóstico na SMD, sendo que altas frequências de alterações cromossômicas estão associadas a um agravamento da doença e ao maior risco de evolução para LMA (OLNEY E LE BEAU, 2002). Em outros estudos envolvendo as Auroras A e B em pacientes com SMD e LMA, não foram encontradas correlações significativas entre a expressão desses genes e a presença de alterações citogenéticas (YE et al, 2009; LUCENA-ARAÚJO et al, 2011; HEREDIA et al, 2014). Nós também encontramos associação entre a diminuição da expressão da *AURKA* e *AURKB* em pacientes com três displasias na medula óssea (*AURKA*), hemoglobina inferior a 8g/dL (*AURKB*) e a uma pior sobrevida (*AURKA* e *AURKB*). Esses

achados demonstram que a diminuição da expressão das Auroras A e B representam um prognóstico desfavorável no grupo de pacientes estudados.

O aumento da expressão das Auroras A e B tem sido observado em diversas neoplasias (GRITSKO et al, 2003; WANG et al, 2006; CHIEFFI et al, 2006; YE et al, 2009; NGUYEN et al, 2009; LIN et al, 2010; YANG et al, 2013), embora sua função como indutor de tumorigênese permaneça controversa (BISCHOFF et al, 1998; ZHOU et al, 1998; ANAND et al, 2003; OTA et al, 2002). Mesmo assim, elas têm sido consideradas alvos para terapias gênicas devido ao seu papel na promoção da carcinogênese (HILTON & SHAPIRO, 2014; D'ASSORO et al, 2016). Esses dados se opõem aos nossos achados, porém, deve ser considerado que a SMD é uma neoplasia complexa, ao contrário da LMA (ALBITAR et al, 2002). Uma grande diferença entre essas duas neoplasias hematológicas é o nível de apoptose das linhagens mielóides displásicas, principalmente nas SMD de baixo risco (PARKER et al, 2000; PARKER et al, 2000; SHIMAZAKI et al, 2000; BOUDARD et al, 2002; OHSHIMA et al, 2003).

Alguns autores têm demonstrado que a diminuição dos níveis de expressão das Auroras A e B levam a apoptose e a catástrofe mitótica em vários modelos biológicos (MAO et al, 2007; LEE et al, 2008; COWLEY et al, 2009; NAIR et al, 2012; JEON & LEE, 2013; KIMURA et al, 2013; HE et al, 2013). Portanto, os eventos apoptóticos associados a SMD e à diminuição dos níveis de expressão das Auroras podem explicar nossos achados com relação a *AURKA* e *AURKB*. Ao avaliar a medula óssea, nossos resultados exibem a diversidade celular presente nos pacientes com SMD, que pode incluir linhagens displásicas apoptóticas.

Nossos achados são corroborados pela regulação desses genes, que são, em primeiro lugar, regulados pelo ciclo celular. Os níveis de expressão da *AURKA* são, normalmente, máximos na transição da fase G2 para M e a sua expressão proteica aumenta significativamente após esse período (KIMURA et al, 1997; BISCHOFF et al, 1998). O mesmo acontece com a atividade da Aurora B, que atinge o pico após a Aurora A (ZHOU et al, 1998). Normalmente, as Auroras são altamente expressas em tecidos de rápida proliferação devido à sua regulação dependente do ciclo celular, como em células hematopoiéticas (SU et al, 2004).

Nós caracterizamos completamente os baixos níveis de transcrição de Aurora quinases em pacientes com SMD, mas a transcrição é apenas um dos mecanismos de regulação dessas quinases. As auroras conseguem uma ativação catalítica completa após autofosforilação de resíduos de treonina localizados em resíduos: T288 para a Aurora A e T232 para a Aurora B (WALTER et al., 2004; FERRARI et al, 2005; HAYDON et al, 2003; TAGUCHI et al, 2002). Sua degradação por proteassoma é estritamente regulada pelo complexo promotor de anafase, Cdh1 e outros reguladores (LITTLEPAGE & RUDERMAN, 2002; CRANE et al, 2004;

FERRARI et al, 2005; NGUYEN et al, 2005; MAO et al, 2007; WANG et al, 2013). Esses múltiplos níveis de regulação podem explicar diferenças na expressão ou atividade proteica observada pelo nosso grupo em outro trabalho (GENGA et al, 2015). Além disso, a natureza das amostras estudadas pode ser outra fonte de variação. Por exemplo, Ye e colaboradores (2009) mostraram que a expressão de RNAm da Aurora A correlacionada com a expressão proteica em células CD34+ de pacientes com SMD, enquanto não encontramos uma correlação similar para Aurora B em aspirados de medula óssea e amostras de tecido.

Observamos importantes achados relacionados aos níveis de expressão dos genes *AURKA*, *AURKB* e *MAD2* em pacientes com SMD com medula hipocelular. A expressão desses genes encontra-se diminuídas em relação aos pacientes com medula normocelular e hiper celular. Neste estudo 16,9% dos pacientes apresentaram medula hipocelular, porcentagem maior do que a observada na literatura (YIN et al, 2010; ADES et al, 2014). A maior parte dos pacientes com medula hipocelular apresentou alterações cromossômicas (60%), envolvendo, principalmente, os cromossomos 5 e 17, resultado similar ao encontrado por Souza e colaboradores (2014). A SMD hipocelular tem sido considerada como de prognóstico favorável, porém, Koh e colaboradores (2010) a correlacionou com prognóstico desfavorável e grande presença de alterações citogenéticas (KOH et al, 2010).

Em um estudo de Heredia e colaboradores (2014) também foi encontrado uma diminuição da expressão dos genes *AURKA*, *AURKB*, *MAD2* e *CDC20* em pacientes com SMD hipocelular. Corroborando com o estudo de Heredia e colaboradores (2014), também observamos que os pacientes com medula hipocelular correspondem a indivíduos mais jovens, sendo que 83,33% apresentam idade inferior a 60 anos, e destes, apenas 1 possui idade superior a 50 anos. Heredia e colaboradores (2014) correlacionaram os pacientes com SMD hipocelular a um prognóstico favorável, porém, no presente estudo metade dos pacientes com medula hipocelular evoluíram a óbito. Essa elevada taxa de óbito (50%) juntamente com a alta frequência de alterações citogenéticas (60%) demonstram diferenças entre os dois grupos de pacientes e levam a uma possível correlação da presença de medula óssea hipocelular com um prognóstico desfavorável nos pacientes avaliados.

