



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
FACULDADE DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE PATOLOGIA E MEDICINA LEGAL
MESTRADO EM PATOLOGIA

DIEGO SILVA LIMA

**AVALIAÇÃO DOS GENES *MLL*, *RB* E *TP53* EM PACIENTES COM
SÍNDROME MIELODISPLÁSICA**

FORTALEZA
2011

DIEGO SILVA LIMA

AVALIAÇÃO DOS GENES *MLL*, *RB* E *TP53* EM PACIENTES COM
SÍNDROME MIELODISPLÁSICA

Dissertação submetida à Coordenação do Curso de Pós-Graduação em Patologia Tropical, do Departamento de Patologia e Medicina Legal da Universidade Federal do Ceará, como parte dos requisitos necessários para obtenção do título de mestre.

Orientador: Prof. Dr. Ronald Feitosa Pinheiro

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

L697a Lima, Diego Silva.
Avaliação dos genes MLL, RB e TP53 em pacientes com síndrome mielodisplásica / Diego Silva
Lima. - 2011
94 f. : il. Color., enc. ; 30 cm

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina, Departamento de Patologia e Medicina Legal, Programa de Pós-Graduação em Patologia, 2011.
Área de Concentração: Anatomia Patológica e Patologia Clínica.
Orientação: Prof. Dr. Ronald Feitosa Pinheiro.

1. Citogenética. 2. Retinoblastoma. 3. Genes p53. 4. Hibridização In Situ Fluorescente. I. Título

CDD 574.87322

DIEGO SILVA LIMA

AVALIAÇÃO DOS GENES *MLL*, *RB* E *TP53* EM PACIENTES COM
SÍNDROME MIELODISPLÁSICA

Dissertação submetida à Coordenação do
Curso de Pós-Graduação em Patologia
Tropical, do Departamento de Patologia e
Medicina Legal da Universidade Federal do
Ceará, como parte dos requisitos necessários
para a obtenção do título de mestre.

Aprovada em: ___/___/2011.

BANCA EXAMINADORA

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

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

Prof^a. Dra. Sílvia Maria Meira Magalhães
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof^a. Dra. Romélia Gonçalves Pinheiro
Universidade Federal do Ceará (UFC)

A meus pais, irmão e namorada que com amor e dedicação incentivam meu crescimento intelectual.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador Prof. Ronald F. Pinheiro, por ajudar na concretização deste projeto. Que possamos unir forças e investir ainda mais tempo e esforços em prol da pesquisa.

Aos meus pais, Flávio e Elisoneide, pelo amor, proteção, incentivo e investimento pessoal e profissional não só durante este período, mas sempre. Para vocês meu eterno obrigado.

À Prof. Dra. Margarida Maria de Lima Pompeu, pela compreensão e incentivo durante toda esta trajetória, que nossos caminhos continuem se cruzando por muitas e muitas vezes.

Ao meu irmão, pela amizade e companheirismo que tanto foram importantes nos momentos difíceis. Obrigado pelos momentos de descontração.

À Juliana, por entender e sempre estar ao meu lado em todos os momentos e por tornar minha caminhada pela vida mais suave e calma.

Ao Dr. Jesamar Correia Matos, pela amizade, conselhos e brilhante profissionalismo. Obrigado por acreditar e incentivar meu crescimento profissional. Meu muito obrigado.

À Dra. Fátima Guerreiro, pessoa de fibra e dedicação profissional, amiga em todos os momentos, seus conselhos foram todos bem recebidos.

Ao Prof. Dr. Sócrates Gondim, pessoa e profissional excepcional, a quem sigo o exemplo. Muito obrigado pelos conselhos.

Aos demais amigos do Centro de Referência no Diagnóstico do Câncer da Criança e do Adolescente Dr. Murilo Martins, os quais considero uma segunda família.

À Juliana do laboratório de citogenética, pela ajuda na captação dos dados.

À Universidade Federal do Ceará (UFC), que me concedeu a oportunidade de subir mais um degrau da longa escada da vida.

Obrigado especial ao bom Deus, pois sem Ele nada disso seria possível.

*“...vem vamos embora que esperar não é saber, quem sabe faz a
hora não espera acontecer...”*

Geraldo Vandré

RESUMO

As síndromes mielodisplásicas (SMD) representam um grupo heterogêneo de doenças clonais que acometem a célula precursora hematopoética pluripotente, caracterizando-se por baixa contagem de células no sangue periférico, displasia em uma ou mais linhagens celulares, hematopoese ineficiente, além do risco aumentado de progressão para leucemia mielóide aguda. Embora a doença possa acometer pacientes de outras faixas etárias, é mais frequente naqueles com idade avançada, com média ao diagnóstico de 60 a 75 anos. As anormalidades cromossômicas são observadas em aproximadamente 50% de todos os casos de SMD, estando, em alguns casos, relacionadas com achados clínicos e morfológicos. O objetivo deste trabalho foi determinar, através da técnica de FISH (hibridização *in situ* por fluorescência), a frequência de alterações envolvendo os genes *MLL*, *RB* e *TP53* em pacientes com SMD e associar estas alterações com os achados citogenéticos. Os casos inseridos no estudo foram oriundos do ambulatório de SMD do Hospital Universitário Walter Cantídio. Dos 33 pacientes selecionados, 17 pertenciam ao grupo com idade acima de 60 anos. 52% dos pacientes foram classificados, segundo a OMS, como citopenia refratária com displasia em múltiplas linhagens (CRDM) e 61% estratificados, segundo o IPSS, como de risco intermediário 1 (INT-1). Um total de 78% dos pacientes apresentaram alterações citogenéticas, dentre eles 31% possuíam cariótipos complexos (mais de 3 alterações por metáfase). A técnica de FISH permitiu identificar em 18% dos pacientes alterações envolvendo um dos três genes avaliados. Três pacientes apresentaram alteração do gene *TP53*, sendo detectada em dois deles (registros 31 e 6) a deleção de um único alelo ou de ambos os alelos do gene, respectivamente, e no terceiro (registro 2), detectou-se a amplificação do gene *TP53*, sendo estas alterações não visualizadas através da citogenética clássica, por se tratar de uma técnica menos sensível. Detectou-se em 6% dos pacientes (registros 7 e 22) rearranjo do gene *MLL*, no primeiro a FISH descartou a suposta deleção do gene alegada pela citogenética, provando que o mesmo estava presente no genoma do paciente, porém de forma rearranjada e no segundo a citogenética não conseguiu demonstrar o rearranjo do gene. Quanto ao gene *RB*, a FISH permitiu identificar apenas um paciente (3%) com deleção de um dos alelos do gene, sendo esta alteração também não detectada pela citogenética clássica. A FISH possibilitou identificar, durante a avaliação do gene *TP53*, dois pacientes (registros 5 e 10) apresentando pelo menos 6 cópias extras do cromossomo 17, devendo essa alteração se tratar de um pequeno clone hiperdiploide detectado parcialmente no primeiro paciente e não detectado no segundo. Nos seis pacientes que apresentaram alteração dos genes avaliados, a FISH proveu informações que adicionaram, confirmaram ou alteraram o resultado previamente emitido pela citogenética clássica, sendo estas uma das principais aplicações desta técnica devido sua alta sensibilidade quando comparada ao método clássico.

Palavras-chave: Síndrome mielodisplásicas; citogenética; gene *MLL*; gene *RB*; gene *TP53*; FISH.

ABSTRACT

Myelodysplastic syndromes (MDS) represent a heterogeneous group of clonal disorders affecting the hematopoietic pluripotent cell, characterized by low cell counts in peripheral blood, dysplasia in one or more cell lines, inefficient hematopoiesis and increased risk of progression to acute myeloid leukemia. Although the disease can affect patients of other age groups, they are more frequent in those with advanced age with an average 60 to 75 years at diagnosis. Chromosomal abnormalities are observed in approximately 50% of all cases of MDS and are related with clinical and morphological findings. The aim of this study was to determine, through the technique of FISH (fluorescence *in situ* hybridization), the frequency of changes involving the *MLL*, *RB*, and *TP53* genes in patients with MDS and associate these changes with cytogenetic findings. The cases included in the study were selected in the ambulatory of SMD from University Hospital Walter Cantídio. Thirty three patients were selected, 17 had aged over 60 years. 52% of patients were classified, according to WHO criteria, as refractory cytopenia with dysplasia in multiple lineages (RCMD) and 61% stratified, according to IPSS, as intermediate risk 1 (INT-1). 78% of patients had abnormalities detected by cytogenetics, among them 31% had complex karyotypes (more than 3 changes per metaphase). 18% of patients had changes at least in one of the three genes valued in this study by FISH. Three patients showed alterations of *TP53* gene, being detected in two patients (records 31 and 6) the deletion of a single allele or both alleles of the gene, respectively, and in the third (record 2), we detected amplification of *TP53* gene, all this changes were not detected by classical cytogenetics, because it is a less sensitive technique. 6% of patients (records 7 and 22) had rearrangement of *MLL* gene. In the first case, FISH discarded the gene deletion alleged by cytogenetic, proving that it was present in the genome of the patient, but in a rearranged form, and in the second case cytogenetics failed to demonstrate rearrangement of the gene. For the *RB* gene, FISH identified only one patient (3%) with deletion of one allele of the gene, and this change was also not detected by classical cytogenetics. During evaluating the *TP53* gene, FISH allowed identification of two patients (records 5 and 10) presenting at least six extra copies of chromosome 17, probably representing a small hyperdiploid clone partially detected in the first patient and not detected in the second. In the six patients who showed abnormalities of the genes analyzed, FISH has provided information that added, changed or confirmed the result previously given by classical cytogenetics, which are a major application of this technique due to its high sensitivity compared to the traditional method.

Keywords: myelodysplastic syndrome; cytogenetics; *MLL* gene; *RB* gene; *TP53* gene; FISH.

LISTA DE ABREVIATURAS

- SMD – Síndromes Mielodisplásicas
- MO – Medula Óssea
- LMA – Leucemia Mielóide Aguda
- LLA – Leucemia Linfóide Aguda
- SP – Sangue Periférico
- FAB – Grupo Frânces-Americano-Britânico
- SEER – Surveillance, Epidemiology and End Results
- INCA – Instituto Nacional do Câncer
- RB – Retinoblastoma
- MLL – Mixed Lineage Leukemia
- FISH – Fluorescence *In Situ* Hybridization
- SMDt – Síndromes Mielodisplásicas Secundárias ao Tratamento
- DNA – Ácido Desoxirribonucleico
- IL – Interleucina
- TNF – Fator de Necrose Tumoral
- VEGF – Fator de Crescimento Endotelial Vascular
- MHC – Complexo Maior de Histocompatibilidade
- LOH – Perda de Heterozigosidade
- AR – Anemia Refratária
- ARSA – Anemia Refratária com Sideroblastos em Anel
- AREB – Anemia Refratária com Excesso de Blastos
- AREB-t – Anemia Refratária com Excesso de Blastos em Transformação
- LMMC – Leucemia Mielomonocítica Crônica
- OMS – Organização Mundial de Saúde
- CRDM – Citopenia Refratária com Displasia em Múltiplas Linhagens
- IPSS – Sistema Internacional de Escore Prognóstico

- WPSS – Sistema de Escore Prognóstico Baseado na Classificação OMS
- FCSS – Sistema de Escore por Citometria de Fluxo
- LMC – Leucemia Mielóide Crônica
- Ph – Cromossomo Filadélfia
- WCP – Sonda de Pintura Cromossômica
- CGH – Hibridização Genômica Comparativa
- CDK – Quinases Dependentes de Ciclinas
- Mdm2 – Murine Double Minute
- LLC – Leucemia Linfocítica Crônica
- MM – Mieloma Múltiplo

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	– Classificação das Mielodisplasias Segundo o Grupo FAB	23
Tabela 2	– Classificação das Mielodisplasias Segundo o Comitê OMS	24
Tabela 3	– Sistema Internacional de Escore Prognóstico (IPSS)	26
Tabela 4	– Sistema de Escore Prognóstico Baseado na Classificação OMS	27
Tabela 5	– Alterações citogenéticas recorrentes e suas frequências	31
Tabela 6	– Vantagens e desvantagens da citogenética convencional	37
Tabela 7	– Vantagens e desvantagens da técnica de FISH	38
Tabela 8	– Distribuição dos pacientes segundo as definições de prognóstico do IPSS.....	63
Tabela 9	– Resultados citogenéticos dos pacientes com alterações moleculares.....	70

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1	– Cariótipo clássico do sexo masculino	29
Figura 2	– Cariótipo com Banda G do sexo masculino	30
Figura 3	– Cariótipo do sexo masculino apresentando trissomia do cromossomo 8	32
Figura 4	– Cariótipo do sexo masculino apresentando monossomia do cromossomo 7	32
Figura 5	– Representação esquemática dos passos básicos da técnica de FISH	34
Figura 6	– Deleção do 5q detectada por FISH utilizando sonda gene específica	35
Figura 7	– Trissomia do 8 detectada por FISH utilizando sonda centromérica	35
Figura 8	– Detecção do cromossomo 2 e Xp por FISH utilizando sonda subtelomérica	36
Figura 9	– Detecção do cromossomo 7 por FISH utilizando sonda WCP	36
Figura 10	– Ciclo Celular	40
Figura 11	– Organização estrutura da proteína p53	41
Figura 12	– Rede regulatória mediada pela proteína p53	42
Figura 13	– Via de bloqueio em fase G1 mediado por p53	44
Figura 14	– Frequência relativa de mutações missenses em cada resíduo	45
Figura 15	– Estrutura esquemática da proteína Rb	47
Figura 16	– Estrutura da proteína MLL	50
Figura 17	– O papel das proteínas Hox no controle da hematopoese	51
Figura 18	– Frequência de aberrações cromossômicas envolvendo o gene <i>MLL</i>	53
Figura 19	– Amplificação do gene <i>TP53</i>	64
Figura 20	– Deleção do gene <i>TP53</i>	65
Figura 21	– Deleção dos dois alelos do gene <i>TP53</i>	66
Figura 22	– Rearranjo do gene <i>MLL</i>	67
Figura 23	– Deleção do gene <i>RB</i>	68
Figura 24	– Marcação anômala da região centromérica do cromossomo 17	69
Figura 25	– Resultado citogenético e de FISH do paciente 31	71
Figura 26	– Resultado citogenético e de FISH do paciente 6	71
Figura 27	– Resultado citogenético e de FISH do paciente 2	72
Figura 28	– Resultado citogenético e de FISH do paciente 22	73
Figura 29	– Resultado citogenético e de FISH do paciente 7	73

Figura 30	– Resultado citogenético e de FISH do paciente 26	74
Gráfico 1	– Distribuição dos pacientes segundo a classificação OMS	61
Gráfico 2	– Distribuição dos pacientes segundo o critério IPSS	61
Quadro 1	– Resultados citogenéticos	62

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	16
2	REVISÃO DE LITERATURA	17
2.1	Síndromes mielodisplásicas	17
2.1.1	Epidemiologia	18
2.1.2	Patogênese	19
2.1.3	Classificação	21
2.1.4	Estratificação de risco	25
2.1.4.1	<i>IPSS</i>	25
2.1.4.2	<i>WPSS</i>	26
2.2	Citogenética	27
2.3	FISH (Hibridização <i>In Situ</i> por Fluorescência)	33
2.4	Gene <i>TP53</i>	38
2.5	Gene <i>RB</i>	45
2.6	Gene <i>MLL</i>	49
3	OBJETIVOS	54
3.1	Objetivo geral	54
3.2	Objetivos específicos	54
4	CASUÍSTICA E MÉTODOS	55
4.1	Desenho do estudo	55
4.2	Casuística	55
4.3	Metodologia	55
4.3.1	Citogenética clássica	56
4.3.2	Coleta de amostras	56
4.3.3	Seleção das Sondas DNA	57
4.3.4	Hibridização <i>In Situ</i> por Fluorescência	57
4.3.5	Aspectos éticos	59
5	RESULTADOS	60
5.1	Classificação OMS e IPSS	60
5.2	Citogenética Clássica	61
5.3	FISH	63

5.3.1	Gene <i>TP53</i>	63
5.3.2	Gene <i>MLL</i>	67
5.3.3	Gene <i>RB</i>	68
5.3.4	Marcação Anômala da Região Centromérica	69
5.4	FISH e Citogenética	70
5.4.1	Gene <i>TP53</i>	70
5.4.2	Gene <i>MLL</i>	72
5.4.3	Gene <i>RB</i>	74
6	DISCUSSÃO	75
7	CONCLUSÕES	81
	REFERÊNCIAS	82
	ANEXOS	91
	APÊNDICE	94

1 INTRODUÇÃO

A hematopoese é um processo fisiológico que resulta na produção de células sangüíneas das diferentes linhagens, sendo todas originadas a partir de células-tronco hematopoéticas. Os mecanismos de proliferação e diferenciação são altamente coordenados e envolvem múltiplas interações entre os processos genéticos intrínsecos e o estroma medular (microambiente). Essas interações, em conjunto com o equilíbrio entre a proliferação e a morte celular programada (apoptose), são vitais para a manutenção e garantia da homeostase sanguínea, além dos vários outros tecidos. Via de regra, a vantagem proliferativa observada nas células cancerosas resulta da perda deste complexo equilíbrio, acarretando um aumento na proliferação e uma redução da apoptose com consequente expansão do número de células neoplásicas (MUFTI, 2004).

Apesar da grande heterogeneidade entre as diversas neoplasias humanas todas apresentam uma característica em comum: cada neoplasia constitui um *clone* derivado de uma única célula que sofreu em algum momento do seu desenvolvimento alteração(ões) crítica(s) em seu material genético (DNA) e transmitiu esta(s) alteração(ões) a todas as suas descendentes. Diante da complexidade inerente à ação mutacional pode-se afirmar que essas alterações (mutações) têm como alvo um ou mais genes pertencentes a um dos quatro grupo de genes relacionados com a proliferação, diferenciação e morte celular, sendo eles: genes reguladores do ciclo celular, genes relacionados com o desenvolvimento de neoplasias (oncogenes e genes supressores tumorais), genes reguladores de apoptose e genes de reparo do DNA (IBRAHIM *et al.*, 2000; RIBEIRO, 2005).

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Síndromes mielodisplásicas

As síndromes mielodisplásicas (SMDs) representam um grupo heterogêneo de doenças clonais que acometem a célula precursora hematopoética pluripotente (stem cell), caracterizando-se por citopenias periféricas, displasias em uma ou mais linhagens celulares, hematopoese ineficiente com anormalidades de maturação e proliferação celular, além do risco aumentado de progressão para leucemia mielóide aguda (LMA). Estudos demonstram que aproximadamente um terço dos pacientes com SMD evoluem para LMA (BOUSCARY *et al.*, 1997; RIBEIRO, 2005; RIBIZZI *et al.*, 2001). A transformação para leucemia linfóide aguda (LLA) é extremamente rara. No entanto, quando este evento ocorre, a grande maioria dos casos são de células precursoras B (SATO *et al.*, 2004). O prognóstico é desfavorável nos casos que apresentam alta porcentagem de blastos na medula óssea (MO), citopenias periféricas acentuadas e alterações citogenéticas (BRUNNING *et al.*, 2008; GREENBERG, 1998; SCOTT; DEEG, 2010).

As SMDs foram provavelmente descritas pela primeira vez por volta de 1900 por Leube como se tratando de uma “Leukanemia” (uma anemia macrocítica com progressão para leucemia aguda), o qual na época acreditava-se ter como agentes etiológicos aqueles oriundos dos diversos processos infecciosos (NIMER, 2008). Outras referências à doença datam de 1941 com o termo anemia refratária, seguido por “pré-leucemia” em 1953, anemia refratária com sideroblastos em anel em 1956, leucemia mielomonocítica em 1970, e posteriormente recebendo a denominação de “síndromes mielodisplásicas” pelo grupo Francês-Americano-Inglês (FAB). A maioria dos pacientes com SMD apresentam anemia macrocítica com ou sem citopenias adicionais no momento diagnóstico, sendo de extrema importância a realização de exames diferenciais para se descartar outras causas de anemia macrocítica como: deficiências de vitamina B12 e ácido fólico, alcoolismo, doenças auto-imunes e doenças tireoidianas (KOMROKJI; ZHANG; BENNETT, 2010; SCOTT; DEEG, 2010).

Displasias, citopenias e assincronismo maturativo são achados hematológicos da MO que podem ocorrer em grau variável nas células do sangue periférico (SP), em uma ou mais linhagens. As anormalidades qualitativas mais comumente observadas são: assincronia maturativa núcleo-citoplasma, presença de sideroblastos em anel, fragmentação nuclear dos

eritroblastos, bastonetes gigantes, granulócitos hipersegmentados e anomalia de pseudo Pelger-Huët (RIBEIRO, 2005). A análise morfológica de esfregaços de MO e SP, aliada aos dados clínicos, testes laboratoriais, histologia da MO (biópsia), alterações citogenéticas e, mais recentemente, dados imunofenotípicos, são importantes para estabelecer o diagnóstico de SMD (BRUNNING *et al.*, 2008; STETLER-STEVENSON *et al.*, 2001). Anemia e seus sintomas relacionados são as manifestações clínicas mais comuns para a maioria dos pacientes com SMD. As principais causas de morte para estes pacientes, bem como aqueles em progressão para LMA, são infecções, hemorragias e defeitos funcionais na circulação das células sanguíneas. (MUFTI, 2004).

2.1.1 Epidemiologia

Estudos epidemiológicos demonstram que as SMDs correspondem a malignidade hematológica mais comum em pacientes com idade avançada, com média de idade variando entre 60 a 75 anos ao diagnóstico (MUFTI, 2004). Dados ainda comprovam que a doença é mais comum em homens do que em mulheres e em pessoas brancas do que em negras (BARZI; SEKERES, 2010).

Em 2001 nos Estados Unidos, o programa do Instituto Nacional do Câncer - SEER (Surveillance, Epidemiology and End Results), aliado aos Centros para Controle e Prevenção de Doença, iniciaram um rastreamento para identificar as taxas de incidência de SMD, até então não estabelecidas. Baseado nos dados do SEER, coletados entre 2001 e 2003, a taxa de incidência idade-ajustada de SMD nos EUA foi estimada em aproximadamente 3,4 por 100.000 habitantes, que se traduz em 10.000 novos casos por ano. Em 2004 a incidência foi estimada em 3,8 por 100.000 habitantes, tendo sido demonstrado um incremento no risco de progressão para LMA (XIAOMEI *et al.*, 2007). O aumento da incidência pode ser atribuído diretamente às melhorias dos métodos diagnósticos, maior conhecimento da fisiopatologia da doença e ao avanço da idade da população mundial. Espera-se que a parcela da população com 65 anos ou mais praticamente duplique no período compreendido entre 2000 e 2030 (BARZI; SEKERES, 2010; MUFTI, 2004; SEKERES, 2010).

Os dados coletados por esse programa ainda comprovam que a incidência de SMD aumenta com o avanço da idade sendo de 0,14 por 100.000 para pacientes até 40 anos contra 36 por 100.000 para pacientes com 80 anos ou mais. A incidência americana é similar

às reportadas pela Inglaterra e Suécia (3,6 por 100.000), Alemanha (4,1 por 100.000) e França (3,2 por 100.000), porém maior do que no Japão (1,0 por 100.000) (BRUNNING *et al.*, 2008; SEKERES, 2010). Na Alemanha, dados preliminares revelaram que a prevalência corresponda à 20,7 por 100.000 indivíduos. Estima-se que atualmente existam em torno de 60.000 indivíduos vivendo com a doença somente nos EUA, porém esse dado não corresponde à realidade por causa da deficiência no processo de diagnóstico da doença (SEKERES, 2010).

No Brasil não existem estimativas sobre a incidência da doença. Tal fato pode ser evidenciado ao se analisar a publicação “Estimativas 2010 – Incidência do câncer no Brasil” do Instituto Nacional do Câncer (INCA), o qual se observa não existir nenhuma menção à SMD, e sim apenas de um grande grupo intitulado leucemias.

Recentemente Magalhães *et al.* (2010) realizaram um levantamento clínico-epidemiológico em 12 centros brasileiros e compararam os dados clínicos obtidos entre as diferentes áreas geográficas. Neste estudo, observaram que 476 pacientes com SMD foram diagnosticados entre os períodos de janeiro de 2003 a dezembro de 2007, sendo este um dos primeiros registros desta doença no Brasil.

2.1.2 Patogênese

A fisiopatologia da SMD tem sido muito discutida e referenciada por diversos autores. Do ponto de vista clínico, as manifestações observadas nos pacientes com SMD (citopenias periféricas e hematopoese ineficiente) são consequência de um conjunto heterogêneo de alterações morfofuncionais do tecido hematopoético, como resultado de processos clonais originados na célula hematopoética pluripotente. A maioria dos pacientes apresentam sintomas relacionados com anemia, entretanto, sangramento e infecções são as principais causas relatadas de morte (SCOTT; DEEG, 2010).

Nas SMDs ditas primárias ou *de novo*, a biogênese causal não é bem esclarecida, mas acredita-se que fatores hereditários, fatores ambientais e a própria senescência da hematopoese tenham um papel crucial para o seu desencadeamento (BRUNNING *et al.*, 2008). Pacientes portadores de doenças genéticas como anemia de Fanconi, síndrome de Bloom e síndrome de Diamond-Blackfan possuem uma maior predisposição para desenvolvimento de doenças neoplásicas, devido à instabilidade genômica. Indivíduos

portadores de síndrome de Down e síndrome de Shwachman-Diamond tendem, de forma peculiar, à progredir para SMD/LMA, porém o mecanismo desta progressão ainda é desconhecido. Pacientes portadores de neurofibromatose possuem maior predisposição a desenvolverem SMD devido à ausência do gene *NF1*, um gene supressor tumoral (BARZI; SEKERES, 2010; BRUNNING *et al.*, 2008; MUFTI, 2004; SEKERES, 2010). Exposição ambiental ou ocupacional a agentes como o benzeno e seus derivados (inseticidas, solventes e tintas), tabagismo e radiação ionizante, assim como demonstrado em outras neoplasias, também possuem correlação com o desenvolvimento da doença. (MUFTI, 2004).

As SMD ditas secundárias ou terapia-induzida (SMDt) representam aproximadamente 10% de todos os casos de SMD, e surgem, em média, 4 a 7 anos após a exposição inicial à radiação e aos agentes quimioterápicos utilizados no tratamento de outras malignidades. O surgimento de SMD/LMA terapia-induzida tem sido demonstrado após o tratamento de doença de Hodgkin, linfomas não-Hodgkin, LLA, mieloma múltiplo e cânceres de mama, ovário e testículo. Como exemplo de quimioterápico pode-se citar a ciclofosfamida, um agente alquilante, cuja exposição prévia implica em um alto risco de desenvolvimento de SMD secundária, pois pode causar monossomia dos cromossomos 5 e/ou 7 ou deleções dos seus respectivos braços longos. Para pacientes que fizeram tratamento com inibidores da topoisomerase II, o tempo de latência é menor, sendo mais comumente observado o surgimento de leucemias agudas, que nem sempre são precedidas de mielodisplasia. Nestes casos a alteração mais frequente envolve a região 11q23, *locus* do gene “*Mixed Lineage Leukemia*” (*MLL*) (BARZI; SEKERES, 2010; MUFTI, 2004).

As principais diferenças entre a SMD secundária ao tratamento e a SMD *de novo* são: acometimento em idade mais precoce, maior incidência e propensão de transformação para LMA, citopenias mais severas, displasia medular mais acentuada (acometendo as três linhagens), hipocelularidade medular com presença de fibrose e uma maior taxa de aberrações citogenéticas presentes no clone doente, sendo 80% nas SMDt contra 40-50% nas SMD *de novo*. São os principais achados: -5, -7, 7q-, 13q-, 17p- e 18q-. Alta frequência de mutações no gene *TP53* e instabilidade de microsatélites também são observadas no SMDt. Via de regra, pacientes com SMDt possuem pior prognóstico quando comparados aos pacientes com SMD *de novo* (MUFTI, 2004).

A patogênese da SMD e, posteriormente, sua progressão para LMA é um processo complexo e multivariado que envolve mutações na seqüência do DNA de uma célula hematopoética pluripotente, com conseqüente distúrbios nos processos fisiológicos intracelulares, gerando vantagens proliferativas associadas com displasias morfológicas,

alterações do perfil de citocinas secretadas em decorrência da disfunção celular, hematopoese ineficiente, defeitos na diferenciação celular e instabilidade genômica (MUFTI, 2004).

Outros fatores também podem estar envolvidos nesse processo, um deles e bem evidenciado na literatura é a própria alteração do microambiente medular (estroma), que como demonstrado por Flores-Figueroa *et al.* (2002) existe um aumento importante na produção de citocinas inibitórias como IL-6 e TNF- α , por parte dos fibroblastos e macrófagos, aliado à liberação de agentes angiogênicos como VEGF (fator de crescimento do endotélio vascular) (ROSENFELD; LIST, 2000). Fatores epigenéticos, eventos que alteram a expressão do DNA sem alterar a estrutura do mesmo, como metilação do DNA e deacetilação de histonas, são atualmente reconhecidos como eventos que contribuem para a progressão e resistência quimioterápica da SMD, existindo drogas específicas para reverterem ou minimizarem esses eventos, como por exemplo o 5'-azacitidina e decitabina (COREY *et al.*, 2007).

Um paradoxo na SMD, e que tem chamado a atenção de diversos pesquisadores, é o fato de que a MO desses pacientes, geralmente, apresenta-se com celularidade normal ou às vezes aumentada, enquanto que o que chama a atenção a nível de sangue periférico são as citopenias. Tal achado parece estar diretamente relacionado com um aumento na proliferação das células hematopoéticas e contrabalanceada com aumento simultâneo de apoptose, evento que parece ser mais significativo e evidente nos grupos de baixo risco (COSTA, 2008; GREENBERG, 1998).