Observamos importantes achados relacionados aos níveis de expressão dos genes *AURKA*, *AURKB* e *MAD2* em pacientes com SMD com medula hipocelular. A expressão desses genes encontra-se diminuídas em relação aos pacientes com medula normocelular e hiper celular. Neste estudo 16,9% dos pacientes apresentaram medula hipocelular, porcentagem maior do que a observada na literatura (YIN et al, 2010; ADES et al, 2014). A maior parte dos pacientes com medula hipocelular apresentou alterações cromossômicas (60%), envolvendo,

principalmente, os cromossomos 5 e 17, resultado similar ao encontrado por Souza e colaboradores (2014). A SMD hipocelular tem sido considerada como de prognóstico favorável, porém, Koh e colaboradores (2010) a correlacionou com prognóstico desfavorável e grande presença de alterações citogenéticas.

Em um estudo de Heredia e colaboradores (2014) também foi encontrado uma diminuição da expressão dos genes *AURKA*, *AURKB*, *MAD2* e *CDC20* em pacientes com SMD hipocelular. Corroborando com o estudo de Heredia e colaboradores (2014), também observamos que os pacientes com medula hipocelular correspondem a indivíduos mais jovens, sendo que 83,33% apresentam idade inferior a 60 anos, e destes, apenas 1 possui idade superior a 50 anos. Heredia e colaboradores (2014) correlacionaram os pacientes com SMD hipocelular a um prognóstico favorável, porém, no presente estudo metade dos pacientes com medula hipocelular evoluíram a óbito. Essa elevada taxa de óbito (50%) juntamente com a alta frequência de alterações citogenéticas (60%) demonstram diferenças entre os dois grupos de pacientes e levam a uma possível correlação da presença de medula óssea hipocelular com um prognóstico desfavorável nos pacientes avaliados.

Quanto ao *CDKN1A*, observamos uma associação da sua hiperexpressão a um pior prognóstico. Foi encontrada uma relação de uma pior sobrevida com pacientes que apresentaram uma hiperexpressão desse gene. Além disso, os níveis de expressão desse gene se encontram aumentados nos pacientes com SMD, quando comparados com o grupo controle.

Estudos demonstram que o *CDKN1A* apresenta um duplo comportamento, dependendo da sua localização e do tipo celular, podendo atuar como gene supressor de tumor ou como oncogene (WISNIESKI et al, 2015). Han e colaboradores (2015) demonstraram que o aumento dos níveis de expressão do *CDKN1A* está relacionado a um pior prognóstico em pacientes com Linfoma de Burkitt e pacientes portadores de mieloma múltiplo, agindo como um oncogene nessas doenças. Os nossos achados sugerem que o *CDKN1A* também esteja agindo como um oncogene na SMD, estando relacionado a uma pior sobrevida dos pacientes.

Com relação à análise de correlação entre os genes, a forte correlação entre a *AURKA* e *AURKB* corrobora com os estudos relativos a função desses genes na mitose, formação do fuso mitótico e segregação cromossômica (KITZEN et al, 2010; AFONSO et al, 2016). A *AURKB* também apresentou correlação forte com o *CDC20*, que pode ser justificada pela ação da Aurora B na resposta a erros de sensoriamento dos pontos de checagem, garantindo a correta segregação durante a anáfase (AFONSO et al, 2016).

6. CONCLUSÃO

Neste estudo, encontramos correlações clínicas significativas com relação a expressão dos genes *AURKA*, *AURKB*, *TPX2*, *MAD2*, *CDC20* e *CDKN1A* reafirmando a importância do estudo desses genes na SMD, a fim de aprimorar os conhecimentos sobre a patogênese e evolução dessa síndrome.

7. REFERÊNCIAS

- Acquaviva C, Herzog F, Kraft C, Pines J. The anaphase promoting complex/cyclosome is recruited to centromeres by the spindle assembly checkpoint. **Nat Cell Biol.** 2004; 6(9): 892–898.
- Adès L, Itzykson R, Fenaux P. Myelodysplastic syndromes. **The Lancet.** 2014; 383(9936): 2239 - 2252.
- Afonso O, Figueiredo AC, Maiato H. Late mitotic functions of Aurora kinases. **Chromosoma.** 2016; 1-11.
- Aguirre-Portolés C, Bird AW, Hyman A, Cañamero M, Pérez de Castro I, Malumbres M. Tpx2 controls spindle integrity, genome stability, and tumor development. **Cancer Res.** 2012; 72(6):1518-1528.
- Albitar M, Manshouri T, Shen Y, et al. Myelodysplastic syndrome is not merely "preleukemia". **Blood.** 2012; 100(3):791-8.
- Amador V, Ge S, Santamaría PG, Guardavaccaro D, Pagano M. APC/C(Cdc20) controls the ubiquitin-mediated degradation of p21 in prometaphase. **Mol Cell.** 2007; 27(3): 462–473.
- Anand S, Penrhyn-Lowe S, Venkitaraman AR. AURORA-A amplification overrides the mitotic spindle assembly checkpoint, inducing resistance to Taxol. **Cancer Cell.** 2003; 3(1):51-62.
- Arber DA, et al. The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. **Blood.** 2016; 127(20): 2391-2405.
- Asteriti EA, et al. The Aurora-A/TPX2 complex: A novel oncogenic holoenzyme? **Biochimica et Biophysica Acta.** 2010; 1806:230–239.
- Bacher, U, et al. Rare cytogenetic abnormalities in myelodysplastic syndromes. **Mediterr. J. Hematol. Infect. Dis.** 2015; 7(1): e2015034.
- Bejar R, et al. Clinical effect of point mutations in myelodysplastic syndromes. **N Engl J Med,** 2011; 364(26):2496-506.
- Bejar R, Steensma DP. Recent developments in myelodysplastic syndromes. **Blood.** 2014; 124(18): 2793-2803.

Bejar R. Clinical and genetic predictors of prognosis in myelodysplastic syndromes. **Haematologica**. 2014; 99(6):956-964.

Belli, CB, et al. Myelodysplastic syndromes in South America: a multinational study of 1080 patients. **Am J Hematol.**, 2015; 90(10):851-8.

Bennett JM, et al. Proposals for the classification of the myelodysplastic syndromes. **Br J Haematol** 1982; 51:189-99.

Bernasconi P, et al. Validation of the new comprehensive cytogenetic scoring system (NCCSS) on 630 consecutive de novo MDS patients from a single institution. **Am J Hematol**, 2013; 88(2):120-9.

Bertolin G, et al. A FRET biosensor reveals spatiotemporal activation and functions of aurora kinase A in living cells. **Nature Communications**. 2016; 7:12674.

Bischoff JR, Anderson L, Zhu et al. A homologue of Drosophila aurora kinase is oncogenic and amplified in human colorectal cancers. **EMBO J**. 1998; 17:3052–3065.

Borgonovo T, et al. Cytogenetic study of Brazilian patients with Myelodysplastic Syndrome (MDS). **Genetics and Molecular Biology**. 2005; 28(4): 654-660.

Boudard D, Vasselon C, Berthéas et al. Expression and prognostic significance of Bcl-2 family proteins in myelodysplastic syndromes. **Am J Hematol**. 2002; 70(2):115-25.

Bowen, DT. Occupational and environmental etiology of MDS. **Best Pract Res Clin Haematol**. 2013; 26(4):319-26.

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

Budczies, J., et al. Cutoff Finder: a comprehensive and straightforward Web application enabling rapid biomarker cutoff optimization. **PLoS One**. 2012; 7(12):51862.

Burum-Auensen E, et al. Spindle proteins are differentially expressed in the various histological subtypes of testicular germ cell tumors. **Journal of Carcinogenesis**. 2010; 9:1.

Bustin AS, et al. The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative realtime PCR experiments. **Clin Chem**. 2009; 55(4):611-22.

Castro IP, Malumbres M. Mitotic stress and chromosomal instability in cancer: The case of TPX2. **Genes & Cancer**, 2013; 3(11-12):721-730.

Cazzalini A, et al. Multiple roles of the cell cycle inhibitor p21CDKN1A in the DNA damage response. **Mutation Research**. 2010; 704:12-20.

Cazzola M, Porta MGD, Malcovati L. The genetic basis of myelodysplasia and its clinical relevance. **Blood**. 2013; 122(25): 4021-4034.

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

Chang DZ, Ma Y, Ji B, Liu Y, Hwu P, Abbruzzese JL, Logsdon C, Wang H. (2012) Increased CDC20 expression is associated with pancreatic ductal adenocarcinoma differentiation and progression. **J Hematol Oncol**. 2012; 5: 15.

Chen J, Liu J. Spatial-temporal Model for Silencing of the Mitotic Spindle Assembly Checkpoint. **Nat Commun**. 2015; 5:4795.

Chen J, Liu J. Spindle Size Scaling Contributes to Robust Silencing of Mitotic Spindle Assembly Checkpoint. **Biophysical Journal**. 2016; 111:1064-1077.

Chieffi P, Cozzolino L, Kisslinger A, et al. Aurora B expression directly correlates with prostate cancer malignancy and influence prostate cell proliferation. **Prostate**. 2006; 66(3): 326–333.

Cogle, C. R. Incidence and Burden of the Myelodysplastic Syndromes. **Curr Hematol Malig Rep**. 2015; 10(3):272-81.

Corey SJ, et al. Myelodysplastic syndromes: the complexity of stem-cell diseases. **Nature Reviews Cancer**. 2007;7:118-129.

Cowley DO, Rivera-Pérez JA, Schliekelman M, et al. Aurora-A kinase is essential for bipolar spindle formation and early development. **Mol Cell Biol**. 2009; 29(4):1059-71.

Crane R, Kloepfer A, Ruderman JV. Requirements for the destruction of human Aurora-A. **J Cell Sci**. 2004; 117:5975–5983.

D'Assoro AB, Haddad T, Galanis E. Aurora-A Kinase as a Promising Therapeutic Target in Cancer. **Front Oncol.** 2016; 5:295.

Diaz-Rodriguez E, et al. Deficient spindle assembly checkpoint in multiple myeloma. **Plos one.** 2011; 6(11):e27583.

Ding ZY, Wu HR, Zhang JM, Huang GR, Ji DD. Expression characteristics of CDC20 in gastric cancer and its correlation with poor prognosis. **Int J Clin Exp Pathol.** 2014; 7(2): 722–727.

Dolatshad H, et al. Disruption of SF3B1 results in deregulated expression and splicing of key genes and pathways in myelodysplastic syndrome hematopoietic stem and progenitor cells. **Leukemia,** 2015; 29(8):1798.

Elias HK, et al. Stem cell origin of myelodysplastic syndromes. **Oncogene.** 2013: 1-12.

Faesen AC, et al. Basis of catalytic assembly of the mitotic checkpoint complex. **Nature.** 2017.

Ferrari S, Marin O, Pagano MA, et al. Aurora-A site specificity: a study with synthetic peptide substrates. **Biochem J.** 2005; 390:293–302.

Furlong F, Fitzpatrick P, O'Toole S, et al. Low MAD2 expression levels associate with reduced regression-free survival in patients with high-grade serous epithelial ovarian cancer. **J Pathol.** 2012; 226(5): 746–755.

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

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

Greenberg P. et al. International scoring system for evaluating prognosis in myelodysplastic syndromes. **Blood.** 1997; 89(6):2079-88.

Greenberg PL, Attar E, Bennett JM, Bloomfield CD, et al. NCCN Practice Guidelines for myelodysplastic syndromes, Version 1. 2014. **J Natl Compr Canc Netw.** 2013; 480(11):838-874.

Greenberg PL, Stone RM, Al-Kali A, Barta SK, et al. NCCN Practice Guidelines for myelodysplastic syndromes, Version 2.2017. **J Natl Compr Canc Netw**. 2017; 15(1): 60–87.

Greenberg, P. L et al. Revised international prognostic scoring system for myelodysplastic syndromes. **Blood**. 2012; 120(12): 2454-2465.

Gregan J, et al. Merotelic kinetochore attachment: causes and effects. **Trends Cell biology**. 2011; 21(6):374-381.

Gritsko TM, Coppola D, Paciga JE, et al. Activation and overexpression of centrosome kinase BTAK/aurora-A in human ovarian cancer. **Clin Cancer Res**. 2003; 9(4):1420–1426.