A apoptose pode ser desencadeada por inúmeros fatores, mas acredita-se que nestes pacientes ela esteja diretamente relacionada com lesões irreversíveis ao DNA das células precursoras hematopoéticas, causadas principalmente por radiação, agentes quimioterápicos, imunossupressão medular mediada pelo aumento de antígenos indutores da apoptose, Fas/FasL, e do maior número de linfócitos T citotóxicos circulantes. Esses últimos que, além de secretarem citocinas inibitórias como Fator de Necrose Tumoral α (TNF- α) e Fator de Transformação do Crescimento β (TGF- β), também induzem a liberação de perforina e granzima B no citosol das células, ativando a via das caspases e culminando na morte celular programada. Aliada a isso temos a relativa deficiência de sinais induzidos por fatores de crescimento, interleucinas e um desequilíbrio entre proteínas ou genes indutores e/ou supressores da apoptose, parecendo ser estes os principais eventos responsáveis pela hematopoese ineficaz e conseqüente citopenia(s) periférica(s) na mielodisplasia (RIBEIRO, 2005).

2.1.3 Classificação

Foi o grupo Francês-Americano-Inglês (FAB) quem criou a primeira classificação sistemática para a SMD, baseada em critérios morfológicos. A classificação FAB original incluía dois subtipos, denominados de anemia refratária com excesso de blastos (AREB) e leucemia mielomonocítica crônica (LMMC) (BENNETT *et al.*, 1982).

Em 1985 foi publicada uma revisão desta classificação. Ela foi baseada principalmente na experiência acumulada com um grande número de casos revisados e as diferentes apresentações, os quais tinham a displasia como uma característica em comum, porém com desfechos clínicos diferentes. Esta revisão incluía agora cinco subtipos distintos: anemia refratária (AR), anemia refratária com sideroblastos em anel (ARSA), anemia refratária com excesso de blastos (AREB), anemia refratária com excesso de blastos em transformação (AREB-t) e leucemia mielomonocítica crônica (LMMC). Nesta revisão dois grupos de riscos podiam ser facilmente observados: grupo de baixo risco (AR e ARSA) e o grupo de alto risco (AREB e AREB-t) com média de sobrevida variando entre 5 e 6 anos para o baixo risco e menos de um ano para o alto risco. A tabela 1 apresenta a classificação FAB (BENNETT *et al.*, 1985).

Tabela 1 – Classificação das Mielodisplasias Segundo o Grupo FAB

Tipo	Sangue Periférico	Medula Óssea
Anemia Refratária (AR)	Blastos \leq 1%	Blastos < 5%
Anemia Refratária com Sideroblastos em Anel (ARSA)	Blastos \leq 1%	Blastos < 5% Sideroblastos em Anel \geq 15%
Anemia Refratária com Excesso de Blastos (AREB)	Blastos < 5%	Blastos 5 – 20%
Anemia Refratária com Excesso de Blastos em Transformação (AREB-t)	Blastos \geq 5%	Blastos 21-30% Bastonetes de Auer
Leucemia Mielomonocítica Crônica (LMMC)	Blastos < 5% Monócitos >1.000/ μ l	Blastos < 20%

Fonte: Adaptado de Bennett *et al.* (1982)

Entretanto, esta classificação detinha diversas limitações, entre elas a de não atender para a importância entre a displasia em uma única linhagem ou displasia multilínea, não levar em consideração os achados citogenéticos, o tipo AREB-t representar uma área conflitante entre SMD e LMA, e o comportamento e desfecho nos casos de LMMC não serem melhores caracterizados (KOMROKJI; ZHANG; BENNETT, 2010).

Em 2001, levando em consideração todos esses aspectos, o comitê da Organização Mundial de Saúde (OMS) para classificação das neoplasias do tecido linfóide e hematopoético propôs uma modificação na classificação FAB, com o intuito de endereçar algumas limitações e tornar as subcategorias mais homogêneas. Deste modo, os subgrupos AR e ARSA foram redefinidos com o objetivo de englobar casos com fatores displásicos somente na linhagem eritróide, e duas novas categorias surgiram: citopenia refratária com displasia em múltiplas linhagens (CRDM) com ou sem sideroblastos em anel. A mesma classificação ainda dividia a categoria AREB em dois novos subgrupos AREB-I e AREB-II, baseando-se no percentual de blastos encontrados na MO, 5-9% e 10-19%, respectivamente (HARRIS *et al.*, 1999).

A classificação passou a contar com um novo subgrupo isolado constituído por pacientes que possuíam menos de 5% de blastos na MO e alteração citogenética isolada de deleção do braço longo do cromossomo 5. As SMDs não classificadas são caracterizadas por displasia mielóide em uma única linhagem ou sem displasia mais com citogenética

característica e < 5% de blastos na MO. A AREB-t, segundo os critérios da OMS, foi incluída na classificação das LMAs devido à similaridade entre as funções biológicas e estratégias de tratamento. A tabela 2 apresenta a classificação da OMS. (BRUNNING *et al.*, 2008; COREY *et al.*, 2007).

Tabela 2 - Classificação das Mielodisplasias Segundo o Comitê da OMS

Tipo	Sangue Periférico	Medula Óssea
Anemia Refratária (AR)	Anemia; Blastos Raros ou Ausentes	Displasia Eritróide \geq 10% < 5% de Blastos
Anemia Refratária com Sideroblastos em Anel (ARSA)	Anemia	Displasia Eritróide < 5% de Blastos < 15% de Sideroblastos em Anel
Citopenia Refratária com displasias em multilinhagens (CRDM)	Bi ou pancitopenia; Blastos < 1%L	Displasia em duas ou mais linhagens \geq 10% < 5% de Blastos
Anemia Refratária com Excesso de Blastos (AREB-I)	Bi ou pancitopenia; Blastos < 5% Monócitos < $1 \times 10^9/L$	Displasia em 1-3 linhagens; 5 - 9% de Blastos
Anemia Refratária com Excesso de Blastos (AREB-II)	Bi ou pancitopenia; Blastos 5 - 19% Monócitos < $1 \times 10^9/L$	Displasia em 1-3 linhagens; 10 - 19% de Blastos
Síndromes Mielodisplásicas não Classificadas	Citopenias blastos raros Ou ausentes;	Displasia unilinhagem; Blastos < 5%
SMD associada à deleção do 5q	Anemia; < 5% de blastos; Plaquetas aumentadas	Megacariócitos normais ou aumentados; Blastos < 5%; del 5q isolada

Fonte: Harris *et al.* (1999).

2.1.4 Estratificação de risco

A heterogeneidade clínica das SMDs é melhor representada pela observação de que estas doenças variam desde condições indolentes, com a expectativa de vida próxima ao

esperado para a faixa etária, até formas que se aproximam de condições semelhantes à LMA. A estratégia de tratamento risco-aceitável é mandatória para as condições apresentando uma alta variação do curso clínico, e a definição do risco individual tem sido baseada no uso de modelos de estratificação de risco (CAZZOLA; MALCOVATI, 2010).

Inúmeros modelos de estratificação de risco para SMD existem, cada qual com suas próprias vantagens e desvantagens, porém todos costumam ser utilizados para guiar a terapia, uma vez que as classificações FAB e OMS, embora tragam informações sobre prognóstico, não costumam ser utilizados para traçarem estratégias de tratamento. (COREY *et al.*, 2007).

2.1.4.1 IPSS

O Sistema internacional de escore prognóstico (IPSS) foi desenvolvido por Greenberg *et al.* (1997), sendo o modelo de prognóstico e o sistema de escore baseados no percentual de blastos na MO, anormalidades citogenéticas e número de citopenias. Os dados foram coletados a partir de uma análise multivariada das características hematológicas de 816 pacientes, dos quais idade, sexo, citogenética, citopenia e percentual de blastos foram as únicas variáveis de prognóstico significantes. Baseado na soma dos escores, os pacientes foram divididos em quatro grupos como mostra a tabela 3. (GREENBERG *et al.*, 1997).

O IPSS é o sistema de estratificação de risco mais difundido e utilizado por clínicos como guia de tratamento e escolha da terapia, tendo sido validado em inúmeros estudos. Entre as principais desvantagens deste sistema destacam-se a exclusão de pacientes com SMD secundária, impossibilidade de ser utilizado em outros pontos que não o momento diagnóstico e não levar em consideração a displasia multilínea ou o grau de citopenia. (KOMROKJI; ZHANG; BENNETT, 2010; MUFTI, 2004).

Tabela 3 – Sistema Internacional de Escore Prognóstico (IPSS)

Variável Prognóstica	Valor Escore ^a				
	0	0.5	1.0	1.5	2.0
% de Blastos na MO	<5	5 - 10	-	11 - 20	21 - 30
Cariótipo ^b	Favorável	Intermediário	Desfavorável		
Citopenias	0/1	2/3			

^aGrupos de Risco de acordo com Escore: Baixo risco, 0; Risco Intermediário-1, 0.5 – 1.0; Risco Intermediário-2, 1.5 – 2.0; Alto Risco, ≥ 2.5 .

^bFavorável: normal, -Y, del(5q), del(20q); Desfavorável: complexo (≥ 3 aberrações) ou aberrações do chromosome 7; Intermediário: outras aberrações.

Fonte: Greenberg *et al.* (1997).

2.1.4.2 WPSS

Mais adiante, cientistas observaram que a carga transfusional e os altos níveis de ferritina possuíam correlação direta com sobrevida inferior em pacientes com SMD. Diante dessas observações, foi desenvolvido um novo sistema de prognóstico que incorporava, juntamente com a classificação OMS, a dependência transfusional e o status da citogenética do IPSS, sistema esse chamado de WPSS (sistema de escore prognóstico baseado na classificação OMS). Entretanto, assim como no IPSS, os pacientes com SMD secundária ao tratamento foram excluídos. A principal vantagem deste sistema consistem na possibilidade de ser utilizado em qualquer momento durante o curso da doença (MALCOVATI *et al.*, 2005).

Um novo modelo que contempla a importância da citometria de fluxo vem sendo validado, o FCSS “Flow Cytometry Scoring System”. A relevância das informações obtidas pela citometria de fluxo podem servir de grande valia tanto para o diagnóstico quanto para prognóstico, particularmente em pacientes com evidência mínima de displasia na MO (SCOTT; DEEG, 2010).

Tabela 4 - Sistema de Escore Prognóstico Baseado na Classificação OMS^a (WPSS)

Variáveis	0	1	2	3
Classificação OMS	AR, ARSA,5q-	CRDM, CRDM- SA	AREB-1	AREB-2
Cariótipo^b	Favorável	Intermediário	Desfavorável	-
Dependência Transfusional^c	Não	Regular	-	-

^aGrupos de acordo com escore: Risco Muito Baixo (escore = 0), Baixo Risco (escore = 1), Risco Intermediário (escore = 2), Alto Risco (escore = 3 e 4) e Risco Muito Alto (escore = 5 e 6).

^bCariótipo: Favorável: normal, -Y, del(5q), del(20q); Desfavorável: complexo (≥ 3 aberrações) ou aberrações do cromossomo 7; Intermediário: outras aberrações.

^cDependência Transfusional foi definida como a necessidade de pelo menos uma transfusão a cada 8 semanas durante um período de 4 meses.

Fonte: Malcovatti *et. al.* (2005).

2.2 Citogenética

A citogenética constitui uma ciência que estuda e analisa os cromossomos humanos com o intuito de identificar possíveis alterações numéricas (ganho e perda de cromossomos) e/ou estruturais (translocações, inversões, deleções, dentre outras) a fim de diagnosticar e/ou determinar o prognóstico de diversas condições patológicas. A figura 1 demonstra a organização do cromossomos em um cariótipo clássico (sem bandeamento), onde, por convenção, a organização dos cromossomos leva em consideração o tamanho e a posição do centrômero de cada um dos 23 pares isoladamente.

Historicamente, os reais discernimentos dentro das bases genéticas do câncer datam das décadas de 50 e 60 onde, através da implementação das técnicas de cultura celular e melhorias na preparação de lâminas, foi possível ultrapassar o primeiro grande obstáculo que era determinar como sendo 46 (23 pares) o número correto de cromossomos presente nas células humanas. Posteriormente, Nowell e Hungeford relataram em 1960 a primeira anormalidade cromossômica específica presente em um tumor humano, que consistia na presença de um cromossomo pequeno observado em células leucêmicas de pacientes com Leucemia Mielóide Crônica (LMC). Este pequeno cromossomo foi denominado de cromossomo “Filadelfia” (Ph), em homenagem a cidade de sua descoberta. A evidência do cromossomo Ph gerou um grande interesse em se tratando de citogenética do câncer por se tratar da primeira evidência direta de alteração do DNA em tumores. Até o momento mais

30.000 casos de malignidades hematológicas com aberrações cromossômicas tem sido reportadas (NAEIM; RAO; GRODY, 2008).

O segundo grande obstáculo para a citogenética foi o desenvolvimento de técnicas apropriadas de coloração para análise microscópica que permitissem a análise individual e de toda a extensão dos cromossomos. A partir dessa necessidade a citogenética pôde ser dividida em três eras distintas, a saber: citogenética clássica, convencional e a molecular. A citogenética clássica, apesar de ultrapassada, ainda pode ser encontrada em alguns laboratórios, primeiro por ser uma técnica de fácil e rápida reprodutibilidade e segundo por possuir baixo custo de implantação. Porém, a grande desvantagem consiste em não poder avaliar as alterações cromossômicas estruturais, ficando limitado a contagem numéricas dos cromossomos metafásicos (NAEIM; RAO; GRODY, 2008).

A era da citogenética convencional iniciou com o advento de novas técnicas de coloração, o que permitiu a criação dos chamados padrões de “banda”. A técnica de bandeamento mais utilizada e difundida em todo o mundo é aquela que utiliza como corante os derivados do Giemsa, também conhecida como Bandeamento-G, ou simplesmente Banda G. Este tipo de coloração cria um padrão de bandas claras e escuras em toda a extensão do cromossomo que é individualmente distinta em cada um dos 23 pares, podendo assim ser distinguidos e evidenciadas não somente alterações numéricas como também alterações estruturais. Outros padrões não tão disseminados, porém não menos importante, são as Bandas R (reversa), Banda Q (quinacrina), Banda C (centromérica) e Banda Nor’s (regiões organizadoras de nucléolos). A figura 02 apresenta um cariótipo do sexo masculino com padrão de Bandas G.

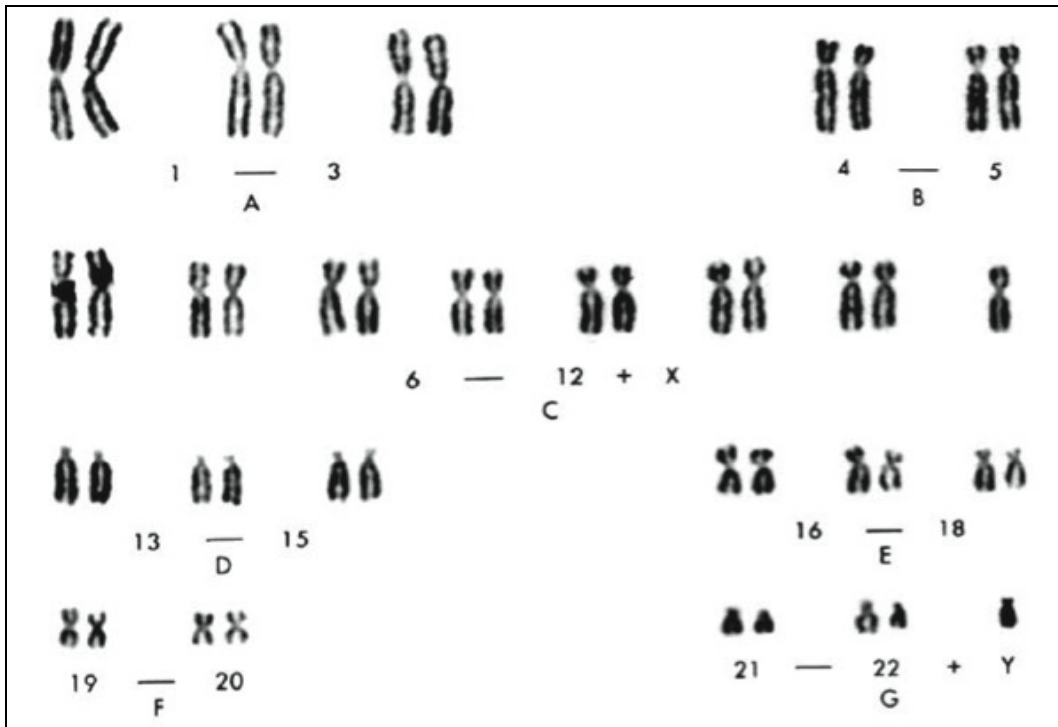


Figura 1 - Cariótipo clássico do sexo masculino

Fonte: Gersen e Keagle (2005).

Com a superação destes obstáculos e o aprimoramento das técnicas utilizadas a citogenética humana evoluiu, e com esta evolução diversas condições patológicas foram sendo descobertas e posteriormente relacionadas com alterações cromossômicas distintas, dentre elas as primeiras reconhecidas foram as síndromes de Down, Patau e Edwards, com as trissomias dos cromossomos 21, 13 e 18, respectivamente. Atualmente, existem inúmeras síndromes genéticas relacionadas com anormalidades numéricas e/ou estruturais tanto dos cromossomos autossômicos quanto dos sexuais. Mais adiante, a citogenética também se tornou peça chave em se tratando das doenças neoplásicas, uma vez que estes tumores possuíam alterações genéticas importantes em genes específicos que estão intrinsecamente relacionados com o desenvolvimento clonal.

As anormalidades cromossômicas clonais são observadas em aproximadamente 50% de todos os casos de SMD, estando, em alguns casos, relacionadas com achados clínicos e morfológicos. A SMD associada com $del(5q)$ ocorre primariamente em mulheres e é caracterizada por megacariócitos hipo ou mono-lobulados, anemia macrocítica refratária, contagem de plaquetas normal ou aumentada e curso clínico favorável, sendo assim reconhecida como um tipo específico na classificação OMS (BRUNNING *et al.*, 2008).

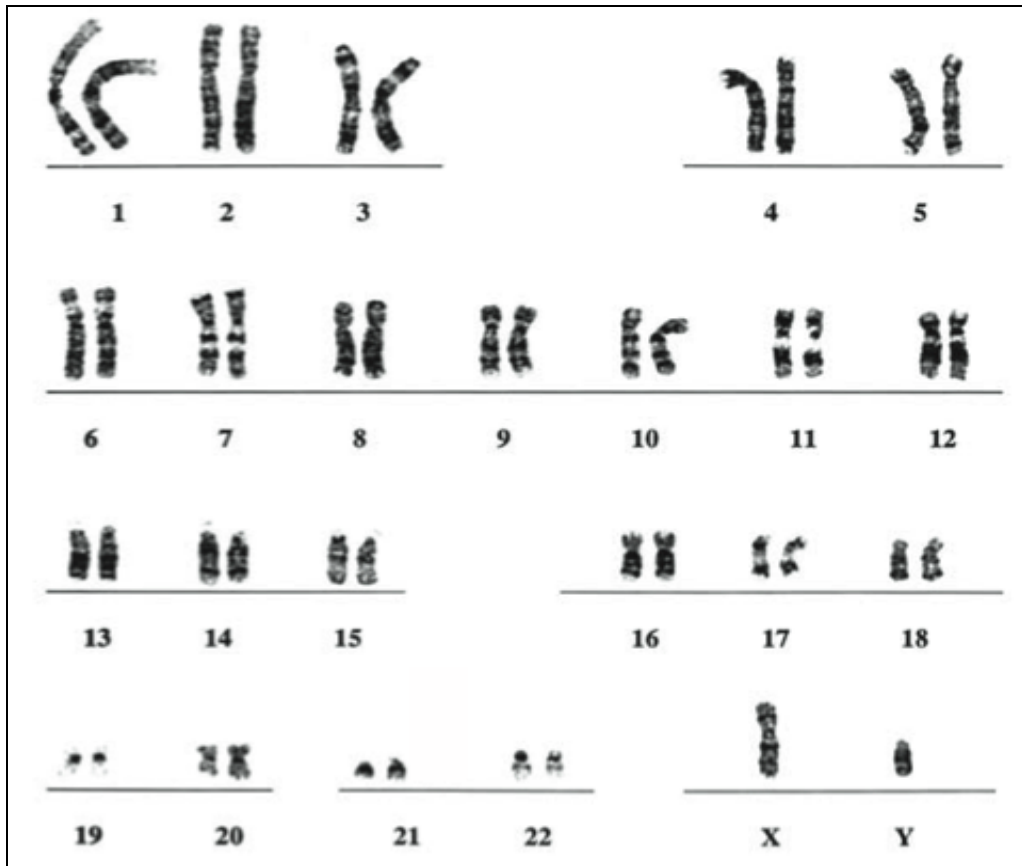


Figura 2 - Cariótipo com Banda G do sexo masculino
 Fonte: Gersen e Keagle (2005).

Outro achado importante é aquele evidenciado em pacientes com perda do 17p, que apresentam SMD ou LMA com anomalia de pseudo Pelger-Huët, mutações no gene *TP53* e curso clínico desfavorável, sendo muito comumente encontradas em pacientes com SMD secundária. Cariótipos complexos (≥ 3 anormalidades) geralmente incluem alterações no cromossomo 5 e/ou 7, estando também associados com curso clínico desfavorável. Outros diversos achados citogenéticos parecem estar associados com alterações morfológicas específicas, um deles é a deleção do braço longo do cromossomo 20 o qual apresenta alterações envolvendo os setores eritróide e megacariocítico. As figuras 3 e 4 apresentam cariótipos com trissomia do cromossomo 8 e monossomia do cromossomo 7, respectivamente. A tabela 5 demonstra as principais alterações citogenéticas encontradas na SMD e suas respectivas frequências (BRUNNING *et al.*, 2008).

Tabela 5 - Alterações citogenéticas recorrentes e suas frequências

Anormalidade	Frequência na SMD	Frequência na SMD-s
Alterações não balanceadas		
+8*	10%	
-7 ou del(7q)	10%	50%
-5 ou del(5q)	10%	40%
del(20q)*	5-8%	
-Y*	5%	
i(17q) ou t(17p)	3-5%	
-13 ou del(13q)	3%	
del(11q)	3%	
del(12p) ou t(12p)	3%	
del(9q)	1-2%	
idic(X)(q13)	1-2%	
Alterações balanceadas		
t(11;16)(q23;p13.3)		3%
t(3;21)((q26.2;q22.1)		2%
t(1;3)(p36.3;q21.2)	1%	
t(2;11)(p21;q23)	1%	
inv(3)(q21q26.2)	1%	
t(6;9)(p23;q34)	1%	
* A presença destas alterações como anormalidades isoladas na ausência de critérios morfológicos não deve ser considerada evidência definitiva para SMD.		

Fonte: Brunning *et al.* (2008).

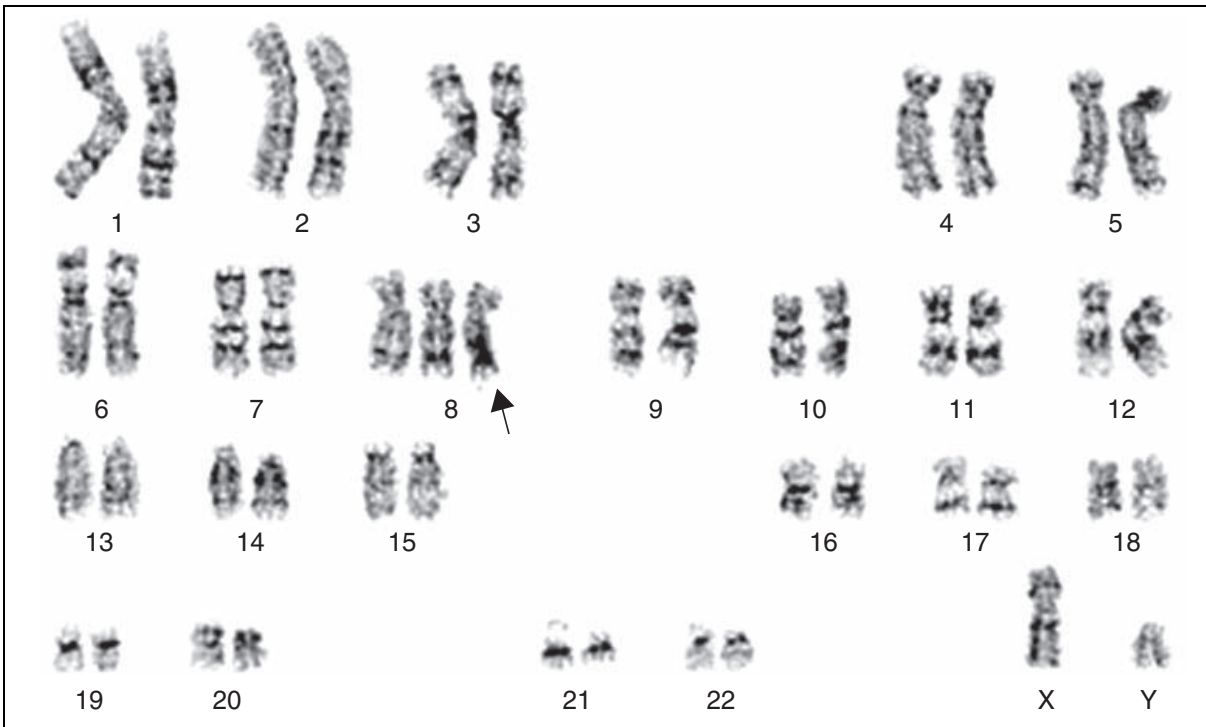


Figura 3 - Cariótipo do sexo masculino apresentando trissomia do cromossomo 8
 Fonte: Naeim, Rao e Grody (2008).

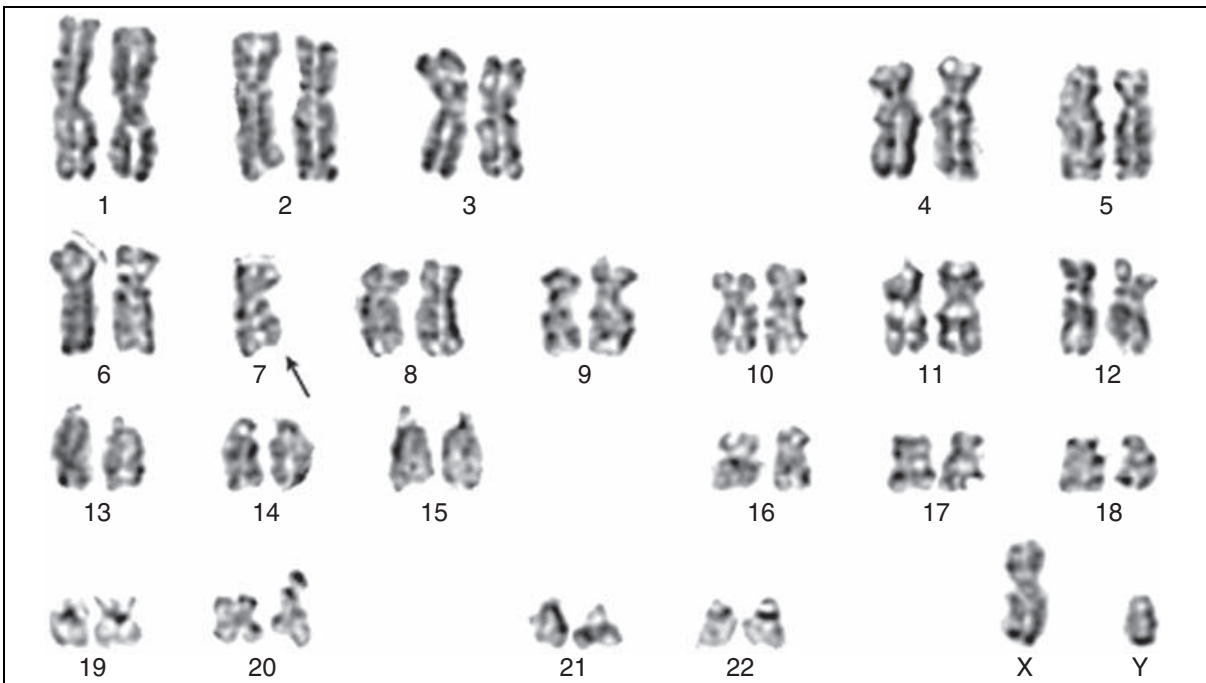


Figura 4 - Cariótipo do sexo masculino apresentando monossomia do cromossomo 7
 Fonte: Naeim, Rao e Grody (2008).

2.3 FISH (Hibridização *In Situ* por Fluorescência)

A hibridização *In Situ* de sequências específicas de DNA para alvos celulares foi desenvolvida há mais de 20 anos. As técnicas iniciais empregavam “probes” (sondas) marcadas isotopicamente e subsequentemente detectadas por autoradiografia usando emulsões fotográficas sobre os cromossomos metafásicos, núcleos ou toda a célula. Entretanto, a autoradiografia requeria longos períodos de exposição, o que a tornava impraticável como aplicação clínica. No final dos anos 70, métodos não isotônicos de marcação de ácidos nucleicos foram desenvolvidos, os quais foram acompanhados pelo aprimoramento das técnicas de detecção utilizando métodos de imunohistoquímica e imunofluorescência e avanços na microscopia de fluorescência e análise de imagens, esse conjunto de melhorias tornou a técnica rápida, segura e de confiança. Nos últimos anos a hibridização *In Situ* por fluorescência emergiu como uma importante ferramenta para pesquisa e aplicação clínica, tendo sido aperfeiçoada ao longo dos anos (SANDBERG; CHEN, 2001). A figura 5 apresenta um resumo dos passos básicos da técnica.