Gruss OJ, Wittmann M, Yokoyama H, Pepperkok R, Kufer T, Silljé H, Karsenti E, Mattaj IW, Vernos I. (2002) Chromosome-induced microtubule assembly mediated by TPX2 is required for spindle formation in HeLa cells. **Nat Cell Biol**. 4(11):871-879.

Gupta A, et al. Abrogation of AuroraA-TPX2 by novel natural inhibitors: molecular dynamics-based mechanistic analysis. **Journal of Receptors and Signal Transduction**. 2015; 1-8.

Haase D. Cytogenetics features in Myelodysplastic Syndromes. **Annals of Hematology**. 2008; 87:515–526.

Han S, et al. CDKN1A and FANCD2 are potential oncotargets in Burkitt lymphoma and multiple myeloma. **Experimental Hematology and Oncology**. 2015; 4:9.

Haydon CE, Eyers PA, Aveline-Wolf LD, Resing KA, Maller JL, Ahn NG. Identification of novel phosphorylation sites on *Xenopus laevis* Aurora A and analysis of phosphopeptide enrichment by immobilized metal-affinity chromatography. **Mol Cell Proteomics**. 2003; 2:1055-1067.

He W, Zhang MG, Wang XJ. AURKA suppression induces DU145 apoptosis and sensitizes DU145 to docetaxel treatment. **Am J Transl Res**. 2013; 5(3): 359-67.

Heidebrecht HJ, Buck F, Steinmann J, Sprenger R, Wacker HH, Parwaresch R. p100: a novel proliferation-associated nuclear protein specifically restricted to cell cycle phases S, G2, and M. **Blood**. 1997; 90(1):226-33.

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

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

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

Hilton JF, Shapiro GI. Aurora kinase inhibition as an anticancer strategy. **J Clin Oncol**. 2014; 32(1):57-9.

Iwanaga Y, Chi YH, Miyazato A, Sheleg S, Haller K, Peloponese JM Jr, Li Y, Ward JM, Benezra R, Jeang KT. Heterozygous deletion of mitotic arrest-deficient protein 1 (MAD1) increases the incidence of tumors in mice. **Cancer Res**. 2007; 67(1): 160-6.

Jaffe, ES, et al. WHO classification of tumours: tumours of haematopoietic and lymphoid tissues. **Lyon, France, 2001**.

Jeon HY, Lee H. Depletion of Aurora-A in zebrafish causes growth retardation due to mitotic delay and p53-dependent cell death. **FEBS J**. 2013; 280(6):1518-30.

Karimian A, Ahmadi Y, Yousefi B. Multiple functions of p21 in cell cycle, apoptosis and transcriptional regulation after DNA damage. **DNA Repair**. 2016; 42:63-71.

Kawankar N, Vundinti BR. Cytogenetic abnormalities in myelodysplastic syndrome: an overview. **Haematology**. 2011; 16(3): 131-138.

Kimura M, Kotani S, Hattori T, Sumi N, Yoshioka T, Todokoro K, Okano Y. Cell cycle-dependent expression and spindle pole localization of a novel human protein kinase, Aik, related to Aurora of Drosophila and yeast Ipl1. **J Biol Chem**. 1997; 272(21):13766-71.

Kimura M, Yoshioka T, Saio M, Banno Y, Nagaoka H, Okano Y. Mitotic catastrophe and cell death induced by depletion of centrosomal proteins. **Cell Death Dis**. 2013; 4: e603.

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

Koh Y, et al. Hypoplastic myelodysplastic syndrome (h-MDS) is a distinctive clinical entity with poorer prognosis and frequent karyotypic and FISH abnormalities compared to aplastic anemia (AA). **Leukemia Research**. 2010; 34:1344-50.

Lee Eun-Ju et al. The evolving field of prognostication and risk stratification in MDS: Recent developments and future directions. **Blood Reviews**. 2016; 30: 1-10.

Lee HH, Zhu Y, Govindasamy KM, Gopalan G. Downregulation of Aurora-A overrides estrogen-mediated growth and chemoresistance in breast cancer cells. **Endocr Relat Cancer**. 2008; 15(3):765-75.

Lee J, Kim JA, Margolis KL, Fotedar R. Substrate degradation by the anaphase-promoting complex occurs during mitotic slippage. **Cell Cycle**. 2010; 9(9):1792-1801.

Lee S, Han S, Jong AL, Park JS, Yang Y. Depletion of IK causes mitotic arrest through aberrant regulation of mitotic kinases and phosphatases. **FEBS Letter**. 2014; 588:2844-2850.

Lee SY, et al. BBcl2110, a new Tpx2 binding partner, is a master regulator of Aurora kinase A in mouse oocytes. **Cell Cycle**. 2016; 15(23):3296-3305.

Li B, Qi XQ, Chen X, Huang X, Liu GY, Chen HR, Huang CG, Luo C, Lu YC. Expression of targeting protein for Xenopus kinesin-like protein 2 is associated with progression of human malignant astrocytoma. **Brain Res**. 2010; 1352:200-7.

Li M, Fang X, Wei Z, York JP, Zhang P. Loss of spindle assembly checkpoint-mediated inhibition of Cdc20 promotes tumorigenesis in mice. **J Cell Biol**. 2009; 185(6): 983-94.

Liang B, et al. Overexpressed Targeting protein for Xklp2 (TPX2) serves as a promising prognostic marker and therapeutic target for gastric cancer. **Cancer Biology and Therapy**. 2016; 17(8):824-32.

Lin ZZ, Jeng YM, Hu FC, et al. Significance of Aurora B overexpression in hepatocellular carcinoma. Aurora B Overexpression in HCC. **BMC Cancer**. 2010; 10:461.

Littlepage LE, Ruderman JV. Identification of a new APC/C recognition domain, the A box, which is required for the Cdh1-dependent destruction of the kinase Aurora-A during mitotic exit. **Genes Dev**. 2002; 16:2274–2285.

Liu Q, Hirohashi Y, Du X, Greene MI, Wang Q. Nek2 targets the mitotic checkpoint proteins Mad2 and Cdc20: a mechanism for aneuploidy in cancer. **Exp Mol Pathol.** 2010; 88(2):225-33.

Livak, KJ., Schmittgen, TD. Analysis of relative gene expression data using real time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C(T)}$ method. **Methods.** 2001; 25:402-408.