De modo geral todos os 4 tipos de sondas disponíveis baseiam-se na capacidade de hibridização de sondas de DNA marcadas com fluorocromos às sequências que lhes são complementares ao DNA genômico, seja em núcleos interfásicos ou em preparado de cromossomos metafásicos, permitindo que estas sequências sejam visualizadas e analisadas através da liberação de fluorescência e detectadas por microscópio de epifluorescência. Uma característica importante dessas sondas é que elas são altamente específicas para suas regiões alvos, sendo mínimas as chances de ligação em outro *locus* que não o seu complementar. Elas podem ser classificadas em sondas específicas para um determinado gene, as que identificam sequências repetitivas, sondas subteloméricas e as sondas de “pintura” cromossômica (WCP) (FREITAS, 2004).

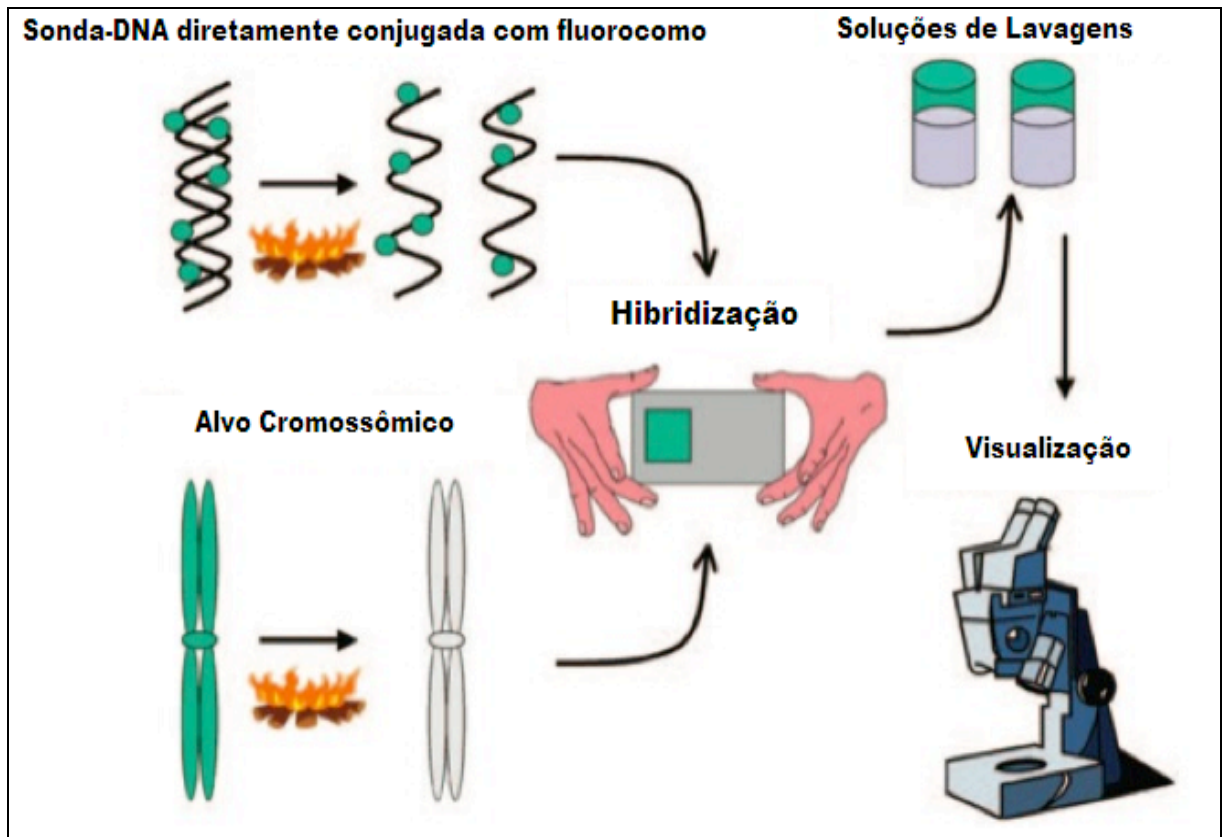


Figura 5 - Representação esquemática dos passos básicos da técnica de FISH

Fonte: Gersen e Keagle (2005).

As primeiras são extremamente úteis na detecção do número de cópias cromossômicas em núcleos interfásicos (figuras 6 e 7). As sondas subteloméricas por sua vez, são frequentemente usadas para a identificação de rearranjos cromossômicos sutis ou submicroscópicas, cromossomos marcadores e deleções subteloméricas (figura 8). Por último temos as chamadas WCP “Whole-chromosome painting” ou sondas de “pintura”, como o próprio nome diz, são sondas de alta afinidade que se ligam especificamente ao cromossomo em toda sua extensão, com exceção das regiões centroméricas e teloméricas. Elas são úteis para identificação de desequilíbrio genômico em cromossomos metafásicos, especialmente no reconhecimento de rearranjo complexos observados em muitas neoplasias, além de permitir a identificação de cromossomo marcadores (Figura 9) (NAEIM; RAO; GRODY, 2008).

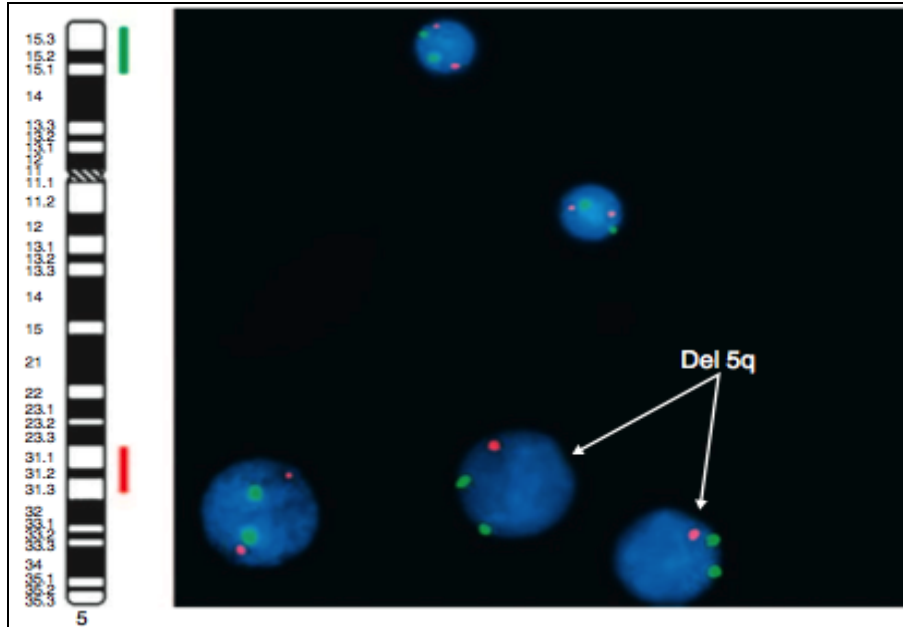


Figura 6 - Deleção do 5q detectada por FISH utilizando sonda gene específica
 Fonte: Naeim, Rao e Grody (2008).

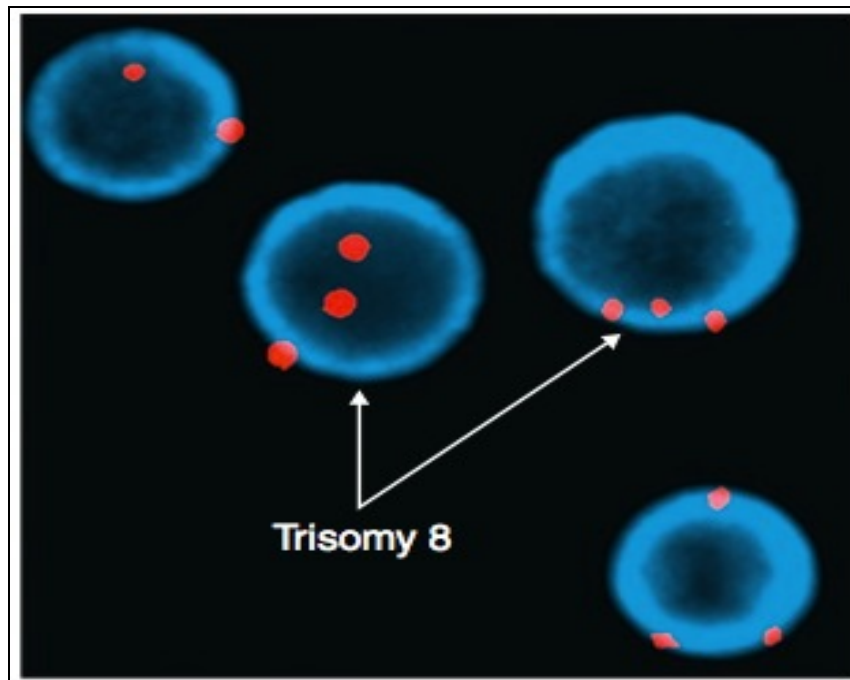


Figura 7 - Trissomia do 8 detectada por FISH utilizando sonda centromérica
 Fonte: Naeim, Rao e Grody (2008).

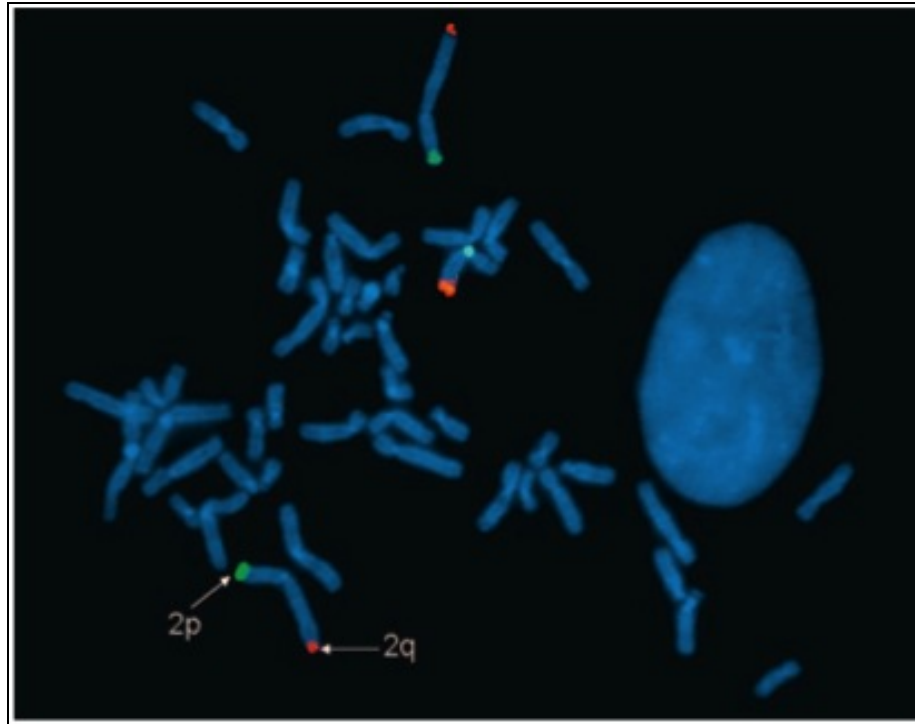


Figura 8 - Detecção do cromossomo 2 e Xp por FISH utilizando sonda subtelomérica
Fonte: Naeim, Rao e Grody (2008).

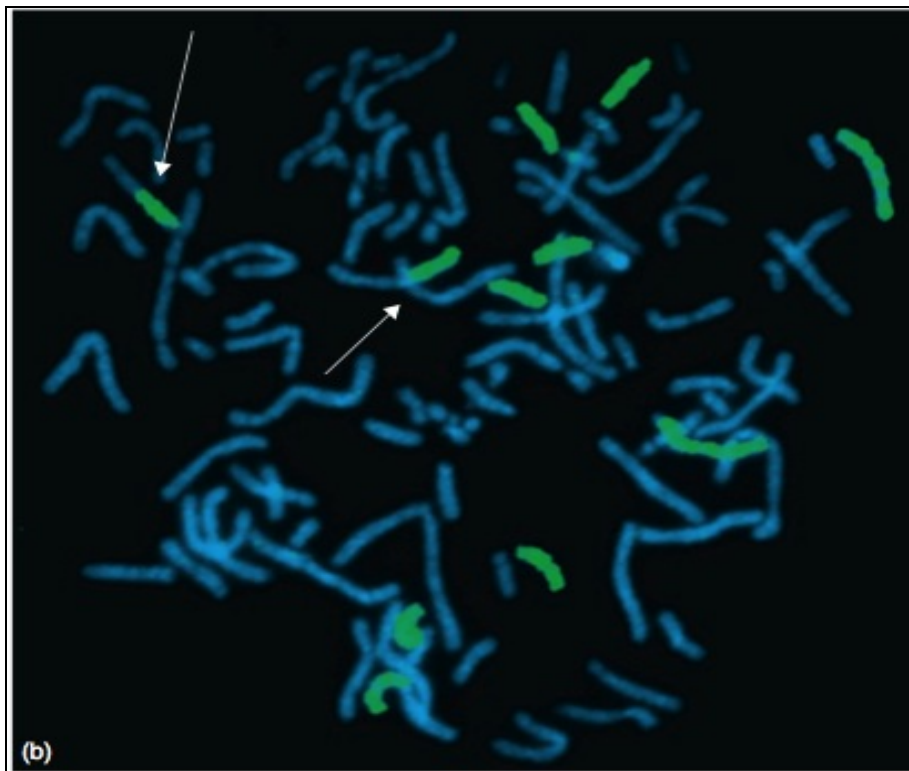


Figura 9 - Detecção do cromossomo 7 por FISH utilizando sonda WCP
Fonte: Naeim, Rao e Grody (2008).

Tanto a citogenética convencional como a citogenética molecular (FISH) possuem vantagens e desvantagens como pode ser evidenciado nas tabelas 6 e 7, quando e como utilizar esta e/ou aquela técnica ficará a cargo do citogeneticista e do laboratório de apoio, que deverão criar protocolos específicos para as diversas aplicações clínicas que se deseja investigar, tendo em vista sempre almejar o diagnóstico preciso e fidedigno, mesmo que isto ultrapasse a barreira custo-benefício.

Tabela 6 - Vantagens e desvantagens da citogenética convencional

Vantagens	Desvantagens
- Análise de todo o cariótipo;	- Requer tecido fresco;
- Possibilidade de detecção de rearranjos complexos;	- Translocações balanceadas;
- Achados inesperados;	- Laborioso e requer habilidade técnica;
- Permite a avaliação de todo o genoma, sendo útil para análise direta;	- Demanda tempo;
- Baixo custo quando comparada com técnicas moleculares;	- Tecnicamente difícil, especialmente na presença de múltiplas linhagens celulares;
	- Não detecta eventos crípticos;
	- Passível de erros por falha na cultura ou baixo índice mitótico;

Fonte: Adaptado de Wojciech (2008).

Tabela 7 - Vantagens e desvantagens da técnica de FISH

Vantagens	Desvantagens
<ul style="list-style-type: none"> - Não requer células mitoticamente ativas, aberrações no genoma podem ser avaliadas em células em divisão ou não; - Na maioria dos casos não requer cultura; - Permite o monitoramento da doença; - Pode ser realizados em tecido fixados ou parafinizados; - Técnica rápida quando comparada a citogenética convencional; - Alta especificidade e eficiência; - Mais sensível do que citogenética convencional e CGH (Comparative Genomic Hybridization); - Permite correlacionar com a morfologia; - Pode detectar alterações crípticas. 	<ul style="list-style-type: none"> - Não é um teste para “screening” (requer que seja identificada a região de análise, baseado nos dados clínicos, características morfológicas, e/ou achados na citogenética convencional); - Requer sondas específicas; - Baixa resolução de algumas sondas; - Menos sensível do que os ensaios baseados em PCR; - Aneuploidia tumoral pode resultar em contagens de sinais inapropriados;

Fonte: Adaptado de Wojciech (2008).

2.4 Gene *TP53*

O câncer caracteriza-se por ser uma doença genética resultante de um progressivo acúmulo de alterações em diversos genes importantes que coordenam minuciosamente diversos processos fisiológicos relacionados com a proliferação celular, apoptose, angiogênese e expressão de moléculas de adesão (HALL, 1997; ZUKERMAN *et al.*, 2009). As células, de um modo geral, passam a maior parte da sua vida em intérfase, que é um período de intensa atividade biosintética, onde praticamente dobram de tamanho e duplicam seu material genético. A divisão celular é o desfecho final deste delicado processo e é decorrente de uma alteração básica, e microscopicamente visível, que ocorreu a nível molecular durante a intérfase (ZUKERMAN *et al.*, 2009).

A regulação da divisão celular como um dispositivo bioquímico cíclico, é controlado por inúmeras proteínas que interagem entre si coordenando os processos responsáveis pela duplicação e divisão (MORON, 2009; NURSE, 2000; PERDIGÃO;

TAVARES, 2001). Este arcabouço protéico exerce controle através de sua ativação funcional em pontos estratégicos do ciclo. Basicamente, este sistema é constituído por dois componentes principais: as ciclinas e as quinases dependentes de ciclinas (CDK), tendo sido a primeira ciclina descoberta em 1980 por Hunt. As ciclinas são proteínas formadas durante cada ciclo celular e se ligam às CDKs promovendo sua regulação a fim de selecionar as proteínas que serão fosforiladas, processo esse que conduz a célula de uma fase do ciclo para a seguinte. Em mamíferos existem pelo menos nove CDKs identificadas e já foram descritas mais de 16 ciclinas (MORON, 2009).

Via de regra, os mecanismos de controle devem assegurar a integridade da informação genética e monitorar o fim de todos os eventos que ocorrem em cada fase, para que somente assim esta possa seguir para a próxima fase do ciclo. Para isto, pontos de checagem ou “checkpoints”, termo introduzido por Hartwell e Weinert em 1989, como o sítio de restrição (R), no final da fase G1, e o da interface G2/M, estão estrategicamente localizados no ciclo com o intuito de verificar a integridade do DNA e impedir a progressão e propagação de células mutadas ou danificadas, respectivamente (HSEIH, 2008). Esses sistemas são muito sensíveis de maneira que uma única alteração pontual no DNA já é suficiente para bloquear o processo e ativar o sistema de reparo que, na vigência da impossibilidade de reverter o dano, conduz a célula para a morte celular programada ou senescência (ROMER, *et al.*, 2006; ZUKERMAN *et al.*, 2009). Um dos pontos de checagem mais estudados em inúmeras pesquisas relacionadas com diversos tipos de câncer é aquele localizado na fase G1, bem como o gene que medeia o seu bloqueio, o gene supressor tumoral *TP53*. A figura a seguir mostra um resumo das principais ciclinas e CDKs presentes no ciclo celular.

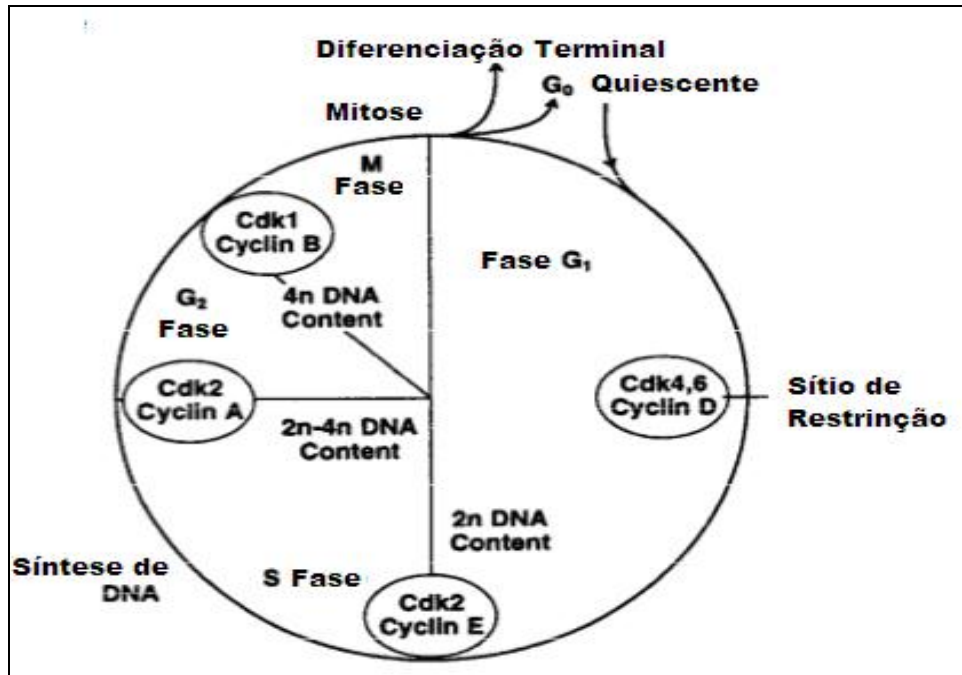


Figura 10 - Ciclo celular
 Fonte: Adaptado de Schafer (1998).

O primeiro relato do gene *TP53* data de 1979, que devido sua semelhança química com outros indutores de tumor e sua associação com o *Simian virus* (Sv40), foi tido inicialmente como um provável oncogene pela comunidade científica da época, sendo mais tarde reconhecido como um gene supressor tumoral e recebendo o título de “guardião do genoma” (ARRUDA, 2004; MAY; MAY, 1999). O gene *TP53* possui aproximadamente 20kb de tamanho e está localizado no braço curto do cromossomo 17, mais especificamente na região 17p13.3 (ARRUDA, 2004; WOO *et al.*, 1998), sendo constituído por 11 éxons que codificam 393 aminoácidos, formando a proteína p53 (p53), de 53 kilodáltons. Esta fosfoproteína nuclear funciona como um fator de transcrição de sequência específica que está diretamente relacionado com a regulação do ciclo celular, indução da morte celular programada, reparo do DNA, senescência e, atualmente, tem papel fundamental também sobre o metabolismo energético, através da regulação da respiração mitocondrial. (ALARCON-VARGAS; RONAI, 2002; ARRUDA, 2004; BENSaad; VOUSDEN, 2007; CHEUNG; VOUSDEN, 2010; ROMER *et al.*, 2006; ZHANG; QIN; WANG, 2010).

Analisando a estrutura molecular deste fator de transcrição oligomérico de 393 aminoácidos pode-se observar que a mesma está organizada em 4 regiões estruturais e funcionais. Estas regiões incluem: um domínio transcricional amino-terminal (NTD), que consiste em uma região de ativação transcricional (resíduos de 1-42) e uma região reguladora

rica em prolina (resíduos de 60-97); um domínio de seqüência específica de ligação ao DNA (DBD) (resíduos de 102-292) também conhecido como domínio “core”; um domínio de tetramerização (TD) (resíduos de 323-356) seguido por um domínio de regulação do processo de ligação ao DNA conhecido como domínio regulatório C-terminal (RD) (resíduos de 360-393) (HAINAULT; HOLLSTEIN, 2000; ROMER, *et al.*, 2006). A grande maioria das mutações da proteína p53 estão localizadas no domínio de ligação ao DNA. A estrutura molecular da proteína pode ser observada na figura 11.



Figura 11 - Organização estrutural da proteína p53

Fonte: Adaptado de Joerger e Fersht (2008).

A proteína p53 em sua forma inativa se localiza no citoplasma em baixas concentrações onde possui uma meia vida curta em torno de 20 a 30 minutos. Diversos mecanismos são necessários para controlar e manter os níveis de p53, entre eles os mais importantes são as interações com as quinases, as moléculas chaperones e o antagonista funcional Mdm2 “Murine double minute”, contudo, apesar destas interações as propriedades estruturais intrínsecas da molécula são decisivas tanto para sua atividade quanto para sua estabilidade (BALLESTEROS CASTAÑEDA *et al.*, 2007; JOERGER; FERSHT, 2008; ROMER, *et al.*, 2006).

Quando as células são submetidas à situações que acarretam stress como exposição à radiação ionizante, radiação UV, hipóxia dentre outros fatores, ocorre a sinalização intracelular com conseqüente conversão do seu estado inativo em estado funcional. Estes estímulos provocam um aumento na sua concentração citoplasmática, resultante tanto pelo aumento da estabilidade como por sua ativação através dos mecanismos

bioquímicos como fosforilações e glicosilações, inibição do processo de ubiquitinalização (via de degradação da p53), sumolização (SUMO1 – “Small Ubiquitin-related Modifier 1”) e perda de bloqueio pelo Mdm2. O proto-oncogene *Mdm2* codifica uma proteína de 491 aminoácidos que regula a atividade da p53 por interação física direta e indução de sua degradação através da via de ubiquitinalização (BALLESTEROS CASTAÑEDA *et al.*, 2007; JOERGER; FERSHT, 2008; ROMER, *et al.*, 2006).

Estes eventos permitem que a proteína p53 funcional atue como um fator de transcrição e se ligue ao DNA em regiões determinada por sequências de bases específicas. A duração e a cinética de aumento dos níveis da proteína estão diretamente relacionados com o estímulo que induziram a ativação do gene *TP53*, e dos genes que transcricionalmente tenham sido regulados pela proteína p53 (BALLESTEROS CASTAÑEDA *et al.*, 2007; ZUKERMAN *et al.*, 2009). A Figura 12 demonstra a rede regulatória mediada pela proteína p53 funcional.

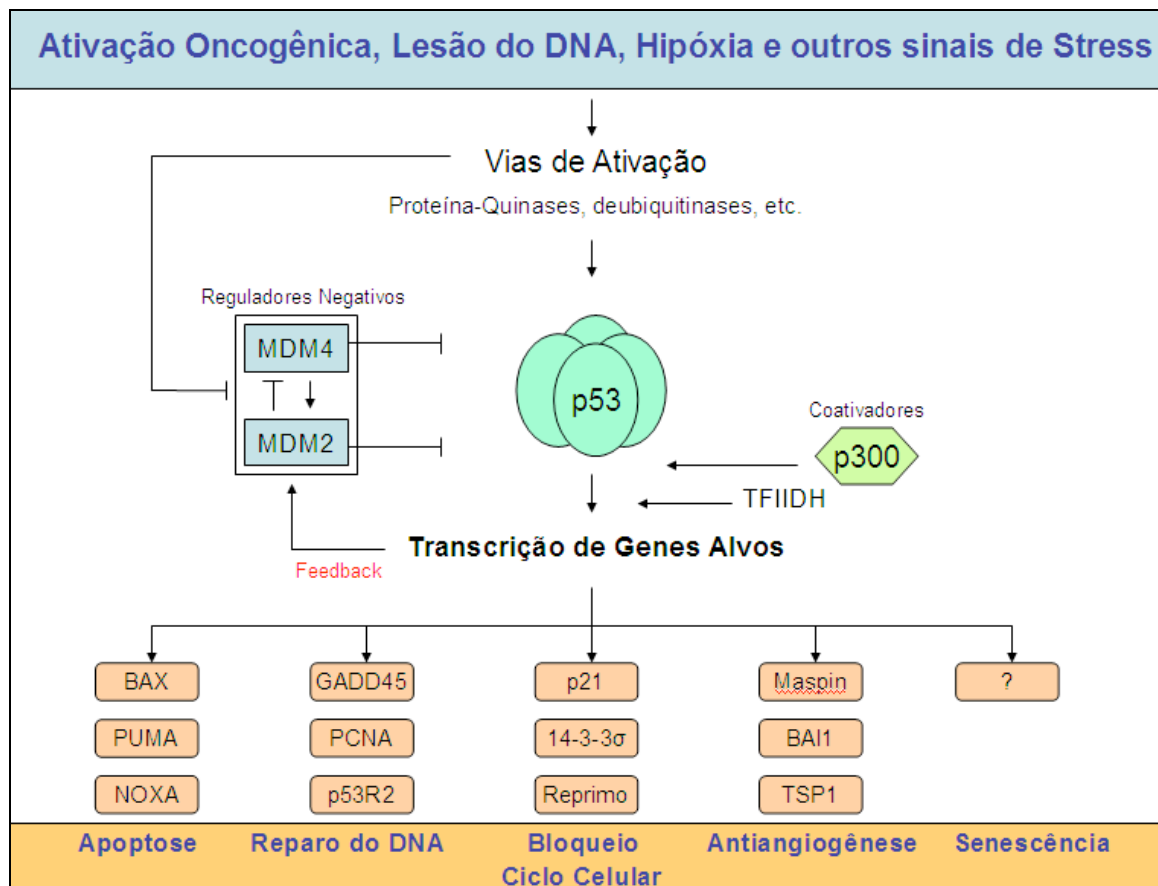


Figura 12 - Rede regulatória mediada pela proteína p53

Fonte: Adaptado de Joerger e Fersht (2008).

Desde meados dos anos 90 está bem estabelecido que, a ação moduladora sobre genes alvos mediada pela proteína p53 frente a danos do DNA facilita o bloqueio do ciclo celular e permite a atuação da maquinaria responsável pelo reparo, e adiante pode também conduzir a célula à apoptose quando este reparo não for viável. Recentes estudos também demonstraram que a participação do gene *TP53* não está limitada somente aos processos acima citados, mas também se estende ao processo de senescência e também na regulação da respiração aeróbica mitocondrial e metabolismo da glicose (BALLESTEROS CASTAÑEDA *et al.*, 2007; BENSaad; VOUSDEN, 2007; CHEUNG; VOUSDEN, 2010; ZHANG; QIN; WANG, 2010).

A proteína p53 funciona como um regulador negativo do ciclo celular, estando envolvida em vários pontos de controles do ciclo celular, tanto em G1 e G2 como também na mitose. O bloqueio na fase G1 ocorre como consequência da indução transcricional na expressão de p21, proteína pertencente a família p21 que incluem waf1, p27 e p57, sendo as mais importantes na regulação da fase G1. Como resultado do aumento da expressão de p21, ocorre a inibição do ciclo celular na fase G1-S, devido à ligação desta proteína aos complexos ciclina D/CDK4 e ciclina E/CDK2, prevenindo assim a ativação do fator E2F (fator de alongação). Ao inibir os complexos evita-se a fosforilação da pRb, necessária para que a célula entre na fase S, bloqueando o ciclo quando na presença de lesões no DNA. A proteína p21, mas não a p27 ou p57, também liga-se e inibe o antígeno nuclear de proliferação celular (PCNA), uma subunidade da DNA polimerase sigma, que tem importante papel na replicação e reparo. (SCHAFER, 1998).

O bloqueio na fase G2 ocorre através de Reprimo e 14-3-3s, estando o primeiro envolvido na via de regulação do complexo CDK2-ciclina B1 e do complexo Cdc2-ciclin B1, enquanto que o segundo sequestra o complexo B1-CDK1 fora do núcleo, permitindo manter o bloqueio em G2 (BALLESTEROS CASTAÑEDA *et al.*, 2007). A figura a seguir apresenta a via de bloqueio na fase G1 mediado por p53.

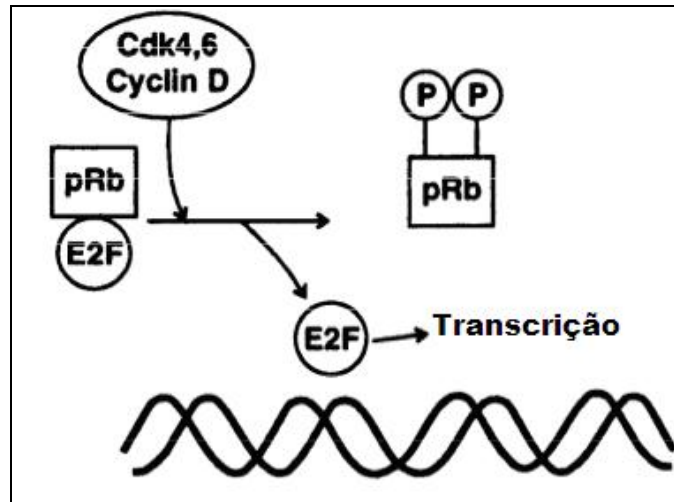


Figura 13 - Via de bloqueio em fase G1 mediado por p53
 Fonte: Adaptado de Schafer (1998).

A apoptose é uma das mais proeminentes funções da p53, sendo esta habilidade induzida por duas vias diferentes, mas que culminam na ativação da via das caspases. A via extrínseca ocorre quando a proteína p53 induz a expressão dos genes que codificam três proteínas de membranas: Fas (receptor de membrana capaz de induzir apoptose), Dr5 (domínio de morte com receptor para ligantes que induzem apoptose relacionados com TNF – TRAIL) e PERP. A via intrínseca é aquela induzida pela interação com as proteínas da família Bcl-2 (Bax, Noxa, PUMA e Bid) reguladores críticos da apoptose, as quais dirigem a expressão do citocromo C na mitocôndria. Interessante também é o fato de que a p53 localizada dentro da mitocôndria se acumula por cerca de uma hora depois de ativada, alterando o potencial de membrana com consequente liberação do citocromo C, que ativa a procaspase 9 e que por sua vez ativa a procaspase 3 (BALLESTEROS CASTAÑEDA *et al.*, 2007; MILLAU *et al.*, 2010; ROMER, *et al.*, 2006).

Vinte anos após a descoberta do gene supressor tumoral p53, Kaghad *et al.* (1997) demonstram existir um novo membro da família p53 em humanos, chamado de p73. Um ano depois foi a vez do p63 ser descoberto. Embora os membros (homólogos) tenham a mesma arquitetura e possuam a mesma ação supressora tumoral do p53, eles diferem tanto pela quantidade de promotores (um para o p53 e dois para p63 e p73) resultando em diferentes isoformas como também na via de degradação induzida por Mdm2 (ROMER, *et al.*, 2006).

Mutação do gene *TP53* é a alteração genética mais frequente na maioria dos cânceres humanos, acreditando-se que um em cada dois tumores carreguem esta mutação. Muitos são os estudos relacionando mutações/deleções do gene *TP53* com doenças onco-hematológicas, entre eles destacam-se os estudos de Sugimoto *et al.* (1993) e Kaneko *et al.*

(1995), que demonstraram alta incidência (12%) de mutações do gene *TP53* em paciente com síndrome mielodisplásica quando comparado com trabalhos anteriores (7%), correlacionando este achado com prognóstico desfavorável. A mutação do gene *TP53* está associada com cariótipo complexo, fato este, que corrobora a idéia de que a ativação de proto-oncogenes como a inativação de genes supressores tumorais são requeridos no processo de oncogênese. Dados da Agência Internacional de Pesquisa em Câncer (disponível em <http://www-p53.iarc.fr>), relatam que mais de 17.000 casos de mutações somáticas “missenses” resultaram em mais de 1.200 proteínas mutantes distinguíveis entre si (LEBRUN; LAVERY; WEINSTEIN, 2001). Muitas destas mutações estão localizadas no domínio de ligação ao DNA (figura 14). Diferentemente ocorre em indivíduos com síndrome de Li-Fraumeni e síndromes relacionadas com mutações germinativas do *TP53*, nas quais mais de 20% dos casos reportados possuem mutação no domínio de tetramerização, mas especificamente no resíduo Arg-337 (JOERGER; FERSHT, 2008).

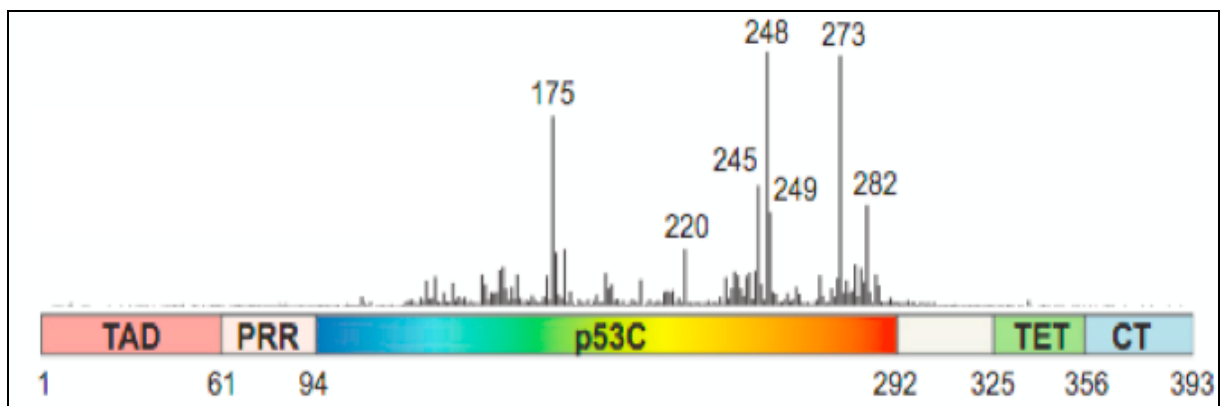


Figura 14 - Frequência relativa de mutações “missenses” em cada resíduo

Fonte: Adaptado de Joerger e Fersht (2008).

2.5 Gene *RB*

O gene *RB* foi o primeiro gene supressor tumoral clonado e sua identificação só foi possível através da observação de que este encontrava-se mutado ou deletado em retinoblastomas humanos (BURKHART *et al.*, 2010). O gene está localizado no cromossomo 13, especificamente no *locus* 13q14.2 (POZNIC, 2009), onde abrange cerca de 27 éxons os quais representam aproximadamente 180kb de todo o cromossomo, produzindo um longo transcrito de 4.7kb, que codifica uma fosfoproteína nuclear com importante ação sobre o ciclo

celular, contendo 928 aminoácidos e peso molecular de 110 kilodáltons (LIPINSKI; JACKS, 1999; POZNIC, 2009).

A fosfoproteína Rb (pRb), juntamente com os fatores relacionados Rb1 (p107) e Rb2 (p130), constituem à família de reguladores do ciclo celular conhecidos como “pocket proteins”, isso devido a grande similaridade na sequência de resíduos do domínio principal. Entretanto, apesar da semelhança estrutural entre os três membros, somente o gene *RB* tem sido demonstrado possuir propriedades de supressão tumoral, que é confirmado por sua mutação em diversos tumores humanos. Os genes *P107* e *P130* possuem maiores similaridades entre si (aproximadamente em torno de 50% da sequência idêntica) do que quando comparados com o gene *RB* (30% e 35%, respectivamente). (DU; POGORILER, 2006; LIPINSKI; JACKS, 1999). A semelhança entre os três ocorre na região conhecida como “pocket region”, que é uma região composta por dois subdomínios designados simplesmente de A e B. Enquanto que a pRb possui pouca similaridade com os outros membros da família fora do domínio “pocket”, p130 e p107 compartilham um domínio espaçador altamente conservado entre os subdomínios A e B. O domínio espaçador é essencial para que as proteínas p107 e p130 se liguem aos complexos Ciclina/CdK, enquanto que o domínio “pocket” é crucial para ligação e regulação de inúmeras proteínas, incluindo a família de fatores de transcrição E2F (LIPINSKI; JACKS, 1999). Esta família de proteínas também possui inúmeros sítios de fosforilação que podem ser fosforilados na fase G1 pelo complexo ciclina D/CdK4 e na fase G1/S pelos complexos ciclina E/CdK2 e ciclina A/CdK2. Em linhas gerais, a forma hiperfosforilada da proteína Rb exibe uma diminuição no poder de interação com outras proteínas alvos e conseqüentemente de exercer suas funções biológicas que abrangem ações de supressão tumoral, regulação do ciclo celular, diferenciação e apoptose (DU; POGORILER, 2006; LIPINSKI; JACKS, 1999). A figura a seguir apresenta a estrutura esquemática da proteína Rb, bem como dos seus sítios de ligação a outras proteínas e seus sítios de fosforilação.

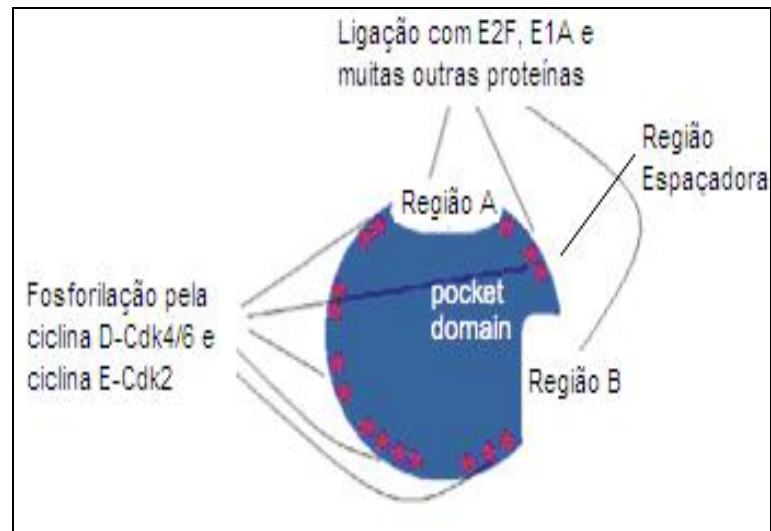


Figura 15 - Estrutura esquemática da proteína Rb
 Fonte: Adaptado de Poznic (2009).

Como descrito, os principais alvos dessa família são os membros da família E2F de fatores de transcrição. Eles são importantes para determinar a duração e controlar os níveis de expressão de muitos genes envolvidos na regulação e progressão do ciclo celular. Seus alvos incluem genes codificantes de proteínas reguladoras como as ciclinas A, E, D1, p107, Cdk2, Cdc2, E2F1, E2F4 e E2F5, bem como múltiplos genes envolvidos na replicação do DNA (timidina kinase, DNA Polimerase α e Cdc6). Os membros da família “pocket” mostram distinta preferência por ligação com membros da família E2F, sendo que p107 e p130 formam complexos com E2F4 e E2F5 enquanto que pRb forma complexos com E2F1, 2, 3, 4 e 5. E2F6 não se complexa com as proteínas “pocket” e sua função ainda é indeterminada (DU; POGORILER, 2006; LIPINSKI; JACKS, 1999; WEINBERG, 1995). A expressão gênica é regulada pela família de proteínas pRb através dos E2Fs por meio de duas vias distintas. Na primeira via o processo ocorre quando estas proteínas se ligam a estes fatores e inibem sua atividade transcricional positiva, e na segunda quando elas recrutam complexos de repressão transcricional aos sítios promotores dos E2Fs (LIPINSKI; JACKS, 1999).

A proteína Rb está presente tanto em células quiescentes quanto em células que estão entrando e saindo do ciclo celular, mas os níveis e a afinidade da ligação dos E2Fs aumentam de acordo com que as células vão re-entrando no ciclo. Na fase G₁, pRb existe na sua forma ativa, estado hipofosforilado e complexado com os E2Fs, principalmente E2F1 e

E2F3. A pRb é sequencialmente fosforilada pelos complexos ciclina D/Cdk4 e ciclina E/Cdk2 na transição G₁/S. A hiperfosforilação da pRb resulta em redução da afinidade por E2F, o que resulta em dissociação do complexo com liberação também do complexo de repressão transcricional. As proteínas E2Fs livres induzem a transcrição de inúmeros genes necessários para que a célula entre na fase S e possa progredir no ciclo (LIPINSKI; JACKS, 1999; WEINBERG, 1995).

A regulação da atividade do E2F pela pRb, p107 e p130 também possui um importante papel antiapoptótico em tecidos diferenciados, uma vez que muitos genes envolvidos neste processo (APAF-1, caspase 3, caspase 7 e p73) são alvos diretos dos E2Fs, entretanto, até o momento somente o aumento na expressão de E2F1 foi demonstrado ter efeito apoptótico, se esta habilidade é restrita ou é compartilhado com outros membros da família, ainda continua incerto. (CHAU; WANG, 2003; DU; POGORILER, 2006). A proteína Rb também pode suprimir a apoptose através da ligação e inibição direta de muitas outras proteínas pró-apoptóticas como a c-ABL tirosina quinase (BORGES; HUNTON; WANG, 2007) e JNK quinase, que estão envolvidas na apoptose stress induzida (CHAU; WANG, 2003).

Atualmente, inúmeras evidências sugerem que alterações da proteína pRb estejam diretamente relacionadas com a patogênese de muitos tumores humanos. Entretanto, alguns cientistas acreditam que a via regulatória exercida pela pRb possa estar comprometida em todas as malignidades humanas, seja em um ponto ou em outro da via. Essa suposição baseia-se em diversos achados como o de que em retinoblastomas, carcinomas de bexiga e em muitos sarcomas, a função exercida pela pRb está perdida através da mutação do gene *RB*, a de que o gene da ciclina D está amplificado em carcinomas de esôfago, mama e células escamosas, a de que ocorre um aumento na expressão de ciclina D1 em linfomas de células B através de translocação cromossômica, a de que o gene de CDK4 está amplificado em muitos glioblastomas e inúmeros gliomas e por fim de que p15, p16, ou ambos podem estar deletados em muitos tipos de carcinomas ou presentes em sua forma mutante (LIPINSKI; JACKS, 1999; SUN *et al.*, 2007; WEINBERG, 1995).

Alterações envolvendo o gene *RB* foram observadas em diversos tipos de doenças hematológicas incluindo leucemia linfocítica crônica (LLC), mieloma múltiplo (MM), LMA e em SMD (FITCHETT *et al.*, 1987; JOHNSON *et al.*, 1985; MORRIS *et al.*, 1991). Neste último, a literatura relata que esteja presente em cerca de 2% de todos os casos (NAGAMURA *et al.*, 2003).

2.6 Gene *MLL*

Guiados pelas aberrações cromossômicas, quatro grupos independentes de cientistas conseguiram clonar em 1992 o gene presente no ponto de quebra 11q23.3. (LIU; CHENG; HSIEH, 2009; SLANY, 2009). Ao analisarem e compararem a sequência obtida por meio desta clonagem imediatamente identificaram que tal gene codificava um homólogo do gene presente em moscas chamado de *Trithorax* (*Trx*). Por causa desta correlação e o envolvimento com leucemias, o gene humano recebeu as denominações: *HRX* “human trithorax”, *ALL-1* “acute lymphocytic leukemia-1” ou *MLL* “mixed lineage leukemia”, posteriormente ficando acordado que *MLL* seria a denominação final para este gene. Como um coativador transcricional, *MLL/Trx* é requerido para a manutenção do padrão de expressão gênica do complexo homeótico em vertebrados e invertebrados, genes *Hox* e *HOM-C* respectivamente. Padrões de deficiência homozigótica do *MLL* resultam em perda embrionária, enquanto que deleção heterozigótica resulta em transformação homeótica, indicando alteração da expressão do gene *Hox*. Como nota, cinco membros compõem a família de proteínas conhecidas como *MLL*, são elas: *MLL1*, *MLL2*, *MLL3*, *MLL4*, *Set1A* e *Set1B*, porém somente o *MLL1* foi identificado como participante no processo de leucemogênese em humanos (LIU; CHENG; HSIEH, 2009).

O gene *MLL* possui cerca de 90kb que abrangem 38 éxons os quais codificam uma extensa proteína contendo 3969 aminoácidos e que possui inúmeros domínios conservados, cuja função está implicada na regulação transcricional. Observando a figura a seguir pode-se notar que a proteína possui três ganchos AT na posição N-terminal (importantes para ligação ao DNA), dois sinais de localização nuclear (SNL1 e SNL2), seguidos por um domínio homólogo à DNA metiltransferase, rico em cisteína (CXXC), um domínio para ligação ao complexo de repressão, um domínio PHD “plant homeodomain”, um domínio bromo (BD), um domínio FYRN, um domínio de transativação transcricional (TAD), um domínio FYRC e um domínio SET na posição C-terminal, que é responsável pela atividade histona metiltransferase (HMT). Normalmente, a proteína é clivada por hidrólise em dois polipeptídeos: peptídeo N-terminal p300/p320 (*MLL^N*) e peptídeo C-terminal p180 (*MLL^C*), sendo esta clivagem realizada pela a enzima taspase 1 que pode atuar em um dos dois sítios de clivagem (CS1 e CS2) localizados nos resíduos 2666 e 2718, respectivamente (COSGROVE; PATEL, 2010; DASER; RABBITTS, 2005). Essas duas proteínas interagem

entre si formando um complexo multiproteico estável com importante ação sobre a remodelagem das cromátides (EGUCHI; EGUCHI-ISHIMAE; GREAVES, 2003).

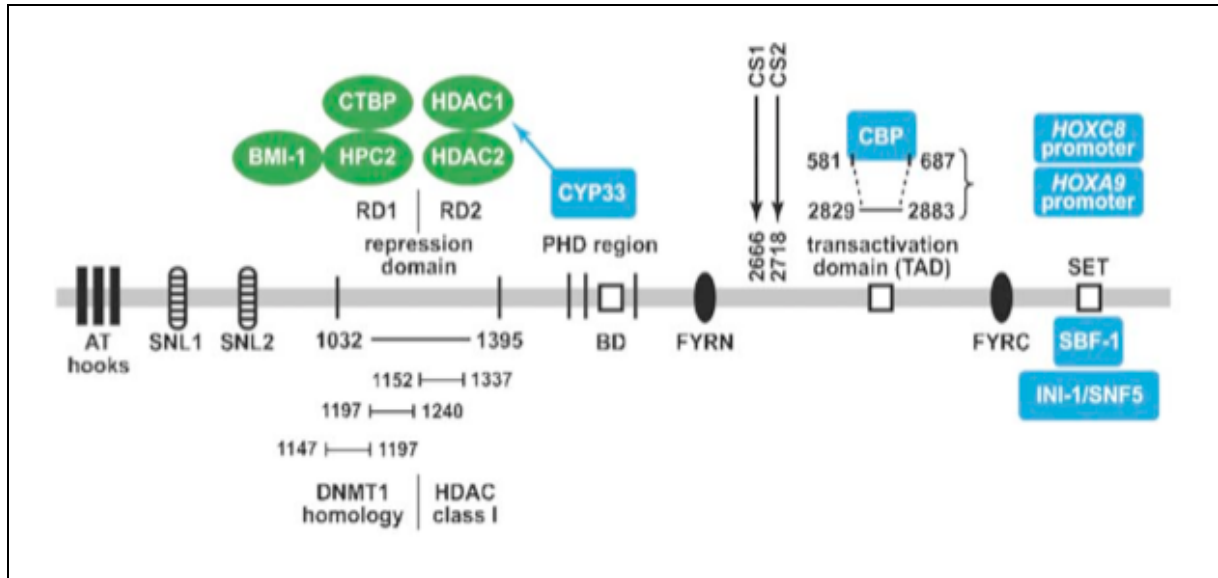


Figura 16 - Estrutura da proteína MLL
Fonte: Dasser e Rabbitts (2005).

A proteína MLL humana está diretamente relacionada especificamente com a regulação das cromátides, estando ativa nos primórdios do desenvolvimento embrionário, na formação da camada germinativa e posteriormente no processo de diferenciação dos diversos tecidos que constituem o organismo humano. MLL1, MLL2, MLL3, MLL4, Set1A e Set1B existem como complexos multiproteicos distintos com inúmeras subunidades em comum incluindo: Ash2, Wdr5, Rbbp5 e Dpy30. Cada uma dessas MLLs e Set1 contém um domínio catalítico SET responsável pela atividade HMT, que confere a adição de um, dois ou três radicais metil à lisina 4 localizada na extremidade N-terminal das histonas H3 (H3K4), fazendo parte de um sistema epigenético que leva ao remodelamento cromático e consequentemente regulação da atividade gênica. O efeito na cromatina é dependente do tipo de metilação (mono, di ou tri) e de qual aminoácido sofreu a modificação, podendo este processo compactar a cromatina e impedir a transcrição ou descompactar permitindo a transcrição (ANSARI; MANDALL, 2010; MARSCHALEK, 2010).

Apesar da grande importância no processo de regulação das cromátides, MLL também tem participação fundamental no controle da progressão do ciclo celular, pelo menos através da regulação da expressão de ciclinas e inibidores de CDKs. Estudos demonstram que MLL4 e MLL5 atuam como coativadores de p53 e são requeridos na trimetilação de H3K4 e

expressão de alvos gênicos para p53 endógeno em resposta à agente lesivo ao DNA (ANSARI; MANDALL, 2010). Interessantemente, o efeito positivo ou negativo do MLL sobre o ciclo celular também envolve a atividade HMT (LIU; CHENG; HSIEH, 2009). Pode-se afirmar ainda que MLL tenha também efeito sobre a senescência celular, uma vez que este está associado com a metilação e transcrição das regiões teloméricas através também de sua atividade HMT (ANSARI; MANDALL, 2010).

Entretanto, a melhor caracterização funcional da proteína MLL é na manutenção da expressão dos *clusters* Hox os quais ditam o destino celular. Os genes *Homeobox* correspondem a um grupo de mais de 200 genes nos vertebrados e a 39 nos seres humanos, organizados em 4 diferentes grupos: Hox A-D, localizados nos cromossomos 7, 17, 12 e 2, respectivamente. São um grupo de genes evolucionariamente conservados que codificam fatores de transcrição que participam tanto do controle do desenvolvimento embrionário quanto da diferenciação das células hematopoéticas, apresentando específicos padrões de expressão nas diferentes linhagens e em vários estágios de diferenciação. Assim pode-se afirmar que todas as aberrações cromossômicas envolvendo o gene *MLL* (translocação, duplicações, inserções e deleções do éxon 8) estejam ligadas à desregulação dos genes *Hox* e consequentemente indução do processo leucêmico (EGUCHI; EGUCHI-ISHIMAE; GREAVES, 2003). A figura 17 ilustra o controle exercido pelas proteínas Hox no controle da hematopoese normal e anormal.

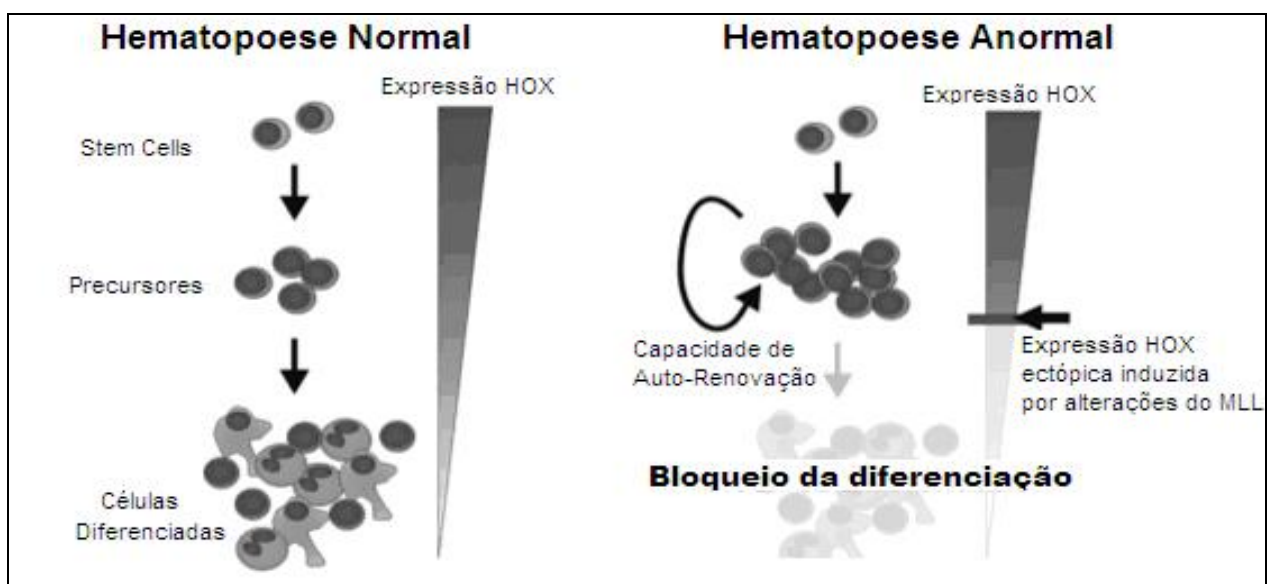


Figura 17 - O papel das proteínas Hox no controle da hematopoese
 Fonte: Adaptado de Slany (2009).

Até o presente momento, 104 diferentes rearranjos envolvendo o *MLL* foram descritos, dos quais 64 são caracterizados como de nível molecular. Apesar dessa extensiva diversidade de padrões, todas envolvem o domínio de ganchos AT e o de homologia à DNA metiltransferase, mas não o domínio SET. Alguns padrões de fusão codificam uma proteína nuclear com atividade de modulação transcricional, outras codificam proteínas citoplasmáticas com uma variedade de funções (EGUCHI; EGUCHI-ISHIMAE; GREAVES, 2003).

A incidência de alterações envolvendo o *MLL* associadas à leucemia é em torno de 3% para as LMAs e entre 8 a 10% para as LLAs, sendo todas relacionadas com prognóstico desfavorável. Os rearranjos mais frequentes são as fusões envolvendo os genes *AF4*, *AF6*, *AF9*, *AF10*, *ELL* e *ENL*, podendo serem também associadas as LMAs e LLAs terapia relacionadas. Existe ainda uma forte heterogeneidade clínica e morfológica com o tipo de leucemia relacionada, o que reflete a nível molecular no seu perfil de expressão gênica. A anormalidade mais frequente envolvendo o *MLL* é a translocação cromossômica t(4;11)(q21;q23), originando a fusão *MLL-AF4*, tendo sido, mais adiante, detectada de forma precoce em útero e em sangue de neonatos. Cerca de 5 a 10% das leucemias associadas com *MLL* são terapias relacionadas (t-leucemias), que correspondem a um grupo clinicamente heterogêneo que incluem ainda a síndrome mielodisplásica (SMDt) e leucemia mielomonocítica crônica (LMMct). Especialmente nas SMDs, o envolvimento do gene *MLL* na fisiopatologia, bem como a incidência destas alterações, não tem sido extensivamente estudados. Pappa *et al.* (2003) conseguiram detectar alterações no 11q23 em aproximadamente 28 pacientes com SMD, cerca de 5,1% do total de pacientes avaliados.

Os riscos determinantes de câncer secundário são em seu cerne multifatoriais, e estão diretamente relacionados com a ocorrência de câncer primário no início da vida, inclusão de altas doses de terapia radioativa e certos agentes quimioterápicos, como os inibidores de topoisomerase II, além da predisposição genética. A figura 18 demonstra o percentual das diferentes aberrações cromossômicas presentes nas leucemias agudas envolvendo o *MLL* tanto nos casos *de novo* como nas terapias induzidas (DASER; RABBITTS, 2005; EGUCHI; EGUCHI-ISHIMAE; GREAVES, 2003; HESS, 2004; LIU; CHENG; HSIEH, 2009).