London N, Biggins S. Signalling dynamics in the spindle checkpoint response. **Nature Reviews Molecular Cell Biology.** 2014.

Lucena-Araújo AR, et al. High expression of AURKA and AURKB is associated with unfavorable cytogenetic abnormalities and high white blood cell count in patients with acute myeloid leucemia. **Leukemia Research.** 2011; 35:260-264.

Ma Y, Lin D, Sun W, et al. Expression of targeting protein for xklp2 associated with both malignant transformation of respiratory epithelium and progression of squamous cell lung cancer. **Clin. Cancer Res.** 2006; 12(4): 1121-1127.

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,** 2011; 96:1433-1440.

Malcovati L, et al. Prognostic factors and life expectancy in MDS classified according to WHO criteria: a basis for clinical decision making. **J Clin Oncol.,** v. 23, p. 7594-603, 2005.

Malcovati L, Nimer SD. Myelodysplastic Syndromes: Diagnosis and Staging. **Cancer Control.** 2008; 15(4): 4-13.

Malureanu L, Jeganathan KB, Jin F, Baker DJ, van Ree JH, Gullon O, Chen Z, Henley JR, van Deursen JM. Cdc20 hypomorphic mice fail to counteract de novo synthesis of cyclin B1 in mitosis. **J Cell Biol.** 2010; 191(2): 313–329.

Mao JH, Wu D, Perez-Losada J, et al. Crosstalk between Aurora-A and p53: frequent deletion or downregulation of Aurora-A in tumors from p53 null mice. **Cancer Cell.** 2007; 11(2):161-73.

Marumoto T, Hirota T, Morisaki T, et al. Roles of aurora-A kinase in mitotic entry and G2 checkpoint in mammalian cells. **Genes to Cells.** 2002; 7:1173–1182.

Meraldi P, Honda R, Nigg EA. Aurora kinases link chromosome segregation and cell division to cancer susceptibility. **Current Opinion in Genetics & Development**. 2004; 14:29-36.

Michel LS, Liberal V, Chatterjee A, et al. MAD2 haplo-insufficiency causes premature anaphase and chromosome instability in mammalian cells. **Nature**. 2001; 409(6818):355-9.

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.

Nair JS, Ho AL, Schwartz GK. The induction of polyploidy or apoptosis by the Aurora A kinase inhibitor MK8745 is p53-dependent. **Cell Cycle**. 2012; 11(4):807-17.

Neumayer G, Belzil C, Gruss OJ, Nguyen MD. TPX2: of spindle assembly, DNA damage response, and cancer. **Cellular and Molecular Life Science**, 2014; 71(16):3027-3047.

Nguyen HG, Chinnappan D, Urano T, Ravid K. Mechanism of Aurora-B degradation and its dependency on intact KEN and A-boxes: identification of an aneuploidy-promoting property. **Mol Cell Biol**. 2005; 25:4977–4992.

Ohshima K, Karube K, Shimazaki K, et al. Imbalance between apoptosis and telomerase activity in myelodysplastic syndromes: possible role in ineffective hemopoiesis. **Leuk Lymphoma**. 2003; 44(8):1339-46.

Olney HJ, Le Beau MM. The Cytogenetics and molecular biology of the Myelodysplastic syndromes. In: STEENSMA, D. P. (Ed.). **Myelodysplastic syndromes: pathobiology and clinical management**. 2nd ed. New York: Informa Healthcare, 2002; 49-86.

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

Ota T, Suto S, Katayama H, et al. Increased mitotic phosphorylation of histone H3 attributable to AIM-1/Aurora-B overexpression contributes to chromosome number instability. **Cancer Res**. 2002; 62(18): 5168-77.

Otto T, Sicinski P. Cell cycle proteins as promising targets in cancer therapy. **Nat Rev Cancer**. 2017; 17(2): 93-115.

Ouellet V, Guyot MC, Le Page C, et al. Tissue array analysis of expression microarray

candidates identifies markers associated with tumor grade and outcome in serous epithelial ovarian cancer. **Int J Cancer**. 2006; 119(3): 599–607.

Papaemmanuil E, et al. Clinical and biological implications of driver mutations in myelodysplastic syndromes. **Blood**. 2013; 122(22):3616–3627.

Parker JE, Mufti GJ, Rasool F, Met al. The role of apoptosis, proliferation, and the Bcl-2-related proteins in the myelodysplastic syndromes and acute myeloid leukemia secondary to MDS. **Blood**. 2000; 96(12):3932-8.

Pellagatti A, Boultonwood J. The molecular pathogenesis os the myelodysplastic syndromes. **European Journal Haematology**. 2015; 95(1): 3-15.

Pfeilstöcker M, et al. Time-dependent changes in mortality and transformation risk in MDS. **Blood**, 2016; 128:902-910.

Pinheiro RF, Chauffaille MLLF. Comparison of I-FISH and G-banding for the detection of chromosomal abnormalities during the evolution of myelodysplastic syndrome. **Braz J Med Biol Res**. 2009; 42(11): 1110-1112.

Porta MGD, et al. Minimal morphological criteria for defining bone marrow dysplasia: a basis for clinical implementation of WHO classification of myelodysplastic syndromes. **Leukemia**. 2015; 29: 66-75.

Portella G, Passaro C, Chieffi P. Aurora B: A New Prognostic Marker and Therapeutic Target in Cancer. **Current Medicinal Chemistry**. 2011; 18: 482-496.

Prives C, Gottifredi V. The p21 and PCNA partnership: A new twist for an old plot. **Cell Cycle**. 2008; 7(24):3840-6.

Sassai K, et al. Functional significance of Aurora kinases-p53 protein family interactions in cancer. **Frontiers in Oncology**. 2016; 6:247.

Schuyler SC, Wu Yueh-Fu, Kuan V Jen-Wei. The Mad1–Mad2 balancing act – a damaged spindle checkpoint in chromosome instability and cancer. **Journal of Cell Science**. 2012; 125: 4197-4206.

Schvartzman Juan-Manuel, Sotillo R, Benezra R. Mitotic chromosomal instability and cancer: mouse modelling of the human disease. **Nat Rev Cancer**. 2010; 10(2): 102-105.

Sekeres MA. The Epidemiology of Myelodysplastic Syndromes. **Hematol Oncol Clin North Am**, 2010; 24(2):287-294.