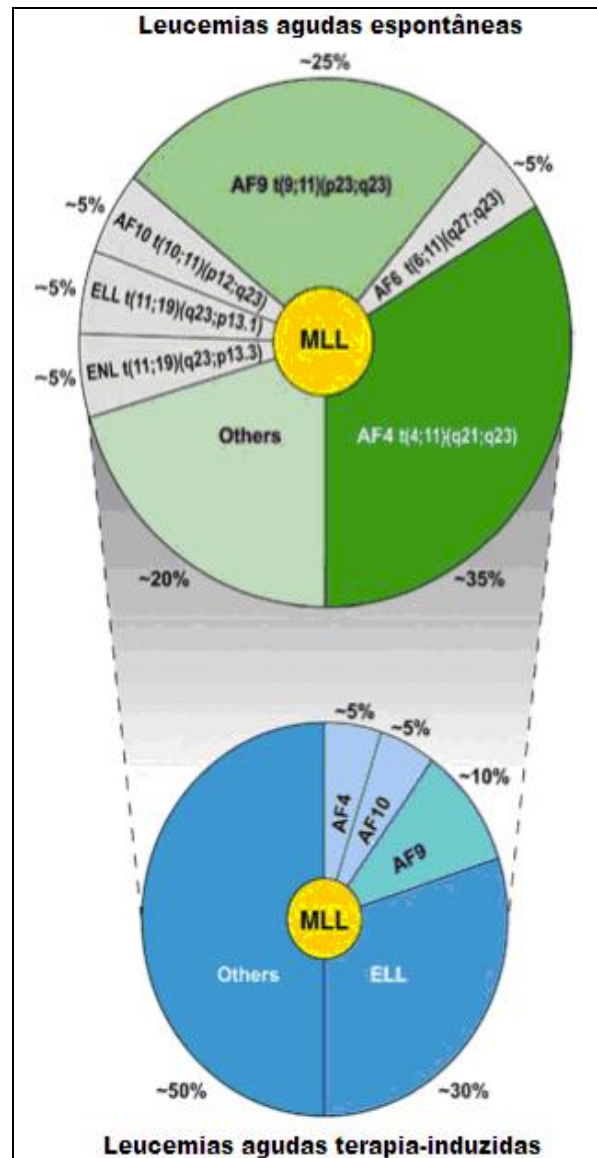


Figura 18 - Frequência de aberrações cromossômicas envolvendo o gene MLL
 Fonte: Adaptado de Dasser e Rabbitts (2005).

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar os genes *MLL*, *RB* e *TP53* em pacientes com Síndrome Mielodisplásica.

3.2 Objetivos específicos

- Determinar a frequência de alterações envolvendo o gene *MLL* em pacientes com SMD;
- Determinar a frequência de alterações envolvendo o gene *RB* em pacientes com SMD;
- Determinar a frequência de alterações envolvendo o gene *TP53* em pacientes com SMD;
- Associar as alterações envolvendo os genes *TP53*, *RB* e *MLL* com os achados citogenéticos;

4.CASUÍSTICA E MÉTODOS

4.1 Desenho do Estudo

Trata-se de um estudo retrospectivo, transversal e observacional.

4.2 Casuística

Para este estudo foram selecionados, de forma randômica, pacientes portadores de síndrome mielodisplásica acompanhados no ambulatório de SMD do Hospital Universitário Walter Cantídio (HUWC), entre os anos de 2007 e 2010.

Os critérios de inclusão consistiram em pacientes com diagnóstico prévio de SMD, que tivessem realizado estudo cromossômico no Laboratório de Citogenética Clássica e Molecular (LCCM) da Universidade Federal do Ceará (UFC), e que ainda possuíssem amostra adequada para a realização do estudo de Hibridização *In Situ* por Fluorescência (FISH).

Através de pesquisa no banco de dados do LCCM foi possível selecionar, de forma aleatória, inicialmente 45 pré-candidatos para a inserção no estudo, além de determinar quais deles possuíam resultado citogenético.

Dos 45 pacientes selecionados, somente 33 puderam ser incluídos no estudo, 11 pacientes não apresentavam amostra adequada e/ou suficiente para a confecção de lâminas a serem realizadas para a FISH e um paciente após revisão de prontuário foi excluído por não se tratar de SMD.

4.3 Metodologia

As informações referentes à classificação OMS e a estratificação de risco IPSS foram obtidas através da leitura de prontuários dos respectivos pacientes, sendo realizada, quando necessário, revisão por um hematologista a fim de validar os dados obtidos. O resultado

citogenético foi identificado durante o processo de seleção dos pacientes no próprio banco de dados do laboratório.

4.3.1 Citogenética Clássica

A citogenética clássica utilizando técnica de banda G de baixa resolução foi realizada de forma habitual ao preconizado por Chauffaille *et al.* (1997), isto é, a medula óssea previamente colhida em heparina, de forma estéril, foi dividida em dois frascos contendo 7mL de meio RPMI (pH 7,0), 3mL 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 50uL de colchicina (ou análogo sintético - Colcemid®), por 30 minutos. Em seguida, o material foi centrifugado e ressuspendido em solução hipotônica de KCl 0,075M e fixado em solução de Carnoy, ácido acético e metanol na proporção de 3:1, por 4 vezes. Para confecção das lâminas para análise, o material foi gotejado em lâminas de microscopia e deixado para secagem ao ar. As bandas foram feitas pela técnica de tripsina-Giemsa (GTG), sendo analisadas, quando possível, pelo menos 20 metáfases de cada paciente, sendo o cariótipo montado de acordo com o Sistema Internacional de Nomenclatura em Citogenética Humana (ISCN, 2009). As metáfases foram capturadas em sistema computadorizado (CHROMU) com software para cariotipagem, e o cariótipo digitalizado.

4.3.2 Coleta de Amostras

Para a realização do FISH foram utilizadas suspensões de leucócitos de medula óssea provenientes das preparações de citogenética clássica, estando estas células previamente estocadas em solução de Carnoy e armazenadas a -20°C. Destas suspensões foram coletados um volume aproximado de 150 a 300µL de amostra de cada paciente, colocadas em “ependorfs” de 1mL devidamente identificados, armazenados em isopor com gelo e encaminhadas ao laboratório de Citogenética e Biologia Molecular do Centro de Referência no Diagnóstico do Câncer da Criança e do Adolescente Dr. Murilo Martins (CRDCCAMM) do Hospital Infantil Albert Sabin (HIAS), para dar continuidade ao procedimento.

Uma vez no laboratório todas as amostras foram transferidas para tubo cônico tipo Falcon de 15mL, completou-se o volume para 10mL com fixador de Carnoy e centrifugou-se por 10 minutos a 1500 RPM, onde posteriormente foram pingadas. Os dados dos pacientes foram inseridos em um banco de dados construído unicamente para este estudo e cada amostra recebeu uma nova numeração a fim de facilitar a identificação e o manejo das mesmas. O segundo momento caracterizou-se pela a realização dos ensaios de FISH.

4.3.3 Seleção das Sondas DNA

Para o delineamento da pesquisa foram utilizadas 3 (três) sondas-DNA prontas para uso. Duas das sondas utilizadas no estudo eram da marca Kreatech®: KBI-19101 ON p53 (17p13)/SE 17 (para detecção de deleção e/ou amplificação do gene *TP53* com controle interno) e a KBI-10303 Poseidon *MLL* (11q23) Breakapart (para detecção de rearranjo do gene *MLL* com controle interno). A terceira sonda utilizada no estudo foi da marca Cytocell®: Cytocell-LPH 006 13q14.3 Deletion probe with 13qter Subtelomere Specific probe (para detecção de deleção e/ou amplificação do gene *RB* com controle interno).

4.3.4 Hibridização *In Situ* por Fluorescência

Inicialmente foram pingadas três lâminas para cada amostra que receberam identificação com as iniciais do paciente, o número de cadastro interno, bem como o nome da respectiva sonda utilizada. Estas lâminas permaneceram à temperatura ambiente até a secagem completa. Em seguida, foram deixadas por 2 minutos em solução 2XSSC (pH 7,0) previamente aquecida a 37°C. Ao fim deste prazo, as lâminas foram incubadas em uma solução de pepsina 5% e HCl 0,01M a 37°C por 10 minutos; posteriormente lavadas com 1XPBS por 10 segundos e diretamente incubadas em solução de formaldeído 1% e 1XPBS (pH 7,2) por 5 minutos. Terminada esta etapa as lâminas foram lavadas em solução de 1XPBS

e passaram por um processo de desidratação em soluções seriadas de etanol (70%, 85% e 100%) por dois minutos cada e colocadas para secar ao ar.

Salienta-se que todas as sondas utilizadas no estudo para a realização desta técnica possuíam controle de marcação interna.

Neste espaço de tempo as sondas foram ressuspendidas e aliqüotadas em capela de fluxo laminar de acordo com o número de amostras, ou seja, para cada lâmina em análise utilizou-se 2,5µL da sonda.

Tanto a sonda quanto as lâminas foram incubadas em solução de Formamida 70% em 2XSSC a 73°C por 5 minutos para desnaturação do DNA. Antes do término, as lâminas foram removidas da solução de formamida e novamente passaram por um processo de desidratação em soluções seriadas de etanol (70%, 85% e 100%), esperou-se as mesmas secarem ao ar. Terminados os 5 minutos aplicaram-se 2,5µL de cada sonda em sua respectiva lâmina sendo esta coberta por lamínula (22x22mm). Esperou-se ocorrer distribuição completa da sonda para daí então selar as lâminas com *rubber cement* (cola plástica). Por fim as lâminas foram colocadas em câmara escura a 37°C para a hibridização por um período de 24h.

No dia seguinte, obedecendo ao prazo determinado, as lâminas foram retiradas da câmara escura, onde sob abrigo da luz, foram removidas as lamínulas e a cola plástica. Imediatamente as lâminas foram submergidas em solução pré-aquecida a 37°C de 2XSSC/ 0,1% NP-40 (Nonidet P-40) por 5 minutos sem agitar. Terminado o prazo as lâminas foram imediatamente submergidas em solução de 0,4% 2XSSC/ 0,3% NP-40 a 73°C por 2 minutos, sem agitar. Posteriormente foram submergidas novamente em solução de 2XSSC/ 0,1% NP-40 e logo depois em solução de 1XPBS, ambas as soluções estando a temperatura ambiente. As lâminas secaram ao ar.

O próximo passo iniciou com a adição de 7µL do reagente DAPI/DABCO, reagente fornecido junto com as sondas, e a adição de lamínula (24X72mm). Este reagente possui as funções de contra-coloração e “antifade”, isto é, proteção contra a rápida degradação do fluorocromo conjugado da sonda durante a excitação pelo laser. As lâminas foram postas em repouso ao abrigo da luz por um prazo não inferior a 10 minutos, na temperatura de aproximadamente 4°C.

Utilizou-se microscópio de epifluorescência Olympus modelo BX-51 para analisar as lâminas. Para a captação, tratamento e análise das imagens foi utilizado o sistema de cariotipagem CytoVision® da empresa Genetix, versão 3.0. Todo o processo de captação das imagens foi realizada em sala escura.

Para todas as sondas utilizadas a interpretação dos resultados foi realizada de acordo com o descrito nas fichas técnicas dos próprios kits, uma vez que existem diferenças significativas nas metodologias utilizadas e aplicadas em cada tipo de sonda. Todas as 99 lâminas foram analisadas por citogeneticista experiente obedecendo o recomendado pelo manual de práticas em laboratório de citogenética (BARCH; KNUTSEN; SPURBECK, 1997), o qual sugere que toda a análise por FISH deva ser feita observando um número maior ou igual a 200 núcleos interfásicos, e que deva ser também registradas e arquivadas as imagens digitais destes núcleos. Neste caso as imagens foram armazenadas no banco de dados do estudo. As fichas técnicas das respectivas sondas utilizadas neste estudo encontram-se em anexo.

4.3.6 Aspectos Éticos

O trabalho foi submetido como um adendo ao projeto intitulado Síndrome Mielodisplásica, previamente aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos, da Universidade Federal do Ceará, sob o número: 006.02.10, estando o projeto que resultou neste trabalho em conformidade com as orientações preconizadas na Resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde do Ministério da Saúde.

5 RESULTADOS

Dos 33 pacientes incluídos no estudo, observou-se que 17 pacientes eram do sexo masculino e 16 do sexo feminino, não havendo assim predominância de sexo. Quanto à idade, dividiram-se os pacientes em dois grupos distintos: aqueles com idade inferior a 60 anos e aqueles com idade superior a 60 anos. Dessa forma pode-se determinar que 17 pacientes (51,5%) pertenciam a faixa etária acima de 60 anos enquanto que 16 pacientes (48,5%) eram abaixo de 60 anos. A faixa etária dos pacientes incluídos no estudo variou entre 14 e 91 anos, com mediana de idade de 61 anos.

5.1 Classificação OMS e IPSS

Tendo em vista o preconizado pelo comitê da OMS no que diz respeito à classificação das SMDs, observou-se que dos 33 pacientes selecionados para estudo, 17 (52%) foram classificados com o subtipo CRDM, 1 paciente (3%) com o subtipo AR, 4 pacientes (12%) com o subtipo ARSA, 1 paciente (3%) com o subtipo AREB-I, 4 pacientes (12%) com o subtipo AREB-II, 1 paciente (3%) com SMD Inclassificável, 4 pacientes (12%) com SMD Secundária e 1 (3%) com Trombocitopenia Refratária, podendo esses dados serem observados no gráfico 1.

Quanto ao sistema de escore prognóstico, o IPSS, notou-se que 4 pacientes (14%) foram classificados como de baixo risco, 17 pacientes (61%) foram classificados como risco intermediário 1 (INT-1), 5 pacientes (18%) como risco intermediário 2 (INT-2) e 2 pacientes (7%) foram classificados como de alto risco. O IPSS não foi aplicado para pacientes com SMD secundária (4 pacientes) e/ou que não possuíam resultado citogenético (1 paciente), este último em decorrência do baixo índice mitótico o que impossibilitou a conclusão do caso. Estes dados encontram-se demonstrados no gráfico 2.

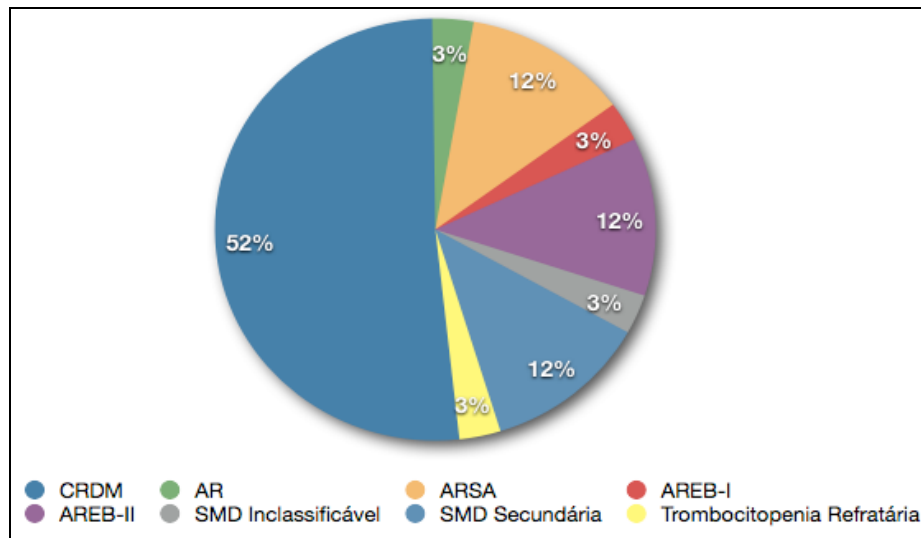


Gráfico 1 – Distribuição dos pacientes segundo a classificação OMS

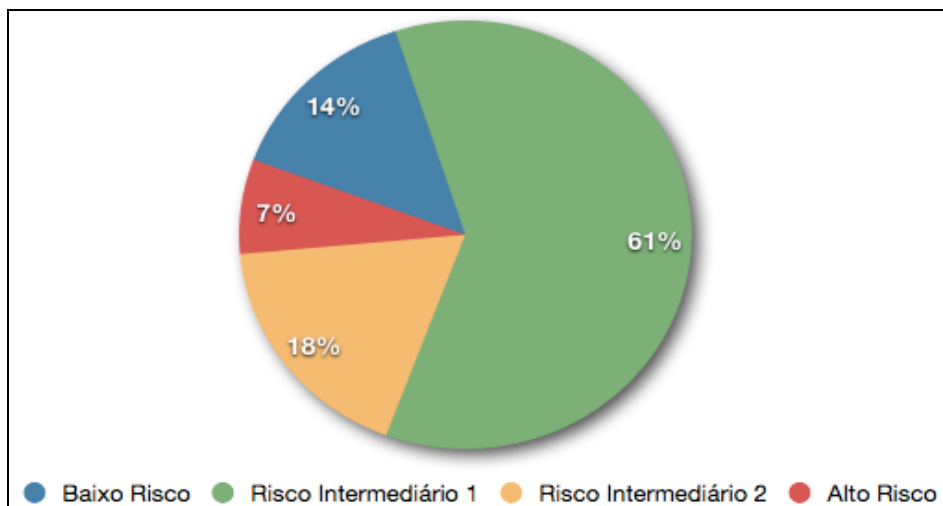


Gráfico 2 – Distribuição dos pacientes segundo o critério IPSS

5.2 Citogenética Clássica

Os resultados citogenéticos obtidos através da técnica de banda G estão descritos no quadro 1. Apenas um único paciente (registro 30) não tinha resultado citogenético. Observa-se no quadro que aproximadamente 78% dos pacientes apresentaram cariótipo alterado, muitos dos quais cariótipos complexos, i.e., com três ou mais alterações por metafase. Muitas das alterações encontradas nestes pacientes enquadravam-se como deleções, adições, aneuploidias e presença de cromossomo marcador. Por outro lado, apenas 22% dos pacientes apresentaram cariótipo sem aparentes alterações numéricas ou estruturais (46,XX ou 46,XY),

sendo que estes resultados não descartam possíveis microalterações não detectáveis pela baixa resolução da técnica utilizada.

Quadro 1 - Resultados Citogenéticos

Registro	Resultado segundo o ISCN 2009
1	46,XY,del(5)(q15q33)[7]/46,XY[11]
2	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]
3	47,XY,+mar[3]/46,XY[17]
4	46,XY,del(7)(q32)[2]/46,XY[18]
5	46,XX,del(17)(p11.2)[3]/46,XX[4]
6	46,XY,del(5)(q15q33),del(17)(p11.2)[7]/46,XY[13]
7	46,XX,del(11)(q23)[9]/46,XX[5]
8	77~158<4n>,XY[9]/46,XY[18]
9	47,XY,+8[4]/47,XY,-1,+8,+mar[5]/47,XY,-1,del(7)(q32),+8,+mar[5]/47,XY,-1,+8,del(11)(q23),+mar[4]/46,XY[2]
10	71~99<4n>,XY...[4]/46,XY,del(17)(p11.2)[9]/46,XY[7]
11	39,XX,-1,-5,-11,-12,-15,-20,-21[5]/46,XX,del(5)(?q14q33)[5]/46,XX[4]
12	46,XX,del(5)(q23)[7]/46,XX[6]
13	46,XX,del(5)(q15q33)[9]/46,XX,del(5)(q15q33),del(11)(?q25)[7]/46,XX[4]
14	46,XY,del(5)(?q15q33)[7]/46,XY[8]
15	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]
16	46,XY,del(5)(?q15q33)[8]/46,XY[12]
17	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]
18	175,XXXXXXXXX,-5,-6,-7,-8,-9,-11,-13,-14[4]/46,XX,del(5)(q15q33)[8]/46,XX[19]
19	89,XXY,-20,-22,-Y[4]/46,XY,del(16)(?q22)[5]/46,XY[11]
20	37,X,-2,-3,-9,-11,-12,-15,-16,-18,-Y[8]/46,XY,del(5)(q15q33)[5]/46,XY[6]
21	92~102<4n>,XXXX...[6]/170~176<7n>,XXXXXXXX...[7]/46,XX[7]
22	46,XY,del(5)(q31q35)[6]/46,XY[17]
23	46,X-Y[4]/46,XY[16]
24	46,XY,del(5)(q22q33)[5]/46,XY[7]
25	46,XX,del(20)(q13.1)[7]/46,XX[16]
26	46,XX[8]
27	46,XX[22]
28	46,XX[8]
29	46,XX[25]
30	Ausência de Metáfases
31	46,XX[15]
32	46,XX[20]
33	46,XX[20]

Utilizando como referência as definições de prognóstico favorável, intermediário e desfavorável adotadas por Greenberg *et. al.* (1997) no IPSS, pode-se determinar que 15 pacientes (47%) possuíam cariótipo de prognóstico favorável, 11 pacientes (34%) cariótipo de prognóstico desfavorável e 6 pacientes (19%) cariótipo de prognóstico intermediário. Os dados estão apresentados na tabela 8. Entre os resultados, aqueles considerados complexos foram observados com maior frequência, respondendo por cerca de 31% do total de casos.

Tabela 08 – Distribuição dos pacientes segundo as definições de prognóstico do IPSS

Prognóstico	Achado Citogenético	Pacientes	Total
	<i>Normal</i>	7	
Favorável	<i>del(20q) Isolada</i>	1	15 ou 47%
	<i>del(5q) Isolada</i>	6	
	<i>-Y</i>	1	
Intermediário	<i>Outras Alterações</i>	6	6 ou 19%
	<i>Cariótipo Complexo</i>	10	
Desfavorável	<i>Alterações Cromossomo 7</i>	1	11 ou 34%

5.3 FISH

Dos 33 pacientes selecionados para o estudo, seis (aproximadamente 18%) apresentaram alteração em um dos 3 três genes pesquisados. Nenhum paciente apresentou alteração concomitante envolvendo dois ou os três genes avaliados. Em 2/33 pacientes detectou-se marcação anômala de região centromérica.

5.3.1 Gene *TP53*

A análise através da técnica da FISH permitiu identificar 3 pacientes com alteração do gene *TP53* (aproximadamente 9% do total de pacientes avaliados no estudo). Os pacientes 2, 6 e 31 foram os que apresentaram alteração do gene *TP53*.

O paciente com número de registro 2 apresentou amplificação do gene *TP53*, tendo uma média de dez sinais (amplificações) por núcleo interfásico, o que pode ser facilmente observado quando comparado com núcleos normais, de acordo como demonstrado na figura 19.

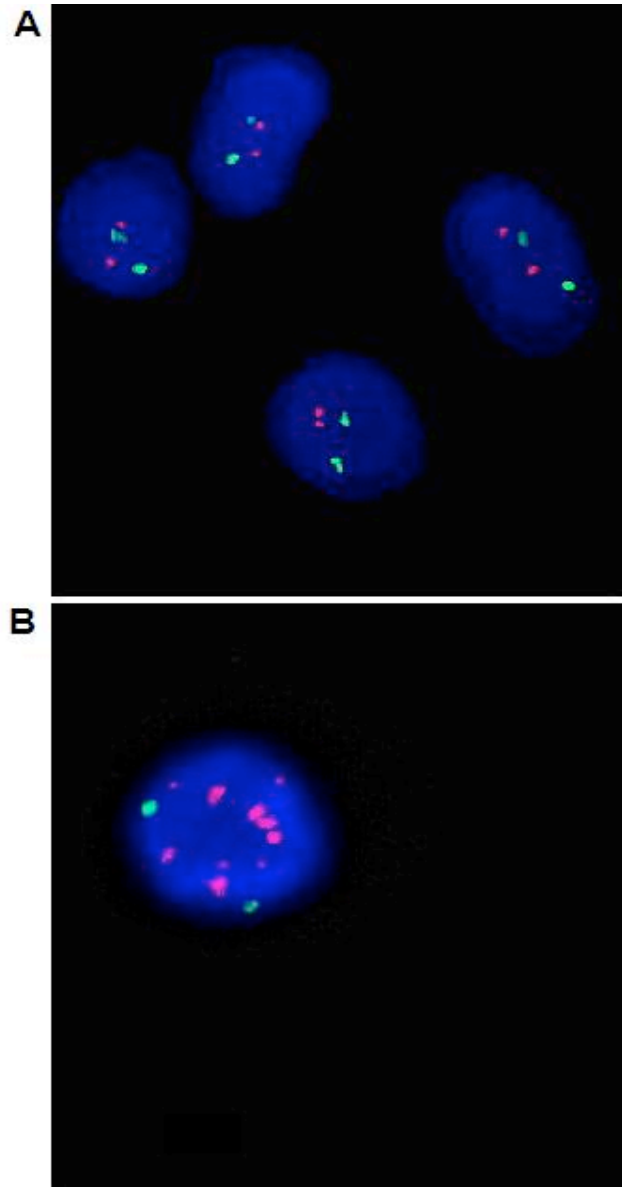


Figura 19 – Amplificação do gene *TP53*. A figura A apresenta quatro núcleos interfásicos de paciente normal, todos eles apresentando dois sinais vermelhos, que correspondem ao gene *TP53* e dois sinais verdes para a região centromérica do cromossomo 17 (controle). Na figura B, núcleo interfásico da paciente de registro número 2 demonstrando dez sinais vermelhos, que corresponde a amplificação do gene *TP53*, e dois sinais verdes (controle).

O paciente com número de registro 31 apresentou, em uma pequena população de células, deleção de um dos alelos do gene *TP53*. A figura 20 demonstra o resultado.

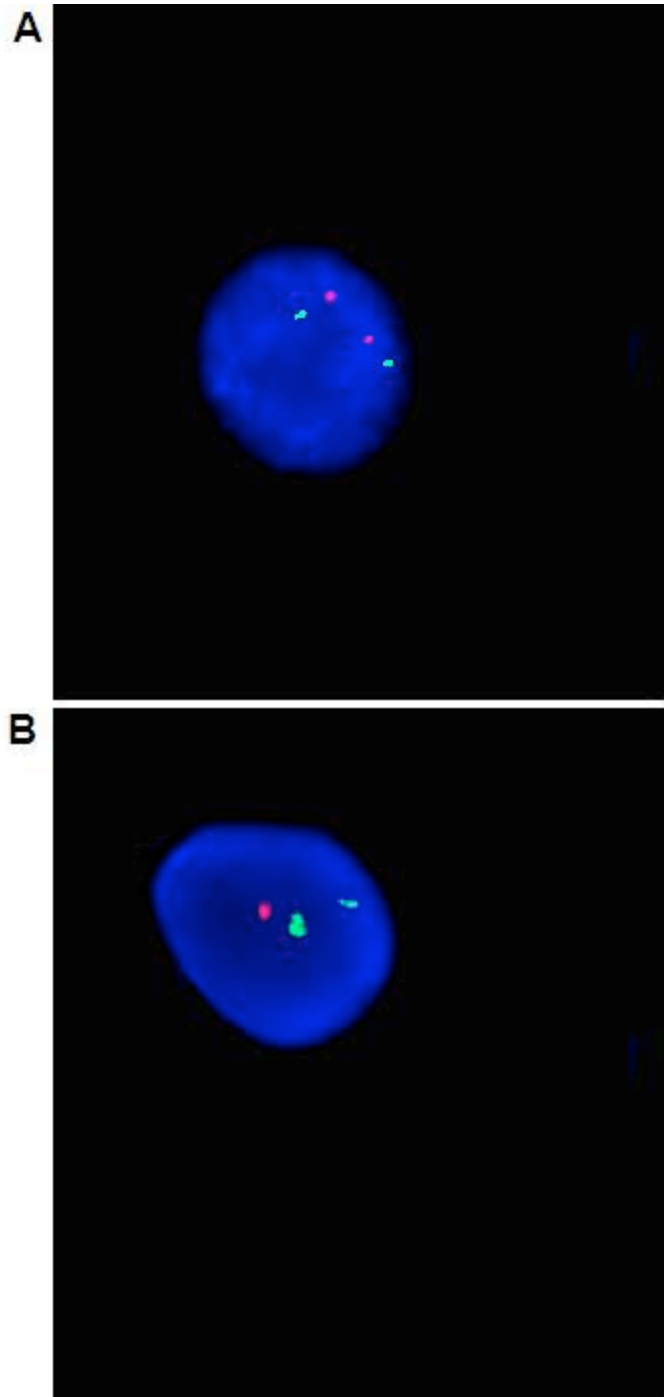


Figura 20 – Deleção do gene *TP53*. Figura A apresenta núcleo interfásico de paciente com marcação normal do gene *TP53*, dois sinais vermelhos e também dois sinais verdes, marcação controle. Na figura B, núcleo interfásico da paciente de registro número 31 demonstrando apenas um sinal vermelho, que corresponde ao único alelo do gene *TP53* presente em decorrência da deleção do outro, e dois sinais verdes (controle).

O paciente com registro de número 6 apresentou deleção de ambos os alelos do gene *TP53*, como pode ser evidenciado na figura 21.

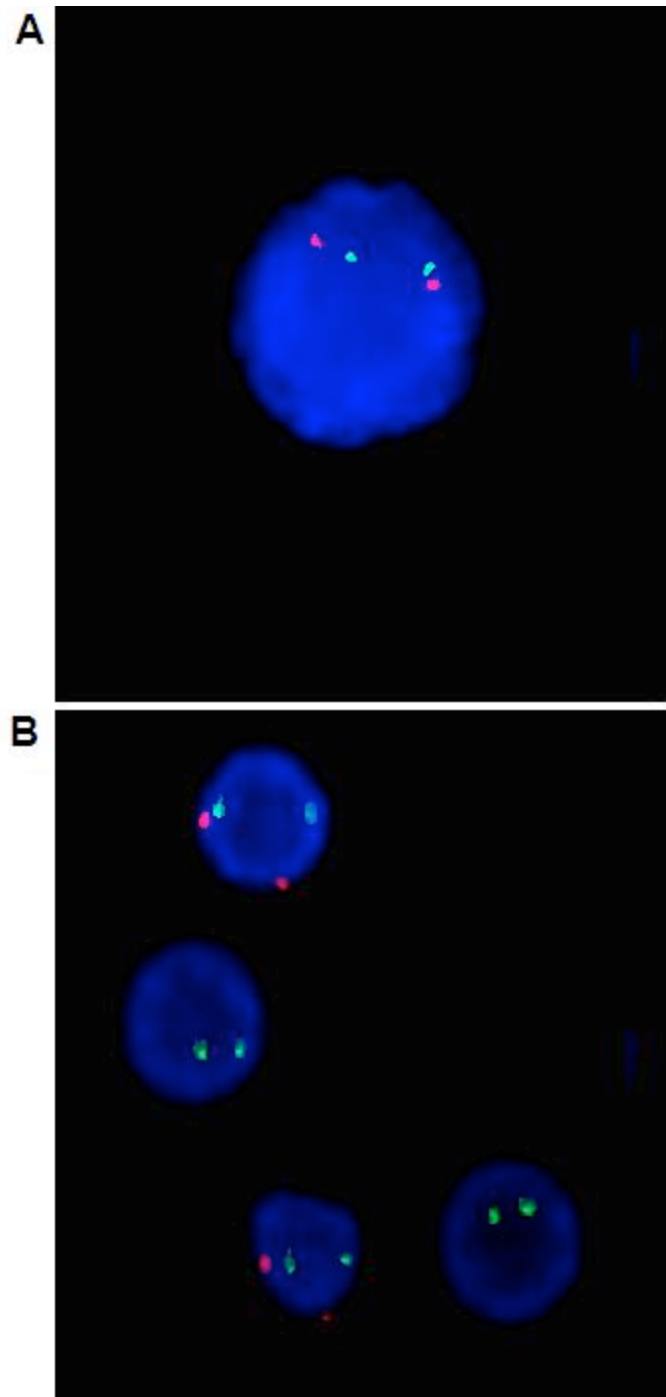


Figura 21 – Deleção dos dois alelos do gene *TP53*. Figura A apresenta núcleo interfásico de paciente com marcação normal do gene *TP53*, dois sinais vermelhos e também dois sinais verdes, marcação controle. Na figura B, observa-se a presença de dois núcleos interfásicos do paciente de registro número 6 demonstrando quatro sinais (dois vermelhos e dois verdes) representando padrão de normalidade e em outros dois núcleos ausência de sinal vermelho, que corresponde a perda dos dois alelos do gene *TP53*.

5.3.2 Gene *MLL*

A análise da FISH permitiu identificar 2 pacientes com rearranjo do gene *MLL*, o que corresponde a aproximadamente 6% do total de pacientes avaliados no estudo. Os pacientes com registros 7 e 22 foram os que apresentaram o rearranjo do gene *MLL*. Nenhum destes pacientes apresentou deleção do gene *MLL*. A figura 22 apresenta o resultado dos dois pacientes.

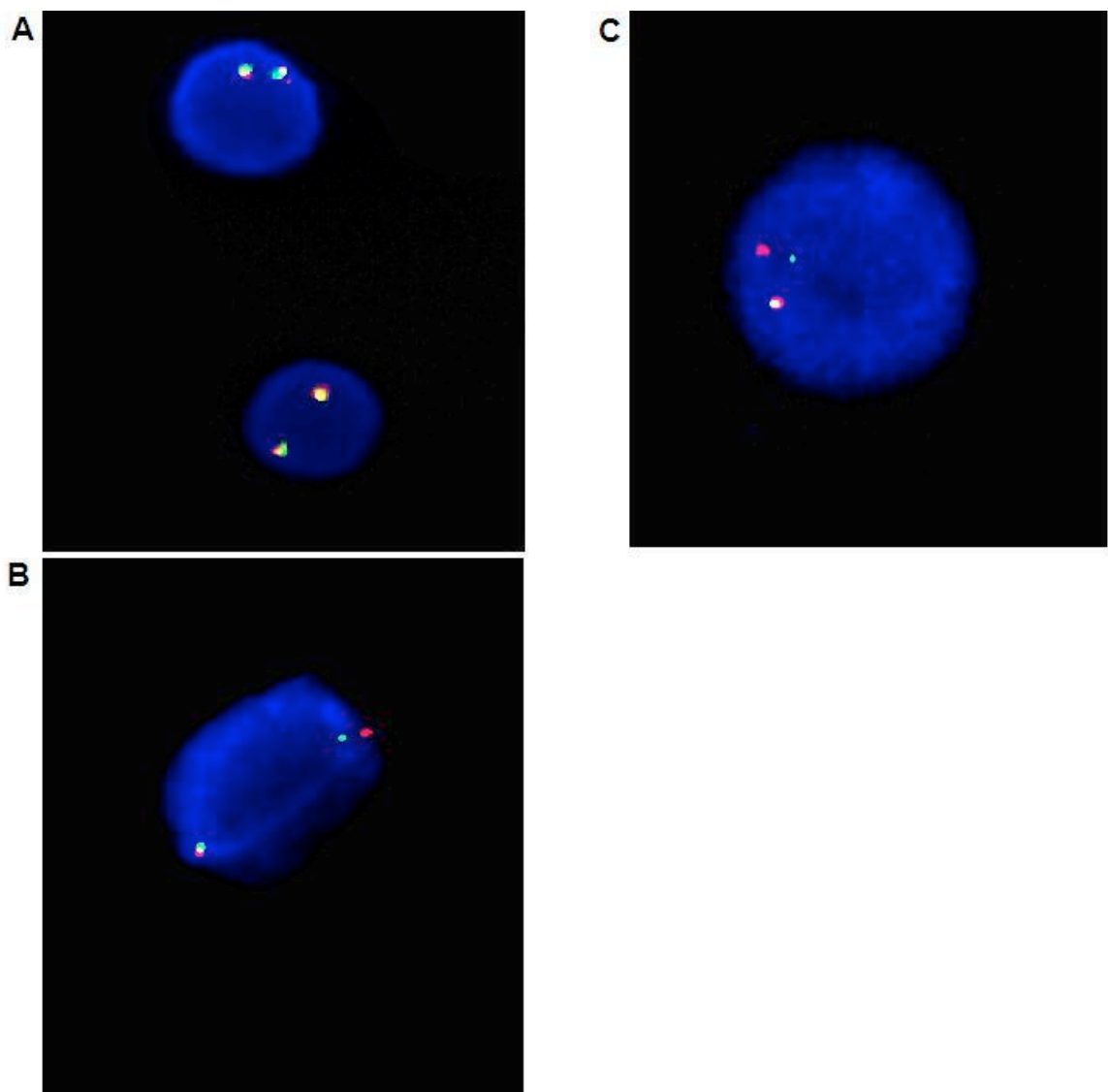


Figura 22 – Rearranjo do gene *MLL*. Figura A apresenta núcleo interfásico de paciente com marcação normal do gene *MLL*, padrão definido como presença de dois sinais amarelos resultantes de duas fusões dos dois sinais vermelhos e dois sinais verdes. Nas figuras B e C, pacientes 7 e 22 respectivamente, observa-se apenas um sinal amarelo representando o alelo normal do gene, enquanto que a presença do sinal vermelho e do sinal verde significa rearranjo do outro alelo.

5.3.3 Gene *RB*

A análise da FISH permitiu identificar apenas 1 paciente (de registro número 26) com deleção do gene *RB*, o que corresponde a aproximadamente 3% do total de pacientes avaliados no estudo. A figura 23 apresenta o resultado do paciente.

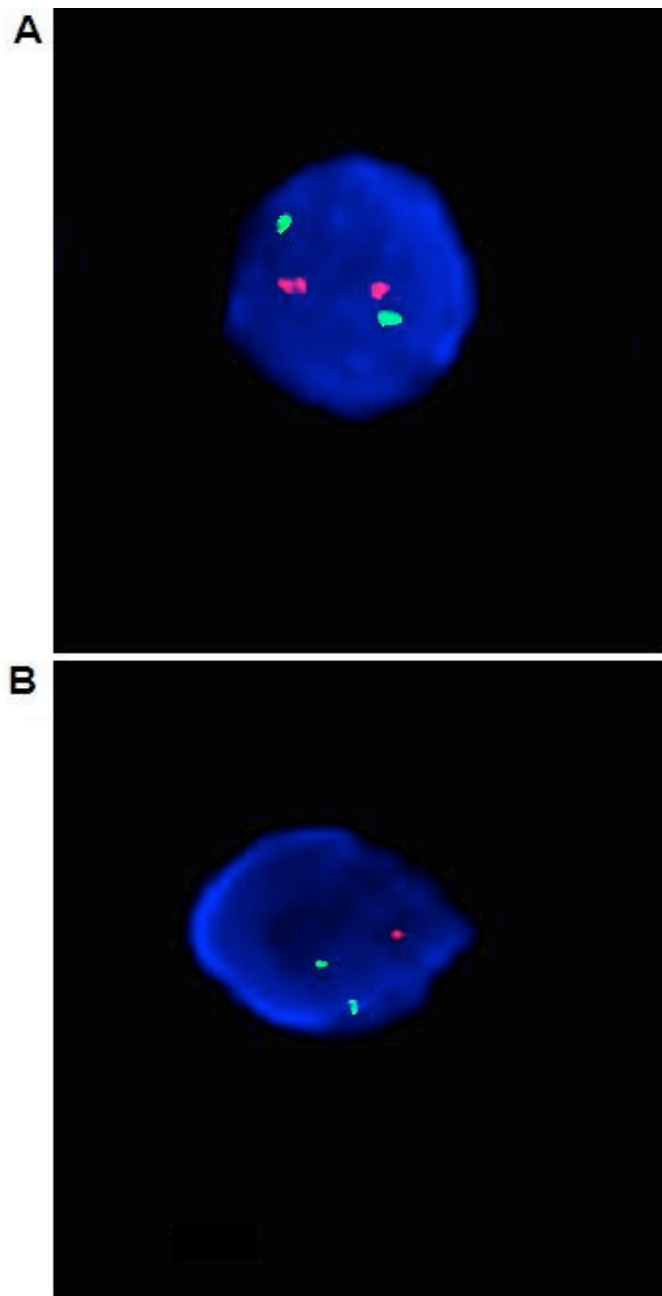


Figura 23 – Deleção do gene *RB*. Figura A apresenta núcleo interfásico de paciente com marcação normal do gene *RB*, dois sinais vermelhos e também dois sinais verdes, marcação controle. Na figura B, núcleo interfásico da paciente de registro número 26 demonstrando apenas um sinal vermelho, que corresponde ao único alelo do gene *RB* presente em decorrência da deleção do outro, e dois sinais verdes (controle).

5.3.4 Marcação Anômala da Região Centromérica

A análise da FISH permitiu identificar em 2 pacientes (registros 5 e 10) a presença de mais de dois sinais, por núcleo interfásico, da região centromérica do cromossomo 17, marcação controle da sonda .

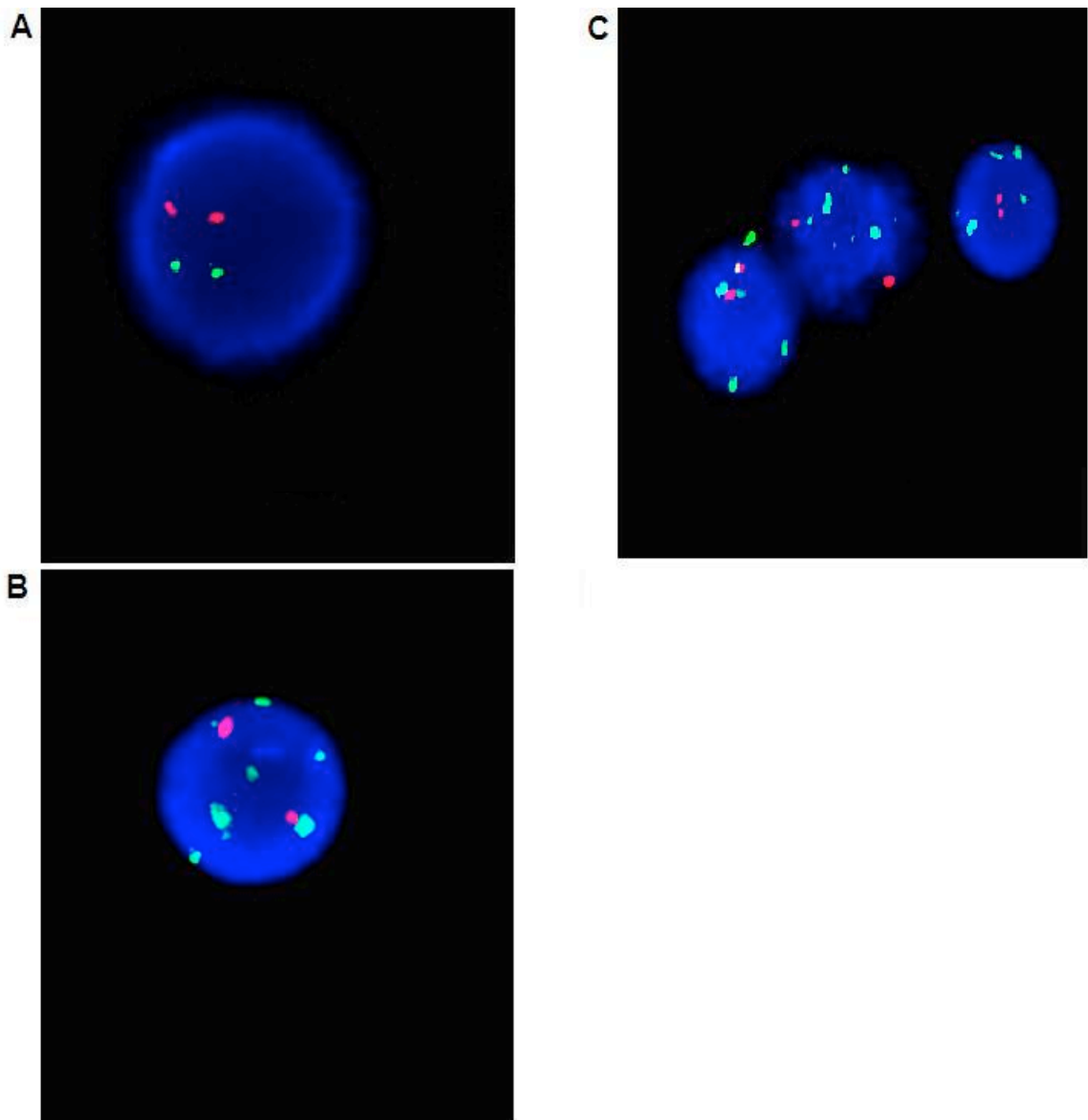


Figura 24 – Marcação anômala da região centromérica do cromossomo 17. A figura A apresenta padrão normal do gene *TP53*, i.e., dois sinais vermelhos e também dois sinais verdes (controle). As figuras B e C, pacientes 5 e 10 respectivamente, apresentaram dois sinais vermelhos e uma média de seis sinais verdes por núcleo, correspondendo à marcação anômala da região centromérica (controle) do cromossomo 17.

5.4 FISH e Citogenética

A tabela a seguir demonstra os resultados citogenéticos dos pacientes que apresentaram alteração, detectada por FISH, em um dos três genes avaliados na pesquisa.

Tabela 09 – Resultados citogenéticos dos pacientes com alterações moleculares

Paciente	Resultado Citogenético	Alteração FISH
2	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]	Amplificação <i>TP53</i>
6	46,XY,del(5)(q15q33),del(17)(p11.2)[7]/46,XY[13]	Deleção <i>TP53</i>
7	46,XX,del(11)(q23)[9]/46,XX[5]	Rearranjo 11q23
22	46,XY,del(5)(q31q35)[6]/46,XY[17]	Rearranjo 11q23
26	46,XX[8]	Deleção <i>RB</i>
31	46,XX[15]	Deleção <i>TP53</i>

5.4.1 Gene *TP53*

Dos 3 pacientes com alterações envolvendo o gene *TP53*, 1 paciente (registro 31) possuía, segundo a classificação IPSS, cariótipo de prognóstico favorável, 1 paciente (registro 6) com cariótipo de prognóstico intermediário e 1 paciente (registro 2) com cariótipo de prognóstico desfavorável. As figuras 25, 26 e 27 apresentam os resultados da citogenética e FISH dos pacientes com registros 31, 6 e 2, respectivamente.

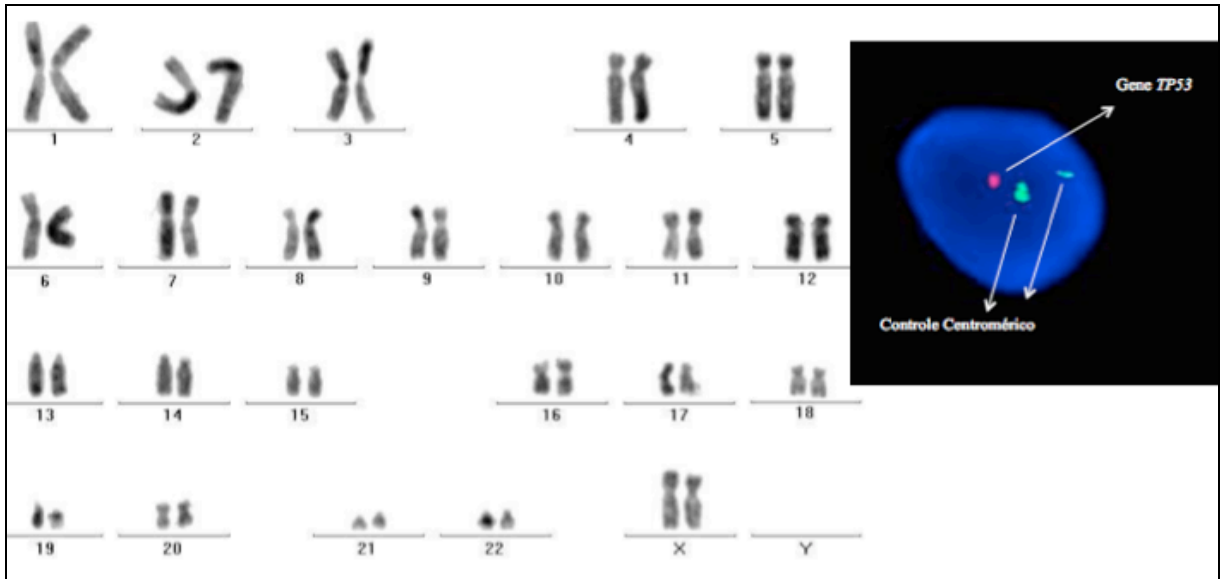


Figura 25. Resultado citogenético e de FISH do paciente 31. À esquerda cariótipo sem aparentes alterações numéricas ou estruturais (46,XX). A direita resultado FISH demonstrado deleção de um dos alelos do gene *TP53*.

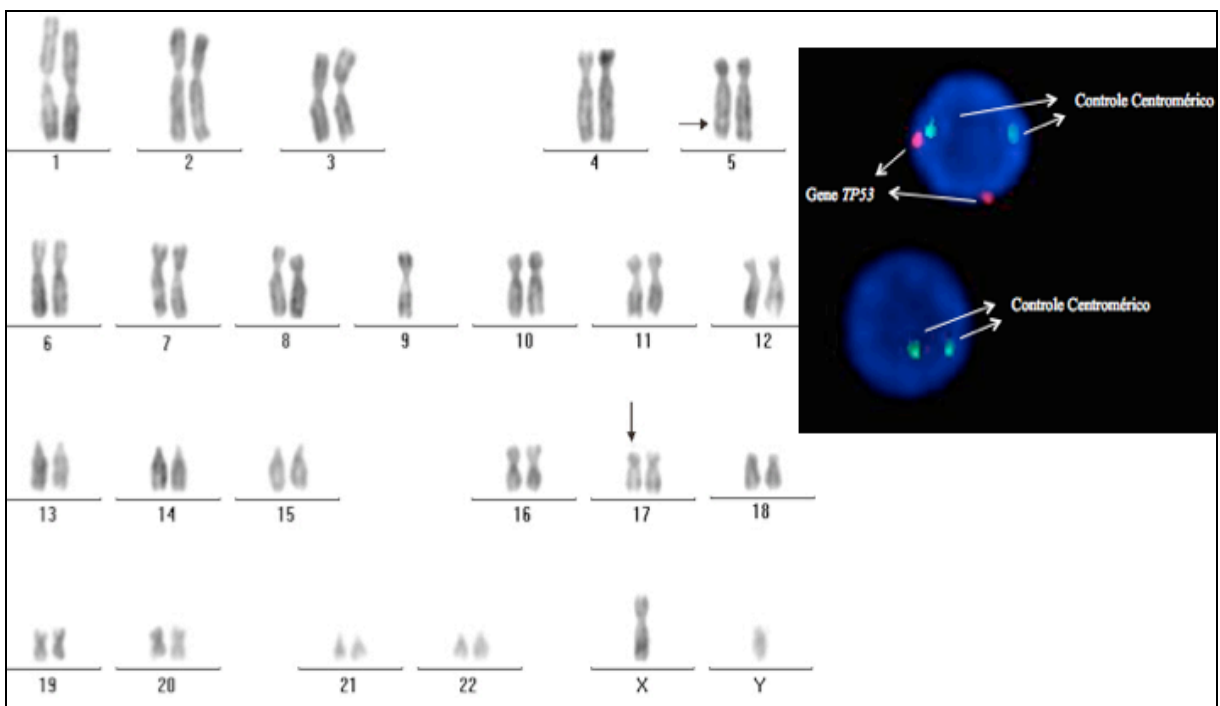


Figura 26. Resultado citogenético e de FISH do paciente 6. À esquerda cariótipo pseudodiplóide apresentando 46 cromossomos contendo deleção intersticial do braço longo do cromossomo 5 e deleção terminal no braço curto do cromossomo 17 (46,XY,del(5)(q15q33),del(17)(p11.2)[7]/46,XY[13]). À direita resultado FISH demonstrado em um dos núcleos interfásicos deleção de ambos os alelos do gene *TP53*.

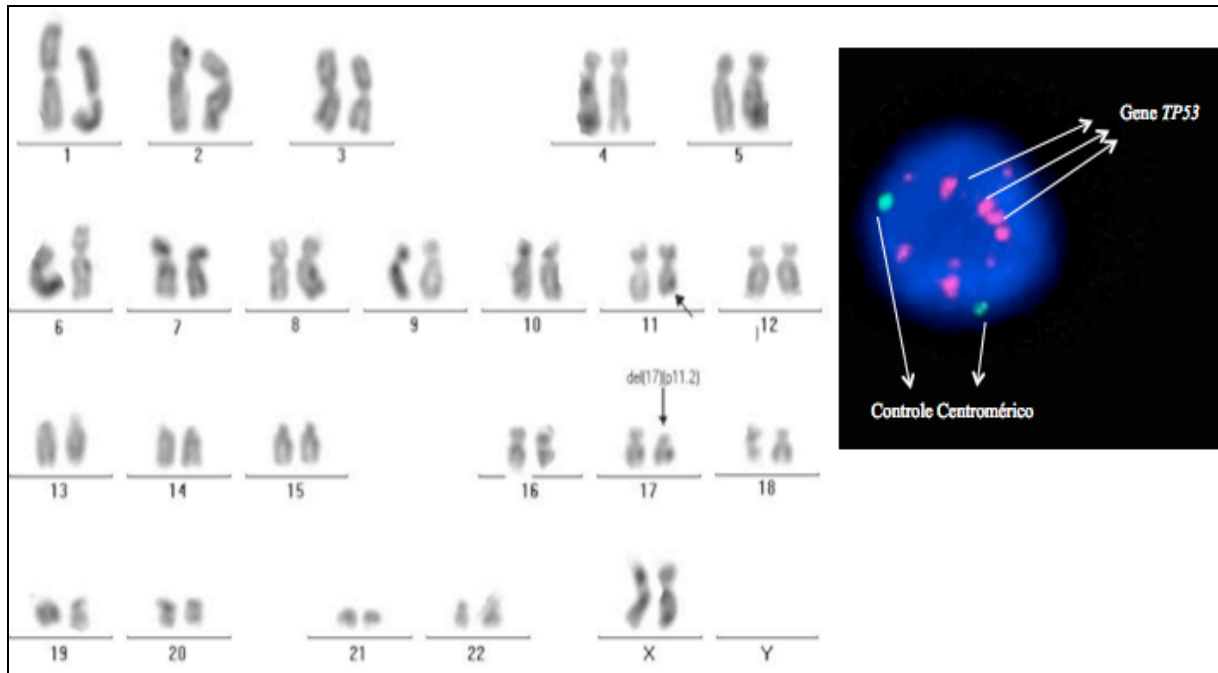


Figura 27. Resultado citogenético e de FISH do paciente 2. À esquerda cariótipo de um dos clones anormais onde pode ser observada deleção terminal do braço longo do cromossomo 11 e deleção terminal no braço curto do cromossomo 17 (90,XXXX,-6,-7,-8,-11,+21,+22[5]/46,XX,del(7)(q23),del(20)(q13.1)[3]/45,XX,-7[5]/45-46,XX,-del(7)(q32),del(11)(q32),-17,del(17)(p11.2),del(20)(q13.1)[cp11]). À direita resultado da FISH demonstrando amplificação do gene *TP53*.

5.4.2 Gene *MLL*

Dois pacientes apresentaram rearranjo do gene *MLL*, um deles, paciente 22, possuía cariótipo de prognóstico favorável e o outro (paciente 7) cariótipo de prognóstico intermediário. As figuras 28 e 29 apresentam os resultados de citogenética e FISH dos pacientes com registros 22 e 7, respectivamente.

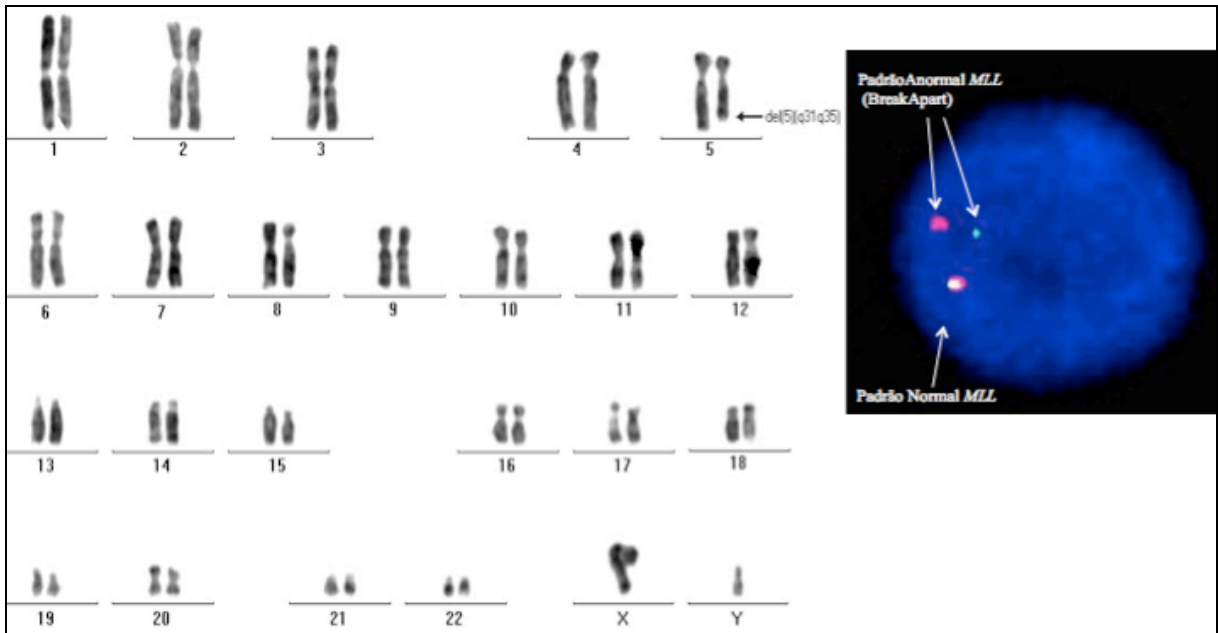


Figura 28. Resultado citogenético e de FISH do paciente 22. À esquerda cariótipo do clone celular patológico onde pode ser observada deleção intersticial do braço longo do cromossomo 5 (46,XY,del(5)(q31q35)[6]/46,XY[17]). À direita resultado da FISH demonstrando rearranjo de um dos alelos do gene *MLL*.

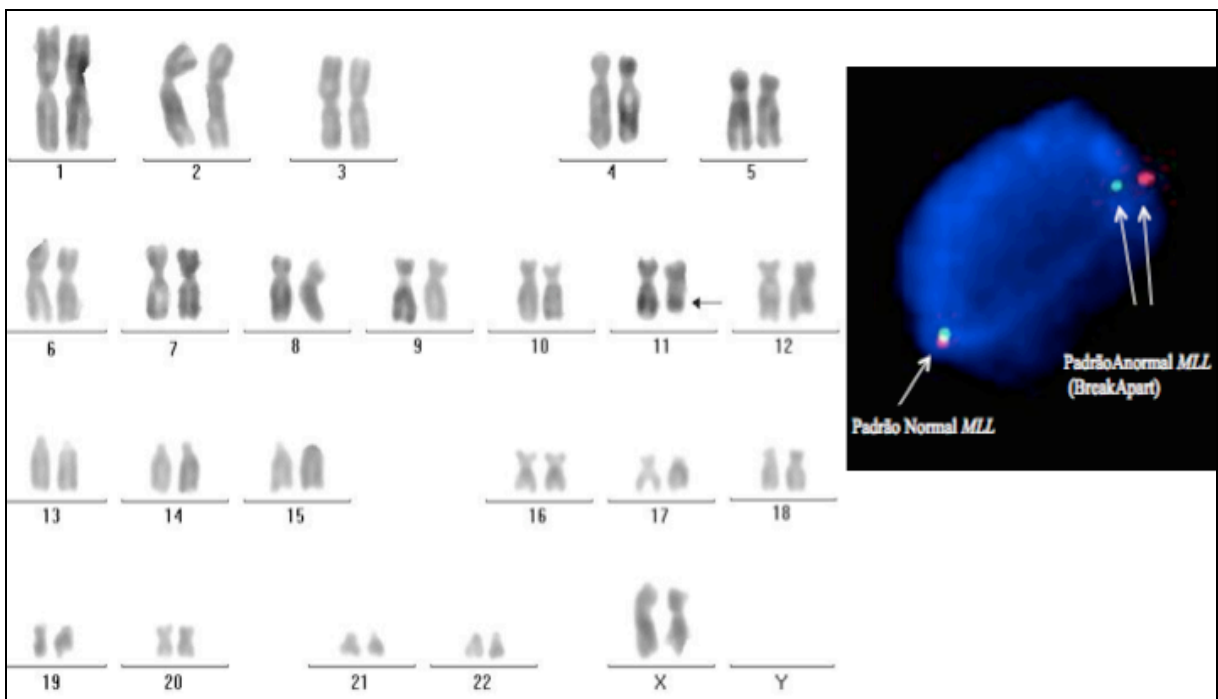


Figura 29. Resultado citogenético e de FISH do paciente 7. À esquerda cariótipo do clone celular anormal onde pode ser observada deleção terminal do braço longo do cromossomo 11 (46,XX,del(11)(q23)[9]/46,XX[5]). À direita resultado da FISH demonstrando a presença dos dois alelos do gene *MLL*, um com padrão de expressão normal e o outro com padrão anormal.