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

Shahrabi S, et al. Genetics and epigenetics of myelodysplastic syndromes and response to drug therapy: new insights. **Oncology Reviews**. 2016; 10(4): 311.

Shi R, Sun Q, Sun J, Wang X, Xia W, Dong G, Wang A, Jiang F, Xu L. Cell division cycle 20 overexpression predicts poor prognosis for patients with lung adenocarcinoma. **Tumor Biology**. 2017; 39(3): 1-10.

Shimazaki K, Ohshima K, Suzumiya J, Kawasaki C, Kikuchi M. Evaluation of apoptosis as a prognostic factor in myelodysplastic syndromes. **Br J Haematol**. 2000; 110(3):584-90.

Sotillo R, Hernando E, Díaz-Rodríguez E, et al. Mad2 overexpression promotes aneuploidy and tumorigenesis in mice. **Cancer Cell**. 2007; 11(1): 9-23.

Souza DC, et al. Cytogenetic as an Important Tool for Diagnosis and Prognosis for Patients with Hypocellular Primary Myelodysplastic Syndrome. **BioMed Research International**. 2014; 542395.

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

Stewart S, Fang G. Anaphase-Promoting Complex/Cyclosome Controls the Stability of TPX2 during Mitotic Exit. **Molecular and cellular biology**. 2005; 25(23):10516-10527.

Su AI, Wiltshire T, Batalov S, et al. A gene atlas of the mouse and human protein-encoding transcriptomes. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2004; 101(16):6062-7.

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

Taguchi S, Honda K, Sugiura K, Yamaguchi A, Furukawa K, Urano T. Degradation of human Aurora-A protein kinase is mediated by hCdh1. **FEBS Lett.** 2002; 519:59–65.

Tobias O, Sicinsky P. Cell cycle proteins as promising targets in cancer therapy. **Nature Reviews.** 2017; 17(2):93-115.

Tomii C, Inokuchi M, Takagi Y, et al. TPX2 expression is associated with poor survival in gastric cancer. **World J Surg Oncol.** 2017; 15(1): 14.

Trakala M, et al. Aurora B prevents delayed DNA replication and premature mitotic exit by repressing p21^{Cip1}. **Cell Cycle.** 2013; 12(7):1030-41.

Tulu US, Fagerstrom C, Ferenz NP, Wadsworth P. Molecular requirements for kinetochore-associated microtubule formation in mammalian cells. **Curr Biol.** 2006; 16(5):536-41.

Uyanik MS, et al. Could the mosaic pattern of chromosomal abnormality predict overall survival of patients with myelodysplastic syndrome?. **Hematol Oncol Stem Cell Ther.** 2016; 9(2): 41-47.

Vader G, Lens SMA. The Aurora kinase family in cell division and cancer. **Biochimica et Biophysica Acta.** 2008: 60-72.

Vandesompele, J., et al. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. **Genome Biol.** 2002;3(7).

Vardiman JW, Harris NL, Brunning RD. The World Health Organization (WHO) classification of the myeloid neoplasms. **Blood.** 2002; 100:2292-2302.

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

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

Visconte C, et al. Molecular Pathogenesis of Myelodysplastic Syndromes. **Translational Medicine.** 2014; 8(4): 19-30.

Walter AO, Seghezzi W, Korver W, Sheung J, Lees E. The mitotic serine/threonine kinase Aurora2/AIK is regulated by phosphorylation and degradation. **Oncogene**. 2000; 19:4906–4916.

Wang L, et al. Targeting Cdc20 as a novel cancer therapeutic strategy. **Pharmacol Ther**. 2015; 151:141-151.

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

Wang Z, et al. Cdc20: a potential novel therapeutic target for cancer treatment. **Current Pharmaceutical Design**, 2013; 19:3210-4.

Wäsch R, Robbins JA, Cross FR. The emerging role of APC/C^{Cdh1} in controlling differentiation, genomic stability and tumor suppression. **Oncogene**. 2010; 29(1): 1–10.

Weaver BA, Cleveland DW. The role of aneuploidy in promoting and suppressing tumors. **J Cell Biol**. 2009; 185(6): 935.

Wei P, Zhang N, Xu Y, et al. TPX2 is a novel prognostic marker for the growth and metastasis of colon cancer. **Journal of Translational Medicine**. 2013; 11:313.

Wisnieski F, et al. CDKN1A histone acetylation and gene expression relationship in gastric adenocarcinomas. **Clin Exp Med**. 2015; 17(1):121-129.

Yang J, Ikezoe T, Nishioka C, et al. CD34/CD38 acute myelogenous leukemia cells aberrantly express Aurora kinase A. **Int J Cancer**. 2013; 133(11):2706-19.

Ye D, et al. Analysis of Aurora kinase A expression in CD34+ blast cells isolated from patients with myelodysplastic syndromes and acute myeloid leucemia. **J Hematopathol**. 2009; 2:2-8.

Yi L, et al. Dynamic imaging of MYC and CDKN1A mRNAs as an indicator of cell G1-phase arrest. **ChenComm**.

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

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

Zhou H, Kuang J, Zhong L, et al. Tumour amplified kinase STK15/BTAK induces centrosome amplification, aneuploidy and transformation. **Nat Genet.** 1998; 20: 189–193.

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

APÊNDICE A - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido do Paciente**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
FACULDADE DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE MEDICINA CLÍNICA****TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**

PROJETO: ESTUDO DE ALVOS MOLECULARES RELACIONADOS À MITOSE E AO CICLO CELULAR EM PACIENTES PORTADORES DE SÍNDROME MIELODISPLÁSICA

Você está sendo convidado a participar de um projeto de pesquisa. Sua participação é importante, porém, você não deve participar contra a sua vontade. Leia atentamente as informações abaixo e faça qualquer pergunta que desejar.

O abaixo assinado, _____
_____, ____ anos, RG nº _____, declara que é de livre e espontânea vontade que está participando como voluntário do projeto de pesquisa supracitado, de responsabilidade do pesquisador Prof. Dr. Ronald Feitosa Pinheiro / Daniela de Paula Borges. O abaixo assinado está ciente de que:

NATUREZA E PROPÓSITO DO ESTUDO

O objetivo da pesquisa é avaliar os níveis de expressão dos genes relacionados aos mecanismos de regulação do ciclo celular, ao ponto de checagem mitótico e ao fuso mitótico em pacientes portadores de síndrome mielodisplásica (SMD).

PROCEDIMENTOS A SEREM REALIZADOS E RESPONSABILIDADES

A amostra biológica utilizada na presente pesquisa corresponde a medula óssea do indivíduo.

A medula óssea corresponde a um tecido líquido-gelatinoso que ocupa o interior dos ossos, sendo conhecida popularmente por 'tutano'. Na medula óssea são produzidos os componentes do sangue: as hemácias (glóbulos vermelhos), os leucócitos (glóbulos brancos) e as plaquetas.

A coleta da medula óssea será realizada por médico hematologista experiente com agulha de mielograma mediante punção esternal. O osso do esterno é um osso chato, plano e ímpar localizado no centro do tórax. O osso do esterno é um importante osso hematopoético, ou seja, de produção das células sanguíneas. É neste osso que é realizada a punção da medula óssea.

Serão coletadas somente 2mL de amostra de medula óssea com o uso de uma agulha específica para aspiração da medula óssea. Todo o procedimento de coleta da medula óssea é realizado mediante administração de anestésico local com duração máxima de 15 minutos.

Durante o procedimento de coleta esternal da medula óssea, pode, raramente, determinar uma equimose (mancha arroxeadada) ao redor do local de onde foi retirado a medula óssea, desaparecendo em poucos dias, e poderá ocorrer dor discreta e de fácil alívio, podendo ser, ocasionalmente, dor de maior intensidade. Excepcionalmente, poderá ocorrer sangramento local. Raramente, pode ocorrer infecção local. Para pacientes com maior sensibilidade dolorosa existe a possibilidade de realizar o procedimento sob anestesia geral. A coleta deste material é necessária, em poucos casos, pela amostra ser insuficiente ou inadequada para análise.

Após o procedimento, serão coletados dados pessoais de sexo e idade, apresentação clínica e checagem dos exames laboratoriais indicados para esclarecimento diagnóstico, tais como: hemograma completo, citologia e histologia (análise microscópica das células) da medula óssea, avaliação para depósitos de ferro medular, bem como outros exames que são feitos mesmo para os pacientes que não participam de nenhuma pesquisa.

É de sua responsabilidade: comparecer nas datas e horários informados e submeter-se aos procedimentos de rotina do serviço.

PARTICIPAÇÃO VOLUNTÁRIA

Sua participação é voluntária e você tem a liberdade de desistir ou interromper a participação neste estudo no momento em que desejar. Neste caso, você deve informar imediatamente sua decisão ao pesquisador responsável ou a qualquer um membro de sua equipe, sem necessidade de qualquer explicação e sem que isto venha interferir no seu atendimento nesta instituição.

Independentemente de seu desejo e consentimento, sua participação no estudo poderá ser interrompida, em função da ocorrência de qualquer doença que, a critério médico, prejudique a continuação de sua participação no estudo, do não cumprimento das normas estabelecidas, de qualquer outro motivo que a critério da pesquisadora, seja do interesse de seu próprio bem-estar ou dos demais participantes e, por fim, da suspensão do estudo como um todo.

O Laboratório de Citogenômica do Câncer o manterá informado, em tempo oportuno, sempre que houver alguma informação adicional que possa influenciar seu desejo de continuar participando no estudo e prestará qualquer tipo de esclarecimento em relação ao progresso da pesquisa, conforme sua solicitação.

DIVULGAÇÃO DE INFORMAÇÕES QUANTO À PARTICIPAÇÃO NO ESTUDO

Os registros que possam identificar sua identidade serão mantidos em sigilo, a não ser que haja obrigação legal de divulgação. Você não será identificado por ocasião da publicação dos resultados obtidos.

Contudo, o(s) monitor(es) do Estudo, auditor(es), membros do Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos, ou autoridades do(s) órgão(s) regulamentar(es) envolvido(s) terão direito de ter acesso aos registros originais de dados clínicos de sua pessoa, coletados

durante a pesquisa, na extensão em que for permitido pela Lei e regulamentações aplicáveis, como o propósito de verificar os procedimentos e dados do estudo, sem, no entanto, violar a condição de que tais informações são confidenciais.

CONTATOS E PERGUNTAS

Caso surja algum imprevisto ou dúvidas, você deverá entrar em contato solicitar contato direto com o pesquisador responsável pelo estudo: **Dr. Ronald Feitosa Pinheiro (85-81881972)** ou com o aluno de Doutorado Acadêmico **Daniela de Paula Borges (85 – 96381121)**.

Poderá contatar a Secretaria do Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Ceará - UFC ou no local (Rua Coronel Nunes de Melo, 1000) ou pelo telefone 3366-8344, para apresentar recursos ou reclamações em relação ao estudo.

Somente assine este termo se você tiver a certeza de que recebeu todos os esclarecimentos e informações para decidir conscientemente sobre a sua participação neste estudo.

ASSINATURAS

Autorizo o acesso às minhas informações de saúde aos membros da equipe de pesquisadores, nas condições estabelecidas descritas nos itens acima.

Não renunciei qualquer direito legal que eu venha a ter ao participar deste Estudo.

Eu, por fim, declaro que li cuidadosamente todo este documento denominado **Termo de Consentimento Livre e Esclarecido** e que, após a assinatura, tive oportunidade de fazer perguntas sobre o conteúdo do mesmo e também sobre o referido estudo, recebendo explicações que responderam por completo minhas dúvidas e reafirmando estar livre e espontaneamente decidido a participar do estudo, ficando munido de uma via do documento assinado pelo pesquisador responsável.

_____/_____/_____
Data

Assinatura do participante da pesquisa

_____/_____/_____
Data

Assinatura do Pesquisador Responsável

_____/_____/_____
Data

Assinatura do Responsável pela aplicação do TCLE

APÊNDICE B - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido do Voluntário



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

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

PROJETO: ESTUDO DE ALVOS MOLECULARES RELACIONADOS À MITOSE E AO CICLO CELULAR EM PACIENTES PORTADORES DE SÍNDROME MIELODISPLÁSICA

Você está sendo convidado a participar de um projeto de pesquisa. Sua participação é importante, porém, você não deve participar contra a sua vontade. Leia atentamente as informações abaixo e faça qualquer pergunta que desejar.