5.4.3 Gene *RB*

O único paciente (registro 26) com alteração envolvendo o gene *RB* possuía cariótipo de prognóstico favorável. A figura 30 demonstra os resultados de citogenética e FISH para o paciente de registro 26.

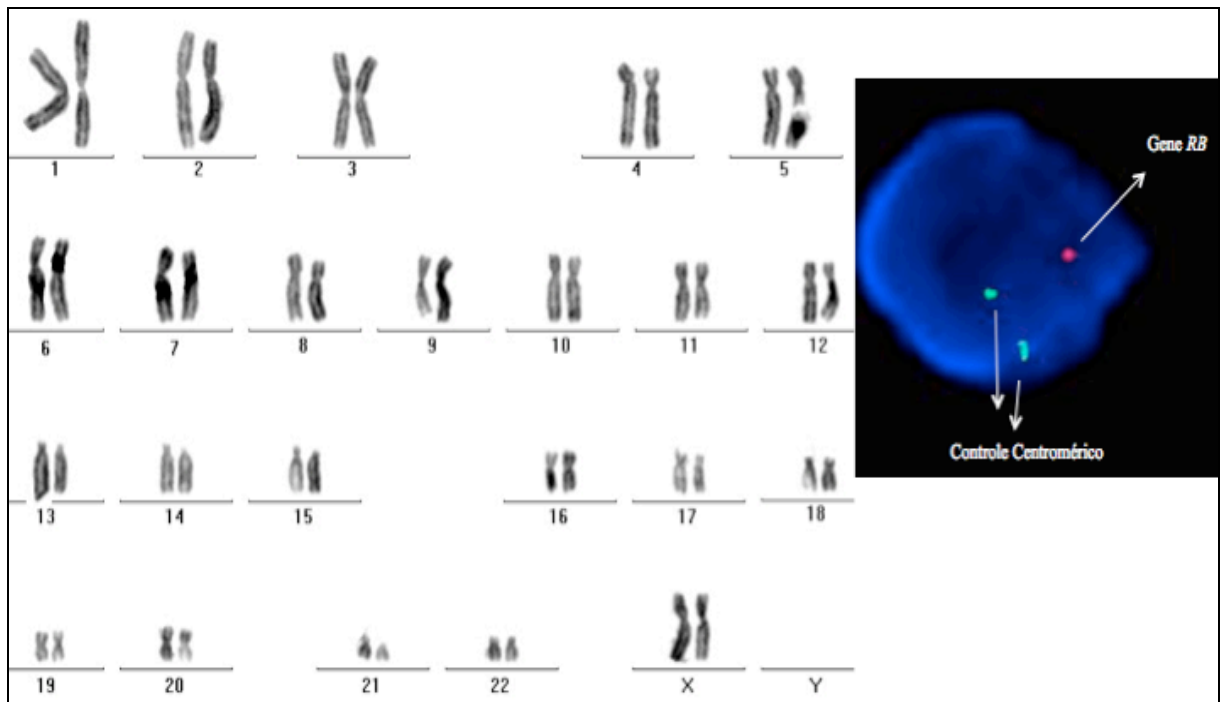


Figura 30. Resultado citogenético e de FISH do paciente 26. À esquerda cariótipo sem aparentes alterações numéricas ou estruturais (46,XX). À direita resultado da FISH demonstrando deleção de um dos alelos do gene *RB*.

6 DISCUSSÃO

As síndromes mielodisplásicas (SMDs) representam um grupo heterogêneo de doenças clonais que acometem a célula hematopoética pluripotente, caracterizando-se por citopenias, displasias em uma ou mais linhagens celulares, hematopoese ineficiente, além do risco aumentado de progressão para LMA. O processo fisiopatológico do qual resulta a doença é bastante complexo e multivariado, porém acredita-se que as alterações genéticas que desestabilizam o genoma, as alterações no estroma medular, a exposição ambiental e/ou ocupacional à agentes carcinogênicos, bem como a própria senescência hematopoética sejam os eventos primários relacionados com o desencadeamento da doença (SCOTT; DEEG, 2010; MUFTI, 2004)

As SMDs acometem principalmente pacientes idosos com idade acima de 60 anos, sendo observada nestes pacientes a predominância do sexo masculino (BARZI; SEKERES, 2010; MUFTI, 2004; HARRIS *et al.*, 1999; SEKERES, 2010). Em nossa população de estudo não foi observada predominância de sexo ou de faixa etária. A mediana de idade obtida foi de aproximadamente 61 anos. Nossos resultados foram discordantes com os relatados na literatura, mas próximos aos obtidos por Wang *et al.* (2010) ao estudarem uma série de 435 pacientes portadores de SMD.

Com relação à classificação OMS para SMD e ao sistema de escore prognóstico, IPSS, observamos que a maioria dos nossos pacientes (52%) foram classificados como citopenia refratária com displasias multilinhagens (CRDM) e 61% foram estratificados como sendo de risco intermediário - 1 (INT-1). Nossos resultados referentes à classificação OMS foram semelhantes aos obtidos por Della Porta *et al.* (2011) em dois estudos de coorte realizados nas cidades de Pavia (Itália) e Duesseldorf (Alemanha), onde a classificação CRDM foi mais prevalente nos pacientes avaliados, 35% e 46% respectivamente, e também ao reportado por Magalhães *et al.* (2010) em um levantamento clínico-epidemiológico de 476 pacientes com SMD diagnosticados em 12 centros brasileiros. Os resultados obtidos por Della Porta *et al.* (2011) e por Shah *et al.* (2009), referentes ao IPSS, demonstraram que a estratificação de risco INT-1 foi a mais prevalente, assim como o detectado em nosso estudo.

Em se tratando de doenças onco-hematológicas, em especial as SMDs, o estudo citogenético para detecção de aberrações cromossômicas desempenha um importante papel como auxílio diagnóstico, bem como na definição de prognóstico, servindo também como guia na tomada de decisão para escolha de conduta terapêutica. Em nosso estudo detectamos

alterações citogenéticas em aproximadamente 78% dos pacientes, sendo este valor superior aos descritos na literatura, onde alterações citogenéticas podem ser observadas em torno de 40 a 60% dos casos de SMD (BRUNNING *et al.*, 2008; COSTA *et al.*, 2010; PARLIER *et al.*, 1994; WANG *et al.*, 2010). Acreditamos que a alta taxa de detecção obtida neste estudo esteja diretamente relacionada com o curto tempo compreendido entre a obtenção do material medular (punção) e a realização de sua cultura, onde, dessa forma, foi possível preservar a viabilidade das células patológicas permitindo que as mesmas continuassem seu processo de divisão *in vitro*.

Cariótipo complexo (com três ou mais alterações por núcleo) é observado em cerca de 15% de todos os casos de SMD ou em aproximadamente 30% de todos os casos com algum tipo de alteração (HAASE, 2008). Em nosso estudo conseguimos detectar a presença de cariótipos complexos em cerca de 31% dos pacientes, corroborando com o descrito na literatura (PINHEIRO; CHAUFFAILLE, 2009) e semelhante ao reportado por Shah *et al.* (2009), que detectaram esse tipo de cariótipo em cerca de 25% dos pacientes avaliados em seu estudo.

Embora a citogenética clássica seja considerada a técnica padrão ouro para detecção de alterações cromossômicas em SMD, a análise por hibridização *in situ* por fluorescência (FISH) vem sendo cada vez mais utilizada como uma ferramenta de auxílio ao cariótipo, por se tratar de uma técnica mais sensível e por permitir a identificação de alterações no genoma de células que não estejam em divisão, o que possibilita mais adiante a detecção de pequenos clones celulares anormais e microdeleções não detectáveis pela baixa resolução da técnica de banda G (BERNASCONI *et al.*, 2003; BERNASCONI *et al.*, 2006). Neste estudo pesquisamos, através da FISH, possíveis alterações nos genes *MLL*, *RB* e *TP53*.

Em nosso estudo foi possível detectar alteração do gene *TP53* em cerca de 9% de todos os pacientes avaliados (registros 2, 6 e 31). Nossa incidência está de acordo com o descrito na literatura de que mutações envolvendo esse gene podem ocorrer em cerca de 5 a 10% dos casos de SMD (ADAMSON *et al.*, 1995; FELIX *et al.*, 1996; JONVEAUX *et al.*, 1991; KANEKO *et al.*, 1995; KITAGAWA *et al.*, 1994; LUDWIG *et al.*, 1992; MORI *et al.*, 1995; SUGIMOTO, *et al.*, 1993).

Analisando os resultados do paciente 31 demonstrados na figura 25, nota-se que a técnica de FISH permitiu identificar a deleção de um dos alelos do gene *TP53*, alteração esta não detectada pela citogenética clássica, possivelmente por se tratar de uma deleção pontual e não poder ser visualizada pela baixa resolução da técnica de banda G. Neste paciente, a hibridização *in situ* por fluorescência permitiu identificar a deleção do gene, demonstrando

assim uma das principais aplicações desta metodologia que é a detecção à nível molecular de alterações gênicas, principalmente quando a região deletada é muito pequena (menor que 4Mb) ou quando ocorre em regiões de banda clara (regiões crípticas), dificultando sua detecção pela citogenética clássica.

Para o paciente 6, resultados demonstrados na figura 26, a citogenética clássica foi capaz de detectar a deleção terminal do braço curto de um dos cromossomos 17, região em que se localiza o gene *TP53* (17p13.3), entretanto, a técnica de FISH, além de permitir confirmar a deleção de um dos alelos do gene *TP53* detectado pela citogenética clássica, permitiu também identificar a deleção do outro alelo do gene, possivelmente por se tratar também de uma deleção pontual. Neste paciente a técnica de FISH permitiu identificar a perda de ambos os alelos do gene *TP53*, demonstrando assim ser uma técnica muito útil quando se necessita de confirmação de uma suposta alteração detectada pela citogenética clássica, mas também quando se quer pesquisar possíveis microalterações à nível molecular de genes chaves no processo de carcinogênese. Esse achado corrobora com o preconizado na literatura de que o FISH consiste em uma técnica mais sensível do que a citogenética clássica para detecção de pequenas deleções (RINGOLIN *et al.*, 2001).

Assim como ocorreu para o paciente 6, detectou-se também no paciente 2 (Figura 27), através da citogenética clássica, a existência de um clone patológico contendo deleção terminal do braço curto de um dos cromossomos 17, supostamente acarretando a deleção de um dos alelos do gene *TP53*, entretanto, o que se observou pela análise através da técnica de FISH foi uma amplificação do número de cópias do gene *TP53*, numa média de 10 cópias (marcações) por núcleo interfásico. Este achado não anula àquele observado pela citogenética clássica, pois realmente evidenciamos a deleção da região contendo o *locus* gênico do gene *TP53*, como demonstra o cariótipo deste paciente, porém, nesse caso, a FISH nos possibilitou identificar e deduzir que o suposto alelo não deletado sofreu, em algum momento durante o curso evolutivo da doença, amplificação em seu número de cópias, possivelmente como uma tentativa da própria célula em tentar frear a proliferação celular exacerbada, marca clássica das doenças neoplásicas. Neste paciente em especial, evidenciamos um fato oposto ao que se esperava observar no genoma de pacientes portadores de doenças neoplásicas, que foi a amplificação de um gene supressor tumoral ao invés de sua inativação e/ou deleção. Estes achados reforçam a idéia de que as SMDs constituem um grupo de doenças heterogêneas não somente nas suas diversas apresentações clínicas mas também nos mecanismos de gênese e progressão tumoral (HAASE, 2008).

Com relação ao gene *MLL*, a técnica de FISH permitiu detectar rearranjo deste gene em cerca de 6% dos paciente (registros 7 e 22). Nosso resultado foi próximo aos relatados na literatura (IBRAHIM *et al.*, 2000; PAPPAS *et al.*, 2004).

Observando o resultado citogenético do paciente 7 (Figura 29) nota-se a existência de deleção terminal no braço longo de um dos cromossomo 11, especificamente na região do 11q23, sítio de localização do gene *MLL*, entretanto, a hibridização *in situ* por fluorescência, por meio de sonda-DNA *BreakApart*, demonstrou que a região cromossômica, supostamente deletada, na realidade tinha sido rearranjada, porém, o tipo de rearranjo sofrido, bem como o destino final desse material dentro do conjunto genômico do paciente não pôde ser identificado por esta técnica. A não detecção do rearranjo da região do 11q23 pela citogenética clássica, provavelmente está diretamente ligada à baixa qualidade de resolução das metáfases analisadas, bem como às dificuldades técnicas na obtenção de padrões adequados de bandeamento cromossômico por meio da técnica de banda G, sendo todos estes fatores limitantes para o correto diagnóstico citogenético. Neste caso em especial, observa-se uma das grandes vantagens da FISH, anteriormente comentadas, de que trata-se de uma técnica muito mais sensível do que a citogenética clássica, e que diferentemente desta, não necessita de preparados cromossômicos de boa qualidade para sua correta análise, podendo ser útil em casos em que não houve crescimento celular (COSTA *et al.*, 2010).

O paciente 22 (Figura 28) por sua vez não apresentou, na análise por citogenética clássica, nenhuma alteração envolvendo a região do 11q23, embora tenha sido observada uma deleção intersticial do braço longo do cromossomo 5. Entretanto, a técnica de FISH demonstrou que praticamente todos os núcleos interfásicos analisados detinham rearranjo da região 11q23, alteração esta que interfere diretamente na regulação da expressão do gene *MLL*, porém, assim como no paciente 7, o tipo de rearranjo sofrido não pôde ser identificado por esta técnica. Mais uma vez ficando evidenciado a maior sensibilidade do FISH frente a citogenética clássica e também a necessidade de se tentar, sempre que possível, aliar as duas técnicas para melhor compreensão da cinética dos eventos genéticos relacionados com o processo de carcinogênese e também melhor delineamento dos esquemas terapêuticos.

Em apenas um paciente (3% do total de pacientes estudados) foi observada alteração envolvendo o gene *RB*. Nosso resultado foi concordante com o estabelecido na literatura de que apenas 2% dos pacientes com SMD possuem alterações envolvendo o gene *RB* (NAGAMURA *et al.*, 2003). Analisando o resultado do paciente 26 (Figura 30), nota-se que a citogenética clássica, assim como em outros casos já descritos, não foi capaz de detectar a deleção de um dos alelos do gene *RB*, assim como ocorreu com a técnica de FISH. O

mecanismo pelo qual a mutação e/ou deleção deste gene influencia no processo de carcinogênese e progressão tumoral em pacientes com SMD não está totalmente elucidado (NAGAMURA *et al.*, 2003).

Em dois pacientes (registros 5 e 10) foi observada, durante a pesquisa utilizando sonda para marcação do gene *TP53*, a presença de um pequeno número de núcleos interfásicos contendo mais de duas marcações controle (região centromérica do cromossomo 17), média de seis sinais por núcleo, e duas marcações do gene *TP53*, padrão de normalidade. Este achado não se repetiu quando se utilizaram as outras sondas do estudo. Em ambos os pacientes o resultado citogenético acusou a presença de uma suposta deleção do *locus* gênico do *TP53*, sendo estes resultados descartados pela FISH ao demonstrar a presença de ambos os alelos do gene nos dois pacientes. Provavelmente o material supostamente deletado em realidade tenha sido translocado, permanecendo assim dentro do genoma dos núcleos, sendo esta não detecção justificada pela baixa qualidade da resolução da técnica. A FISH foi ainda capaz de detectar pequeno percentual de núcleos com composição hiperdiplóide (>46 cromossomos), não detectado pela citogenética especialmente no paciente 5 (no paciente 10 a citogenética demonstrou hiperdiploidia), sendo que as cópias extras dos cromossomos 17 não necessariamente apresentavam a presença de cópias extras do gene *TP53* (apenas duas marcações por núcleo) em ambos os pacientes.

Muitos pesquisadores acreditam que a frequência de aberrações cromossômicas detectadas pela citogenética clássica utilizando técnica de banda G seja, em sua maioria, subestimada em diversos centros de investigação, em decorrência da dificuldade inerente à técnica que impossibilita a obtenção de preparados cromossômicos com boa qualidade morfológica (RIGOLIN *et al.*, 2001; ROMEO *et al.*, 2002). Diante de tal fato, inúmeros centros e pesquisadores adotaram o FISH como técnica de suporte ao cariótipo a fim de auxiliar o processo de detecção de alterações em casos com ausência de crescimento celular ou com baixa qualidade cromossômica. Normalmente eles utilizam painéis de sondas-DNA contra os principais *hot-spots* detectados nas SMDs, que são: del(5q)/-5, del(7q)/-7, del(20q), +8 e -Y, entretanto, diversos pesquisadores demonstraram que a utilização de FISH fornece dados relevantes somente em casos onde o estudo citogenético clássico não obteve sucesso ou em ordem de confirmar aquelas alterações relacionadas com prognóstico (BEYER *et al.*, 2004; COSTA *et al.*, 2010; CHERRY *et al.*, 2003; YANG *et al.*, 2010)

Em nosso estudo optamos por avaliar alterações em três genes importantes no processo de carcinogênese e progressão tumoral relacionados com SMDs e a outros tipos de neoplasias, almejando obter assim informações pertinentes que pudessem agregar valor

preditivo prognóstico aos pacientes avaliados. Observamos que nos seis pacientes que apresentaram alteração em um dos três genes investigados, o FISH forneceu informações que confirmaram, alteraram e/ou descartaram os previamente obtidos pela citogenética clássica. Em três destes pacientes (registros 22, 26 e 31) a presença destas alterações modificariam o valor prognóstico da citogenética de favorável para intermediário, podendo até mesmo influenciar o resultado IPSS destes pacientes. No caso do paciente 22 em especial, o resultado obtido pelo FISH teria sido de grande valia se detectado no momento diagnóstico em conjunto com citogenética clássica, pois provavelmente teria modificado a conduta terapêutica, uma vez que a presença de deleção do braço longo do cromossomo 5 como alteração única é decisório para escolha da droga imunomodulatória lenalidomida (KOTLA *et al.*, 2009).

Dessa forma, acreditamos que, assim como o sugerido por outros pesquisadores (KWON *et al.*, 2010; PINHEIRO; CHAUFFAILLE, 2010; YANG *et al.*, 2010), a técnica de FISH seja empregada, sempre que possível, concomitantemente com o estudo de citogenética clássica e que os painéis de sondas pesquisadas sejam ampliados de maneira tal que possam abranger a detecção de alterações não somente relacionados com os principais *hot-spots*, mas também de sítios chaves contendo genes sabidamente relacionados com a fisiopatologia e evolução clínica e biológica das SMDs.

7 CONCLUSÕES

- A maioria dos pacientes incluídos no estudo possuíam algum tipo de alteração citogenética, variando de anormalidades como -5/5q-, -7/7q-, 20q- e -Y de forma isolada até cariótipos complexos. As principais alterações citogenéticas foram relacionadas com deleções, adições, aneuploidias e presença de cromossomo marcador;
- Alteração nos genes avaliados foi observada em 18% dos pacientes com SMD;
- O gene *MLL* esteve alterado em 6% dos pacientes com SMD avaliados no estudo;
- O gene *RB* esteve alterado em 3% dos pacientes com SMD avaliados no estudo;
- O gene *TP53* esteve alterado em 9% dos pacientes com SMD avaliados no estudo;
- Nos pacientes em que a alteração foi observada, a FISH proveu informações que adicionaram, confirmaram ou alteraram o resultado previamente emitido pela citogenética clássica, sendo estas uma das principais aplicações desta técnica devido sua alta sensibilidade quando comparada ao método clássico.

REFERÊNCIAS

- ADAMSON, D. J. A.; DAWSON, A. A.; BENNETT, B.; KING, D. J.; HAITES, N. E. P53 mutations in the myelodysplastic syndromes. **Br. J. Haematol.**, v. 89, p. 61-66, 1995.
- ALARCON-VARGAS, D.; RONAI, Z. P53-Mdm2 the affair that never ends. **Carcinogenesis**, v. 23, n. 4, p. 541-547, 2002.
- ANSARI, K. I.; MANDAL, S. S. Mixed lineage leukemia: roles in gene expression, hormone signaling and mRNA processing. **FEBS J.**, v. 277, n. 8, p. 1790-1804, 2010.
- ARRUDA, L. G. R. **Neoplasias escamosas intra-epiteliais e invasoras da vulva**: Expressão de receptores de estrogênio e de progesterona, de p53 e de Ki67 (MIB1) segundo a progressão tumoral. Dissertação (Mestrado em Patologia) – Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2004.
- BALLESTEROS CASTAÑEDA, D.; GONZALEZ, P. A.; RIASCOS ORTEGA, M. R.; ZAMBRANO TORRES, H. I. Proteína p53: sinais e o papel no processo de carcinogênese. *Rev. cir. traumatol. Buco-Maxilo-fac.*, v. 7, n. 2, p. 37-54, 2007.
- BARCH, M. J.; KNUTSEN, T.; SPURBECK, J. L. (Ed.). **The AGT cytogenetics laboratory manual**. 3th ed. Philadelphia: Lippincott-Raven. 1997.
- BARZI, A.; SEKERES, M. A. Myelodysplastic syndromes: a practical approach to diagnosis and treatment. **Cleveland Clin. N. J. Med.**, v. 77, n. 1, p. 37-44, 2010.
- BENNETT, J. M.; CATOVSKY, D.; DANIEL, M. T.; GALTON, D. A.; GRALNICK, H. R.; SULTAN, C. Proposals for the classification of the myelodysplastic syndromes. **Br. J. Haematol.**, v. 51, p. 189-199, 1982.
- BENNETT, J. M.; CATOVSKY, D.; DANIEL, M. T.; GALTON, D. A.; GRALNICK, H. R.; SULTAN, C. Proposed revised criteria for the classification of acute myeloid leukemia. **Ann. Intern. Med.**, v. 103, p. 626-629, 1985.
- BENSAAD, K.; VOUSDEN, K. H. p53: new roles in metabolism. **Trends Cell Biol.**, v. 17, p. 286-291, 2007.
- BERNASCONI, P.; BONI, M.; CAVIGLIANO, P. M.; CALATRONI, S.; GIARDINI, I.; ROCCA, B.; ZAPPAROTE, R.; DAMBRUOSO, I.; CARESANA, M. Clinical relevance of cytogenetics in myelodysplastic syndromes. **Ann. N.Y. Acad. Sci.**, v. 1089, p. 395-410, 2006.
- BERNASCONI, P.; CAVIGLIANO, P. M.; BONI, M.; CALATRONI, S.; KLERSY, C.; GIARDINI, I.; ROCCA, B.; CROSETTO, N.; CARESANA, M.; LAZZARINO, M.; BERNASCONI, C. Is FISH a relevant prognostic tool in myelodysplastic syndrome with a normal chromosome pattern on conventional cytogenetics? A study on 57 patients. **Leukemia**, v. 17, p. 2107-2112, 2003.

BEYER, V.; CASTAGNE, C.; MUHLEMATTER, D.; PARLIER, V.; GMUR, J.; HESS, U.; KOVACSOVICS, T.; MEYER-MONARD, S.; TICHELLI, A.; TOBLER, A.; JACKY, E.; SCHANZ, U.; BARGETZI, M.; HAGEMEIJER, A.; DE WITTE, T.; VAN MELLE, G.; JOTTERAND, M. Systematic screening at diagnosis of -5/del(5)(q31), -7, or chromosome 8 aneuploidy by interphase fluorescence in situ hybridization in 110 acute myelocytic leukemia and high-risk myelodysplastic syndrome patients: concordances and discrepancies with conventional cytogenetics. **Cancer Genet. Cytogenet.**, v. 152, n. 1, p. 29-41, 2004.

BORGES, H. L.; HUNTON, I. C.; WANG, J. Y. Reduction of apoptosis in Rb-deficient embryos via Abl knockout. **Oncogene**, v. 26, p. 3868-3877, 2007.

BOUSCARY, D.; DE VOS, J.; GUESNU, M.; JONDEAU, K.; VIGUIER, F.; MELLE, J.; DREYFUS, F.; FONTENAY-ROUPIE, M. Fas.Apo-1(CD95) expression and apoptosis in patients with myelodysplastic syndromes. **Leukemia**, v. 11, p. 839-845, 1997.

BRUNNING, R. D.; ORAZI, A.; GERMING, U.; LE BEAU, M. M.; PORWIT, A.; BAUMAN, I.; VARDIMA, J. W.; HELLSTRÖM-LINDBERG, E. Myelodysplastic syndromes/Neoplasms, overview. In: SWERDLOW, S.H.; CAMPO, E.; HARRIS, N. L.; JAFFE, E.S.; PILERI, S. A.; STEIN, H. **WHO classification of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues**. Lyon: IARC, 2008. p. 88-93.

BURKHART, D. L.; NGAI, L. K.; ROAKE, C. M.; VIATOUR, P.; THANGAVEL, C.; HO, V. M.; KNUDSEN, E. S.; SAGE, J. Regulation of RB transcription in vivo by RB family members. **Mol. Cell. Biol.**, v. 30, p. 1729-1745, 2010.

CAZZOLA, M.; MALCOVATI, L. Prognostic classification and risk assessment in myelodysplastic syndromes. **Hematol. Oncol. Clin. N. Am.**, v. 24, n. 2, p. 459-468, 2010.

CHAU, B. N.; WANG, J. Y. J. Coordinated regulation of life and death by RB. **Nature Rev. Cancer**, v. 3, p. 130-138, 2003.

CHAUFFAILE, M. L. L. F.; COUTINHO, V.; YAMAMOTO, M.; KERBAUY, J. Combined method for simultaneous morphology, immunophenotype and karyotype (MAC) in leukemias. **São Paulo Med. J.**, v. 115, n. 1, p. 1336-1342, 1997.

CHERRY, A. M.; BROCKMAN, S. R.; PATERNOSTER, S. F.; HICKS, G. A.; NEUBERG, D.; HIGGINS, R. R.; BENNETT, J. M.; GREENBERG, P. L.; MILLER, K.; TALLMAN, M. S.; ROWE, J.; DEWALD, G. W. Comparison of interphase FISH and metaphase cytogenetics to study myelodysplastic syndrome: an Eastern Cooperative Oncology Group (ECOG) study. **Leuk Res.**, v. 27, n. 12, p. 1085-1090, 2003.

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

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

COSGROVE, M. S.; PATEL, A. Mixed Lineage Leukemia- a structure-function perspective of the MLL1 protein. **FEBS J.**, v. 277, p.1832-1842, 2010.

COSTA, D.; VALERA, S.; CARRIO, A.; ARIAS, A.; MUNOZ, C.; ROZMAN, M.; BELKAID, M.; COUTINHO, R.; NOMDEDEU, B.; CAMPO, E. Do we need to do fluorescence in situ hybridization analysis in myelodysplastic syndromes as often as we do? **Leuk. Res.**, v. 34, n. 11, p.1437-1441, 2010.

COSTA, S. V. **Participação de proteínas tirosina quinase ativada por mitógenos (MAPKs) na indução do fator inibidor de leucemia (LIF) em células estromais da medula óssea de crianças com síndromes mielodisplásicas (SMD)**. 2008. 102 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

DASSER, A.; RABBITS, T. H. The versatile mixed lineage leukaemia gene MLL and its many associations in leukaemogenesis. **Semin. Cancer Biol.**, v. 15, n. 3, p. 175-188, 2005.

DELLA PORTA, M. G.; MALCOVATI, L.; STRUPP, C.; AMBAGLIO, I.; KUENDGEN, A.; ZIPPERER, E.; TRAVAGLINO, E.; INVERNIZZI, R.; PASCUTTO, C.; LAZZARINO, M.; GERMING, U.; CAZZOLA, M. Risk stratification based on both disease status and extra-hematologic comorbidities in patients with myelodysplastic syndrome. **Haematologica**, v. 96, n. 3, p 441-449, 2011.

DU, W.; POGORILER, J. Retinoblastoma Family Genes. **Oncogene**, v. 25, n. 38, p. 5190-5200, 2006.

EGUCHI, M.; EGUCHI-ISHIMAE, M.; GREAVES, M. The role of the MLL gene in infant leukemia. **Int. J. Hematol.**, v. 78, n. 5, p. 390-401. 2003.

FELIX, C. A.; HOSLER, M.R.; PROVVISOR, D.; SALHANY, K.; SEXSMITH, E. A.; SLATER, D.; CHEUNG, N. K.; WINICK, N. J.; STRAUSS, E. A.; HEYN, R.; LANGE, B.J.; MALKIN, D. The p53 gene in pediatric therapy-related leukemia and myelodysplasia. **Blood**, v. 87, n. 10, p. 4376-4381, 1996.

FITCHETT, M.; GRIFFITHS, M. J.; OSCIER, D. G.; JOHNSON, S.; SEABRIGHT, M. Chromosome abnormalities involving band 13q14 in hematologic malignancies. **Cancer Genet. Cytogenet.**, v. 24, p. 143-150, 1987.

FLORES-FIGUEIROA, E.; GUTIÉRREZ-ESPÍNOLA, G.; MONTESINOS, J. J.; ARANA-TREJO, R.M.; MAYANI, H. In vitro characterization of hematopoietic microenvironment cells from patients with myelodysplastic syndromes. **Leuk. Res.**, v. 26,p. 677-686, 2002.

FREITAS, T. M. V. **O diagnóstico de aberrações cromossômicas estruturais: aplicações da citogenética molecular a resolução de casos indefinidos pelas técnicas clássicas.** 2004. 87 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Médica) - Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2004.

GERSEN, S. L.; KEAGLE, M. B. (Ed.). **The principles of clinical cytogenetics.** 2nd ed. Totowa: Humana Press, 2005. Disponível em: <<http://www.springerlink.com/content/u768121n31w26831/>>. Acesso em: 3 dez. 2010.

GREENBERG, P. L. Apoptosis and its role in the myelodysplastic syndromes: implications for disease natural history and treatment. **Leuk. Res.**, v. 22, n. 12, p. 1123-1136, 1998.

GREENBERG, P.; COX, C.; LEBEAU, M. M.; FENAUX, P.; MOREL, P.; SANZ, G.; SANZ, M.; VALLESPI, T.; HAMBLIN, T.; OSCIER, D.; OHYASHIKI, K.; TOYAMA, K.; AUL, C.; MUFTI, G.; BENNETT, J. International scoring system for evaluating prognosis in myelodysplastic syndromes. **Blood**, v. 89, n. 6, p. 2079-2088, 1997.

HAASE, D. Cytogenetic features in myelodysplastic syndromes. **Ann. Hematol.**, v. 87, n. 7, p. 515-526, 2008

HAINAULT, P.; HOLLSTEIN, M. P53 and Human Cancer: The first ten thousand mutations. **Adv. Cancer Res.**, v. 77, p. 81-137, 2000.

HALL, E. J. Etiology of cancer: physical factors. In: DE VITA JUNIOR, V. T.; HELLMAN, S.; Rosenberg, S. A. **Principles & practice of oncology.** 5th ed. Philadelphia: Lippincott-Raven, 1997. p. 203-218.

HARRIS, N. L.; JAFFE, E. S.; DIEBOLD, J.; FLANDRIN, G.; MULLER-HERMELINK, H. K.; VARDIMAN, J.; LISTER, J. A.; BLOOMFIELD, C. D. World Health Organization classification of neoplastic diseases of the hematopoietic and lymphoid tissues: report of the Clinical Advisory Committee meeting-Airlie House, Virginia, November 1997. **J. Clin. Oncol.**, v. 17, p. 3835-3849, 1999.

HESS, J. L. MLL: a histone methyltransferase disrupted in leukemia. **Trends Mol. Med.**, v. 10, n. 10, p. 500-507, 2004.

HSIEH, R. **Expressão da proteína p16, ciclina D1, CDK4 e proteína do retinoblastoma no melanoma acral lentiginos.** 2008. 99 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

IBRAHIM, S.; ESTEY, E. H.; PIERCE, S.; GLASSMAN, A.; KEATING, M.; O'BRIEN, S.; KANTARJIAN, HAGOP M.; ALBITAR, M. 11q23 Abnormalities in patients with acute myelogenous leukemia and myelodysplastic syndrome as detected by molecular and cytogenetic analyses. **Am. J. Clin. Pathol.**, v. 114, p.793-797, 2000.

ISCN. In: SHAFFER, L. G.; SLOVAK, M. L.; CAMPBELL, L. J. (Ed.). **An international system for human cytogenetic nomenclature**. Basel: S. Karger, 2009.

JOERGER, A. C.; FERSHT, A.R. Structural biology of the tumor suppressor p53. **Annu. Rev. Biochem.**, v. 77, p. 557-582, 2008.

JONVEAUX, P. H.; FENAUX, P.; QUIQUANDON, I.; PIGNON, J. M.; LAI, J. L.; LOUCHEUX-LEFEBVRE, M. H.; GOOSSENS, M.; BERGER, R. Mutations in the p53 gene in myelodysplastic syndromes. **Oncogene**, v. 6, n. 12, p. 2243-2247, 1991.

JOHNSON, D. D.; DEWALD, G. W.; PIERRE, R. V.; LETENDRE, L.; SILVERSTEIN, M. N. Deletions of chromosome 13 in malignant hematologic disorders. **Cancer Genet. Cytogenet.**, v. 18, p. 235-241, 1985.

KAGHAD, M.; BONNET, H.; YANG, A.; CREANCIER, L.; BISCAN, J. C.; VALENT, A.; MINTY, A.; CHALON, P.; LELIAS, J. M.; DUMONT, X.; FERRARA, P.; MCKEON, F.; CAPUT, D. Monoallelically expressed gene related to p53 at 1p36, a region frequently deleted in neuroblastoma and other human cancers. **Cell**, v. 90, v. 4, p. 809-819, 1997.

KANEKO, H.; MISAWA, S.; HORIIKE, S.; NAKAI, H.; KASHIMA, K. TP53 mutations emerge at early phase of myelodysplastic syndrome and are associated with complex chromosomal abnormalities. **Blood**, v. 85, n. 8, p. 2189-2193, 1995.

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

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

KOTLA, V.; GOEL, S.; NISCHAL, S.; HEUCK, C.; VIVEK, K.; DAS, B.; VERMA, A. Mechanism of action of lenalidomide in hematological malignancies. **J. Hematol. Oncol.**, v. 2, n. 36, 2009.

KWON, W. K.; LEE, J. Y.; MUN, Y. C.; SEONG, C. M.; CHUNG, W. S.; HUH, J. Clinical utility of FISH analysis in addition to G-banded karyotype in hematologic malignancies and proposal of a practical approach. **Korean J. Hematol.**, v. 45, n. 3, p.171-176, 2010.

LEBRUN, A.; LAVERY, R.; WEINSTEIN, H. Modeling multi-component protein-DNA complexes: the role of bending and dimerization in the complex of p53 dimers with DNA. **Protein Eng.**, v. 14, n. 4, p. 233-243, 2001.

LIPINSKI, M. M.; JACKS, T. The retinoblastoma gene family in differentiation and development. **Oncogene**, v. 18, p. 7873-7882, 1999.

LIU, H.; CHENG, E. H.; HSIEH, J.J. MLL fusions: pathways to leukemia. **Cancer Biol. Ther.**, v. 8, n. 13, p. 1204-1211, 2009.

LUDWIG, L.; SCHULZ, A. S.; JANSSEN, J. W. G.; KURT, G.; BARTRAN, C. R. P53 mutations in myelodysplastic syndromes. **Leukemia**, v. 6, n. 12, p. 1302-1304, 1992.

MAGALHÃES, S. M.M.; MADEIRA, T. S.; BITTENCOURT, R.; VELLOSO, E.; CHAUFFAILE, M. L.; AZEVEDO, A. A.; FAGUNDES, E. M.; ZANICHELLI, M. A.; BONFIM, G.; MELO, L. N.; TAVARES, R. S.; BORTOLHEIRO, T. C. Epidemiological and clinicalpatological data from the Brazilian registry of patients with myelodysplastic syndrome and comparative analysis between different geographic áreas. **Blood**, v. 116, p. 1884, 2010.

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

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

MARSCHALEK, R. Mixed lineage leukemia: roles in human malignancies and potential therapy. **FEBS J.**, v. 277, p. 1822–1831, 2010.

MAY, P.; MAY, E. Twenty years of p53 research: structural and functional aspects of the p53 protein. **Oncogene**, v. 18, n. 53, p. 7621-7636, 1999.

MILLAU, J.-F.; MAI, S.; BASTIEN, N.; DROUIN, R. p53 functions and cell lines: Have we learned the lessons from the past? **BioEssays**, v. 32, p. 392-400, 2010.

MORI, N.; HIDAI, H.; YOKOTA, J.; OKADA, M.; MOTOJI, T.; OSHIMI, K.; MIZOGUCHI, H. MUTATIONS OF The p53 gene in myelodysplastic syndrome and overt leukemia. **Leuk. Res.**, v. 19, n. 11, p. 869-875, 1995.

MORIS, C. M.; COCHRANE, J. M.; BENJES, S. M.; CROSSEN, P. E.; FITZGERALD, P. H. Molecular definition of interstitial deletions of chromosome 13 in leukemic cells. **Genes Chromosomes Cancer**, v. 3, p. 455-460, 1991.

MORON, R. A. **Expressão de p53, p16^{ink4a}, p21^{Waf1/cip1}, p21^{Ras} e p27^{Kip1/cip1} em pacientes com adenocarcinoma gástrico com invasão da submucosa submetidos a gastrectomia com linfadenectomia D2.** 2009. 96 f. Dissertação (Mestrado em Cirurgia) – Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, 2009. Disponível em: <<http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/5/5154/tde-10052010-164131/pt-br.php>>. Acesso em: 3 dez. 2010.

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

NAEIM, F.; RAO, P. N.; GRODY, W. W. **Hematopathology**: morphology, immunophenotype, cytogenetics, and molecular approaches. Amsterdam: Elsevier, 2008. Disponível em: <http://pathologybooks.co.uk/acatalog/9780123706072_M5406.html>. Acesso em: 3 dez. 2010.

NAGAMURA, F.; TAKABE, T.; TAKAHASHI, S.; OHNO, N.; UCHIMARU, K.; OGAMI, K.; ISEKI, T.; TOJO, A.; ASANO, S. One allele deletion of the *RBI* gene in a case of refractory anemia with del(13)(q12q14): a fluorescence in situ hybridization study of the *RBI* gene. **Cancer Genet. Cytogenet.**, v. 146, n. 1, p. 77-80, 2003.

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

NURSE, P. A long twentieth century of the cell cycle and beyond. **Cell**, v. 100, n. 1, p. 71-78, 2000.

PAPPA, V.; YOUNG, B. D.; ECONOMOPOULOS, T.; PAPAGEORGIOU, E.; PANANI, A.; LILINGTON, D.; BOLLAS, G.; STAMOULI, M.; KONTSIOTI, F.; TSIOTRA, P.; VESSALAS, G.; DERVENOULAS, J.; RAPTIS, S. Absence of MLL gene rearrangement in de novo myelodysplastic syndromes (MDS). **Ann. Hematol.**, v. 83 n. 3, p. 170-175, 2004

PARLIER, V.; van MELLE, G.; BERIS, P.; SCHIDMIT, P. M.; TOBLER, A.; HALLER, et al. Hematologic, clinical and cytogenetic analysis in 109 patients with primary myelodysplastic syndrome. Prognostic significance of morphology and chromosomes findings. **Cancer Genet. Cytogenet.**, v. 78, p. 219-231, 1994.

PERDIGÃO, J.; TAVARES, A. Ciclo celular e novas terapias contra o cancro (o ano do Nobel). **Bol. Biotecnol.**, v. 70, p. 7-14, 2001.

PINHEIRO, R. F.; CHAUFFAILLE, M. L. L. F. Comparison of I-FISH and G-banding for the detection of chromosomal abnormalities during the evolution of myelodysplastic syndrome. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 42, n. 11, p. 1110-1112, 2009.

POZNIC, M. Retinoblastoma protein: a central processing unit. **J. Biosci.**, v. 34, n. 2, p. 305-312, 2009.

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

RIBEIRO, E.; LIMA, C. S. P.; METZE, K.; LORAND-METZE, I. Flow cytometry analysis of the expression of Fas/FasL in bone marrow CD34+ cells in myelodysplastic syndromes: Relation to disease progression. **Leuk. Lymphoma**, v. 45, p. 309-313, 2004.

RIBIZZI, I.; DARNOWSKI, W.; GOULETT, F. A Amifostine cytotoxicity and reduction of apoptosis in a human myelodysplastic cell line. **Leuk. Res**, v. 24, p. 519-525, 2001.

RIGOLIN, G. M.; BIGONI, R.; MILANI, R.; CAVAZZINI, F.; ROBERTI, M. G.; BARDI, A.; AGOSTINI, P.; DELLA PORTA, M.; TIEGHI, A.; PIVA, N.; CUNEO, A.; CASTOLDI, G. Clinical importance of interphase cytogenetics detecting occult chromosome lesions in myelodysplastic syndromes with normal karyotype. **Leukemia**, v. 15, p. 1841-1847, 2001.

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

RÖMER, L.; KLEIN, C.; DEHNER, A.; KYESSLER, H.; BUCHNER, J. p53 - a natural cancer killer: structural insights and therapeutic concepts. **Angew. Chem. Int. Ed. Engl.**, v. 45, n. 39, p. 6440-6460, 2006.

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

SANDBERG, A. A.; CHEN, Z. FISH analysis. In: FAGUET, G. B. **Hematologic malignancies: methods and techniques**. Totowa: Elsevier, 2001. p. 19-42. Disponível em: <<http://www.springerlink.com/content/n483157288592w2u/#section=83797&page=1>>. Acesso em: 3 dez. 2010.

SHAH, N. M.; PRAJAPATI, S. G.; ADESARA, R. P.; PATEL, A. P. An analysis of 30 cases of myelodysplastic syndrome. **Indian J. Pathol. Microbiol.**, v. 52, n. 2, p. 206-209, 2009.

SCHAFFER, K. A. The cell cycle: a review. **Vet. Pathol.**, v. 35, p. 461-478, 1998.

SCOTT, B. L.; DEEG, H. J. Myelodysplastic syndromes. **Annu. Rev. Med.**, v. 61, p. 345-358, 2010.

SEKERES, M. A. The epidemiology of myelodysplastic syndromes. **Hematol. Oncol. Clin. N. Am.**, v. 24, p. 287-294, 2010.

SLANY, R. K. The molecular biology of mixed lineage leukemia. **Haematologica**, v. 94, n. 7, p. 984-992, 2009.

STETLER-STEVENSON, M.; ARTHUR, D. C.; JABBOUR, N.; XIE, X. Y.; MOLLDREM, J. A.; BARRETT, J.; VENZON, D.; RICK, M. E. Diagnostic utility of flow cytometric immunophenotyping in myelodysplastic syndrome. **Blood**, v. 98, p. 979-987, 2001.

SUGIMOTO, K.; HIRANO, N.; TOYOSHIMA, H.; CHIBA, S.; MANO, H.; TAKAKU, F.; YAZAKI, Y.; HIRAI, H. Mutations of the p53 gene in myelodysplastic syndrome (MDS) and MDS-derived leukemia. **Blood**, v. 81, n. 11, p. 3022-3026, 1993.

SUN, A.; BAGELLA, L.; TUTTON, S.; ROMANO, G.; GIORDANO, A. From G0 to S phase: a view of the roles played by the retinoblastoma (Rb) family members in the Rb-E2F pathway. **J. Cell Biochem.**, v. 102, n. 6, p. 1400-1404, 2007.

WANG, H.; WANG, X.; XU, X.; LIN, G. Cytogenetic features and prognosis analysis in Chinese patients with myelodysplastic syndrome: a multicenter study. **Ann. Hematol.**, v.89, n. 6, p. 535-444, 2010.

WEINBERG, R. A. The retinoblastoma protein and cell cycle control. **Cell**, v. 81, n. 3, p. 323-330, 1995.

WOJCIECH, W. (Ed.). **Cytogenetics, FISH and molecular testing in hematologic malignancies**. London: Informa UK, 2008. Disponível em: <http://www.ebooksx.com/Cytogenetics-FISH-and-molecular-testing-in-hematologic-malignancies_237092.html>. Acesso em: Acesso em: 3 dez. 2010.

WOO, R. A.; MCLURE, K. G.; LEES-MILLER, S. P.; RANCOURT, D.; LEE, P.W.K. DNA-dependent protein kinase acts upstream of p53 in response to DNA damage. **Nature**, v. 394, p.700-704, 1998.

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

YANG, W.; STOTLER, B.; SEVILLA, D. W.; EMMONS, F. N.; MURTY, V. V.; ALOBEID, B.; BHAGAT, G. FISH analysis in addition to G-band karyotyping: utility in evaluation of myelodysplastic syndromes? **Leuk. Res**, v. 34, n. 4, p420-425, 2010.

ZHANG, X. D.; QIN, Z. H.; WANG, J. The role of p53 in cell metabolism. **Acta Pharmacol. Sin.**, v. 31, n. 9, p. 1208-1212, 2010.

ZUKERMAN, V.; WOLYNIEC, K.; VOGT SIONOV, R.; HAUPT, S.; HAUPT, Y. Tumour suppression by p53: the importance of apoptosis and cellular senescence. **J. Pathol.**, v. 219, p. 3-15, 2009.

ANEXOS A

Cat Number: KBH-10112 For professional use only

English **Poseidon™ p53 (17p13) & SE 17 Control probe**

Introduction:
 The tumor protein p53 plays an essential role in the regulation of the cell cycle. Mutations of p53 that frequently occur in a number of different human cancers fail to bind the consensus DNA binding site, and hence cause the loss of tumor suppressor activity. Alterations of the TP53 gene occur not only as somatic mutations in human malignancies, but also as germline mutations in some cancer-prone families with Li-Fraumeni syndrome.

Intended use:
 The p53 (17p13) specific DNA Probe is optimized to detect copy numbers of the p53 gene region as 17p13. The Chromosome 17 Satellite enumeration (SE) probe is included to facilitate chromosome identification.

The probe is recommended to be used in combination with one of the Poseidon Parameter kits providing necessary reagents to perform FISH on various sample types for optimal results. (see also www.kreatech.com and look for ksa & reagents).

Critical region 1 (red):
 The p53 (17p13) specific DNA probe is direct-labeled with Phalloidin-Biotin485.

Control region 2 (green):
 The SE 17 control DNA probe is direct-labeled with Phalloidin-Biotin485.

Reagent:
 Poseidon probes are direct-labeled DNA probes provided in a ready-to-use format. Apply 10 µl of probe to sample area of approximately 22.5 x 22.5 mm.

Interpretation:
 Please refer to the instructions for use for the entire Poseidon FISH protocol.

The p53 (17p13) probe is designed as a dual-color assay to detect deletions at 17p13. Deletions involving the p53 gene region will show one red signal and two green signals at the chromosome 17 centromere control region (R20). Two single color red (R) and green (G) signals will identify the normal chromosomes 17 (R20G).

Expected Signal	Normal Signal/Pattern	Del(17p13)
R20G		

References:
 Armita J et al. 1987. Cancer Gene Cytogenet., 97: 97-100

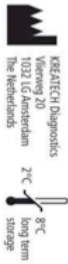
Dean J et al. 1986. Blood, 62: 802-809

AMXB-10112 R11.doc



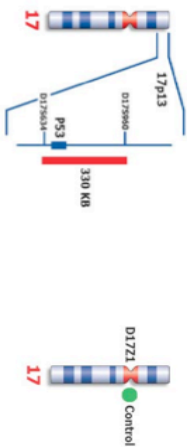
Application Manual

KBH-10112
 ON p53 (17p13) / SE 17



Published Feb. 2010

www.poseidon-diagnostics.com



ANEXO B

Cat Number: KBI-10303

For professional use only

English

Poseidon™ MLL (11q23) Break probe

Introduction:
One of the most important translocation in human acute myeloid leukemia (AML) and acute lymphoblastic leukemia (ALL) involves chromosome band 11q23, which rearranges with more than 30 other chromosomal regions. MLL translocations result in the generation of fusion protein that retain the MLL N-terminus, including one in ALL, known as a signal strand to repress DNA methyltransferase in all age groups and all phenotypes of leukemia, as 11q23 translocation carries a poor prognosis.

Intended use:
The MLL (11q23) Break probe is optimized to detect translocations involving the MLL gene region at 11q23 in a dual-color, split assay on metaphase/interphase spreads, blood smears and bone marrow cells.

Critical region 1 (red):
The probe is recommended to be used in combination with one of the Poseidon Probes for karyotyping necessary regions to predict t(8;21) or t(9;22) as a control sample type for split probes. (See also www.poseidon.com and ask for kit & reagents).

Critical region 2 (green):
The distal MLL gene region probe is associated with Phleum/Bcr/Abi50.

Reagent:
The proximal MLL gene region probe is associated with Phleum/Bcr/Abi55.

Interpretation:
Poseidon probes are direct-labeled DNA probes provided in a ready-to-use format. Apply 10 µl of probe to a sample area of approximately 2x2x22 mm.

Pluses refer to the instructions for Use for the entire Poseidon FISH product.

The MLL Break probe is designed as a dual-color split probe to detect in version or translocations at 11q23. A break is defined when a red/green or yellow fusion signal (7) splits into separate red and green signals. Only red and green signals are more than one signal diameter apart from each other are counted as a break. Chromatized red/green or yellow signals identify the normal chromosome(s) (1).

Signal patterns other than those described above may indicate variant translocations or other complex rearrangements. Investigators are advised to analyze metaphase cells for the interpretation of atypical signal patterns.

Normal Signal Pattern	11q23 Split
Esophageal Spread	7F
	1F:R:G

References:
Thirman M et al. 1993, New Engl. J. Med. 329: 909-914

Bocawer PL et al. 1996, Blood. 67: 1912-1922

AMMB110303, B7-2002



Application Manual

KBI-10303
ON MLL (11q23) Break

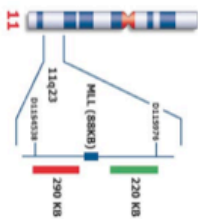


for EU only



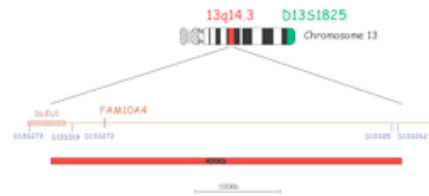
Published Feb 2010

www.poseidondiagnostics.com



ANEXO C

13q14.3 Deletion LPH006



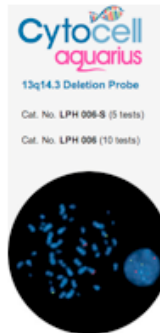
From Acute Lymphoblastic Leukaemia to Multiple Myeloma and non-Hodgkin's Lymphoma, deletions in 13q14 are common in B-cell neoplasms. Deletions are observed in 30% of karyotypically normal Multiple Myeloma patients and in over 20% of B-cell Chronic Lymphocytic Leukaemia (CLL) patients. A further 20% have microscopic deletions and 10% exhibit homozygous loss.

Deletions in 13q14 are observed in over 20% of B-cell Chronic Lymphocytic Leukaemia patients who show cytogenetic aberrations using conventional cytogenetics: a further 20% have microscopic deletions and another 10% homozygous loss^{1,2}. In recent studies using FISH for this region however, up to 64% of cases have been shown to be deleted and these deletions are believed to be the primary event in BCLL^{3,4}. Patients deleted for this region have a similar prognosis to patients with a normal karyotype so knowledge of the deletion status of the patient has significant prognostic implications. The deletions are large, 2Mb, with the critical region lying telomeric to the Retinoblastoma gene, RB-1, and flanked by the markers D13S273 and D13S25. CLL patients with a 13q14.3 deletion have a better prognosis than patients with trisomy 12. A candidate tumour suppressor gene, DLEU1, is strongly implicated in this region^{5,6}.

The 13q14.3 deletion probe is approximately 400kb and covers the region 100kb centromeric to D13S319 through to the marker D13S25. It is labelled in red. The subtelomeric specific probe at 13qter (clone 163C9) is labelled in green and allows identification of chromosome 13, acting as a control probe.

Reference: Bibliographie/Literatur/Bibliografia

1. Mensup et al., 1996. Leukaemia 12(5) 705-9
2. Corcoran et al., 1968. Blood. 31(4) 1382-90
3. Dohner et al., 2000. The New England Journal of Medicine. 343(26) 1910-1916
4. Deward et al., 2003. British Journal of Haematology. 121(2) 287-95
5. Lu et al., 1997. Oncogene 15(21) 2463-2473
6. Kapanadze et al., 1998. FEBS Letters 428 266-70



APÊNDICE

Registro Paciente	FISH	Resultado Cariótipo - Banda G	Idade	Dependência Transfusional	% Blastos	Chlopietas	Classificação OMS	IPSS	Grupo de Risco	Evolução	Situação
1		46,XY,del(5)(q15q33)[7]46,XY[11]	69	S	<5%	3	CRDM	0,5	INT-1	s/transformação	vivo
2	Amplificação p53	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)[p11]	30	S	16%	2	AREB-II	3,0	HIGH	s/transformação	óbito
3		47,XY,+mar[9]46,XY[17]	45	N	<5%	3	CRDM	1,0	INT-1	s/transformação	vivo
4		46,XY,del(7)(q32)[2]46,XY[18]	78	N	<5%	2	CRDM	1,5	INT-2	s/transformação	vivo
5	Amplificação	46,XX,del(17)(p11-2)[3]46,XX[4]	26	S	<5%	1	SMD secundária		INT-2	s/transformação	vivo
6	Deleção p53	46,XY,del(5)(q15q33),del(17)(p11-2)[7]46,XY[13]	31	N	<5%	1	CRDM	0,5	INT-1	s/transformação	vivo
7	Rearranjo 11q23	46,XX,del(11)(q23)[9]46,XX[5]	70	N	<5%	2	CRDM	1,0	INT-1	s/transformação	vivo
8		77-158-4np,XY[9]46,XY[18]	71	S	10%	2	ARSA	1,5	INT-2	s/transformação	vivo
9		47,XY,+8[4]47,XY,-1,+8,+mar[5]47,XY,-1,del(7)(q32)+8,+mar[5]47,XY,-1,+8,del(11)(q23)+mar[4]46,XY[2]	70	S	14%	3	AREB-II	3,0	HIGH	s/transformação	vivo
10	Amplificação	71-99-4np,XY,-[4]46,XY,del(17)(p11-2)[9]46,XY[7]	75	N	<5%	2	CRDM	1,0	INT-1	s/transformação	vivo
11		39,XX,-1,-5,-11,-12,-15,-20,-21[5]46,XX,del(5)(7q14q33)[5]46,XX[4]	37	N	<5%	2	SMD secundária	*	*	s/transformação	vivo
12		46,XX,del(5)(q23)[7]46,XX[6]	84	N	<5%	3	AR	1,0	INT-1	s/transformação	vivo
13		46,XX,del(5)(q15q33)[9]46,XX,del(5)(q15q33),del(11)(q25)[7]46,XX[4]	>60	S	<5%	2	CRDM	1,0	INT-1	s/transformação	vivo
14		46,XY,del(5)(7q15q33)[7]46,XY[8]	31	N	<5%	2	SMD inclassificável	0,5	INT-1	s/transformação	vivo
15		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]	77	S	<5%	3	CRDM	1,5	INT-2	s/transformação	óbito
16		46,XY,del(5)(7q15q33)[9]46,XY[12]	58	N	<5%	2	ARSA	0,5	INT-1	LMA	vivo
17		47,XY,+mar[6]48,XY,+8,del(6)(7q22)+mar[4]47-50,XY,d[el(4)(2q35)+8,+10,+11,del(6)(7q22)+21,+mar[6]p8]	49	S	<5%	3	AREB-II	1,5	INT-2	s/transformação	óbito
18		175,XXXXXXX,-5,-6,-7,-8,-9,-11,-13,-14[4]46,XX,del(5)(q15q33)[8]46,XX[19]	72	N	<5%	1	SMD secundária	*	*	s/transformação	vivo
19		89,XXY,-20,-22,-Y[4]46,XY,del(6)(7q22)[5]46,XY[11]	79	N	<5%	1	CRDM	1,0	INT-1	s/transformação	vivo
20		37,X,-2,-3,-9,-11,-12,-15,-16,-18,-Y[8]46,XY,del(5)(q15q33)[5]46,XY[6]	64	S	10%	3	AREB-II	2,0	INT-II	s/transformação	vivo
21		92-102-4np,XXXX...[6]170-176-7np,XXXXXXX...[7]46,XX[7]	52	N	<5%	2	CRDM	1,0	INT-1	S/transformação	vivo
22	Rearranjo 11q23	46,XY,del(5)(q31q35)[6]46,XY[17]	88	N	8%	2	AREB-I	1,0	INT-1	LMMC - tipol	vivo
23		46,X-Y[4]46,XY[16]	91	N	<5%	1	ARSA	0,0	LOW	s/transformação	vivo
24		46,XY,del(5)(q22q33)[5]46,XY[7]	14	N	<5%	1	CRDM	0,0	LOW	s/transformação	vivo
25		46,XX,del(20)(q13-1)[7]46,XX[16]	83	N	<5%	2	CRDM	1,0	INT-1	s/transformação	vivo
26	Deleção Rb	46,XX[8]	18	S	<5%	2	CRDM	1,0	INT-1	s/transformação	vivo
27		46,XX[22]	46	S	<5%	3	SMD secundária	*	*	s/transformação	vivo
28		46,XX[8]	52	N	<5%	2	CRDM	1,0	INT-1	LMA	vivo
29		46,XX[25]	72	S	<5%	2	CRDM	0,5	INT-1	s/transformação	vivo
30	Ausência de Metáfases		66	N	<5%	3	CRDM	**	**	s/transformação	vivo
31	Deleção p53	46,XX[15]	45	N	<5%	1	Trombocitopenia refratária	0,0	LOW	s/transformação	vivo
32		46,XX[20]	46	N	<5%	2	CRDM	1,0	INT-1	s/transformação	vivo
33		46,XX[20]	28	S	<5%	1	ARSA	0,0	LOW	s/transformação	vivo

* IPSS não foi aplicado para pacientes com SMD secundária. ** IPSS não pôde ser calculado por ausência de resultado citogenético.