O abaixo assinado, _____, _____, ____ anos, RG nº _____, declara que é de livre e espontânea vontade que está participando como voluntário do projeto de pesquisa supracitado, de responsabilidade do pesquisador Prof. Dr. Ronald Feitosa Pinheiro / Howard Lopes Ribeiro Junior. O abaixo assinado está ciente de que:

NATUREZA E PROPÓSITO DO ESTUDO

O objetivo da pesquisa é avaliar os níveis de expressão dos genes relacionados aos mecanismos de regulação do ciclo celular, ao ponto de checagem mitótico e ao fuso mitótico em pacientes portadores de síndrome mielodisplásica (SMD). Para compreender melhor os pontos clínicos dos pacientes visualizados nesta pesquisa, precisamos comparar os achados clínicos destes pacientes com indivíduos saudáveis (voluntários). É devido a este contexto que necessitamos recrutar indivíduos saudáveis (voluntários) para participar da presente pesquisa.

PROCEDIMENTOS A SEREM REALIZADOS E RESPONSABILIDADES

A amostra biológica utilizada na presente pesquisa corresponde a medula óssea do indivíduo.

A medula óssea corresponde a um tecido líquido-gelatinoso que ocupa o interior dos ossos, sendo conhecida popularmente por 'tutano'. Na medula óssea são produzidos os componentes do sangue: as hemácias (glóbulos vermelhos), os leucócitos (glóbulos brancos) e as plaquetas.

A coleta da medula óssea será realizada por médico hematologista experiente com agulha de mielograma mediante punção esternal. O osso do esterno é um osso chato, plano e ímpar localizado no centro do tórax. O osso do esterno é um importante osso hematopoético, ou seja, de produção das células sanguíneas. É neste osso que é realizada a punção da medula óssea.

Serão coletadas somente 2mL de amostra de medula óssea com o uso de uma agulha específica para aspiração da medula óssea. Todo o procedimento de coleta da medula óssea é realizado mediante administração de anestésico local com duração máxima de 15 minutos.

Durante o procedimento de coleta esternal da medula óssea, pode, raramente, determinar uma equimose (mancha arroxeadada) ao redor do local de onde foi retirado a medula óssea, desaparecendo em poucos dias, e poderá ocorrer dor discreta e de fácil alívio, podendo ser, ocasionalmente, dor de maior intensidade. Excepcionalmente, poderá ocorrer sangramento local. Raramente, pode ocorrer infecção local. Para pacientes com maior sensibilidade dolorosa existe a possibilidade de realizar o procedimento sob anestesia geral. A coleta deste material é necessária, em poucos casos, pela amostra ser insuficiente ou inadequada para análise.

Após o procedimento, serão coletados dados pessoais de sexo e idade.

É de sua responsabilidade: comparecer nas datas e horários informados e submeter-se aos procedimentos de rotina do serviço.

PARTICIPAÇÃO VOLUNTÁRIA

Sua participação é voluntária e você tem a liberdade de desistir ou interromper a participação neste estudo no momento em que desejar. Neste caso, você deve informar imediatamente sua decisão ao pesquisador responsável ou a qualquer um membro de sua equipe, sem necessidade de qualquer explicação e sem que isto venha interferir no seu atendimento nesta instituição.

Independentemente de seu desejo e consentimento, sua participação no estudo poderá ser interrompida, em função da ocorrência de qualquer doença que, a critério médico, prejudique a continuação de sua participação no estudo, do não cumprimento das normas estabelecidas, de qualquer outro motivo que, a critério da pesquisadora, seja do interesse de seu próprio bem-estar ou dos demais participantes e, por fim, da suspensão do estudo como um todo.

O Laboratório de Citogenômica do Câncer o manterá informado, em tempo oportuno, sempre que houver alguma informação adicional que possa influenciar seu desejo de continuar participando no estudo e prestará qualquer tipo de esclarecimento em relação ao progresso da pesquisa, conforme sua solicitação.

DIVULGAÇÃO DE INFORMAÇÕES QUANTO À PARTICIPAÇÃO NO ESTUDO

Os registros que possam identificar sua identidade serão mantidos em sigilo, a não ser que haja obrigação legal de divulgação. Você não será identificado por ocasião da publicação dos resultados obtidos.

Contudo, o(s) monitor(es) do Estudo, auditor(es), membros do Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos, ou autoridades do(s) órgão(s) regulamentar(es) envolvido(s)

terão direito de ter acesso aos registros originais de dados clínicos de sua pessoa, coletados durante a pesquisa, na extensão em que for permitido pela Lei e regulamentações aplicáveis, como o propósito de verificar os procedimentos e dados do estudo, sem, no entanto, violar a condição de que tais informações são confidenciais.

CONTATOS E PERGUNTAS

Caso surja algum imprevisto ou dúvidas, você deverá entrar em contato solicitar contato direto com o pesquisador responsável pelo estudo: **Dr. Ronald Feitosa Pinheiro (85-81881972)** ou com o aluno de Doutorado Acadêmico **Daniela de Paula Borges (85 – 96381121)**.

Poderá contatar a Secretaria do Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Ceará - UFC ou no local (Rua Coronel Nunes de Melo, 1000) ou pelo telefone 3366-8344, para apresentar recursos ou reclamações em relação ao estudo.

Somente assine este termo se você tiver a certeza de que recebeu todos os esclarecimentos e informações para decidir conscientemente sobre a sua participação neste estudo.

ASSINATURAS

Autorizo o acesso às minhas informações de saúde aos membros da equipe de pesquisadores, nas condições estabelecidas descritas nos itens acima.

Não renunciei qualquer direito legal que eu venha a ter ao participar deste Estudo.

Eu, por fim, declaro que li cuidadosamente todo este documento denominado **Termo de Consentimento Livre e Esclarecido** e que, após a assinatura, tive oportunidade de fazer perguntas sobre o conteúdo do mesmo e também sobre o referido estudo, recebendo explicações que responderam por completo minhas dúvidas e reafirmando estar livre e espontaneamente decidido a participar do estudo, ficando munido de uma via do documento assinado pelo pesquisador responsável.

_____/_____/_____
Data

Assinatura do participante da pesquisa

_____/_____/_____
Data

Assinatura do Pesquisador Responsável

_____/_____/_____
Data

Assinatura do Responsável pela aplicação do TCLE