

**ESTUDO DE PROTEÍNAS RELACIONADAS AO
FUSO MITÓTICO (*AURORA A* e *AURORA B*) E PONTO
DE CHECAGEM MITÓTICO (*CDC20* e *MAD2L1*) EM
PACIENTES PORTADORES DE SÍNDROME
MIELODISPLÁSICA**

FABÍOLA FERNANDES HEREDIA

**Tese apresentada ao Programa de Pós-
Graduação Interinstitucional (DINTER) em
Oncologia da Fundação Antônio Prudente em
Parceria com Escola Cearense de Oncologia,
para obtenção do título de Doutor em Ciências
Área de concentração: Oncologia**

Orientador: Dr. Alex Fiorini de Carvalho

Co-Orientador: Prof. Dr. Ronald Feitosa

Pinheiro

Fortaleza

2012

FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pela Biblioteca da Fundação Antônio Prudente

Heredia, Fabíola Fernandes

Estudo de proteínas relacionadas ao fuso mitótico (AURORA A e AURORA B) e ponto de checagem mitótico (CDC20 e MAD2L1) em pacientes portadores de síndrome mielodisplásica / Fabíola Fernandes Heredia – Fortaleza, 2012.

144p.

Tese (Doutorado)-Fundação Antônio Prudente e Escola Cearense de Oncologia – ECO. Programa de Pós-Graduação Interinstitucional (Dinter) Curso de Pós-Graduação em Ciências - Área de concentração: Oncologia.

Orientador: Alex Fiorini de Carvalho

Descritores: 1. SÍNDROMES MIELODISPLÁSICAS. 2. EXPRESSÃO GÊNICA. 3. FUSO MITÓTICO.

AGRADECIMENTOS

Em especial ao Dr. Ronald Feitosa Pinheiro, que apesar desse jeito “durão” e do humor peculiar, com frases emblemáticas do tipo: “Publique ou morra”, “Jogou a capa do Mandrake” quando alguém desaparece do laboratório, ou “O que você faz entre meia-noite e cinco horas da manhã? Vai estudar!”; foi muito mais que um chefe e orientador, foi uma pessoa com quem pude realmente contar durante os últimos quatro anos, com o qual me aconselhei profissionalmente e sou grata pela oportunidade e confiança depositadas em mim.

Ao Dr. Alex Fiorini de Carvalho, pela colaboração essencial neste trabalho. Pela paciência, disponibilidade e ajuda durante o período que estive em seu laboratório. Por toda dedicação e compromisso no desenvolvimento deste trabalho.

À Dra. Sílvia Magalhães gostaria de fazer uma menção especial, por todo o empenho em me manter no grupo de SMD. Por ter acreditado e apostado em mim. Por ter me ensinado muito além do conhecimento teórico.

Aos pesquisadores Dr. Dário Rocha e Wellington Lima, pela atenção, presteza e contribuição nas análises imuno-histoquímicas e estatísticas desse trabalho.

À Juliana Cordeiro, por toda a dedicação e amizade. Obrigada pelos conselhos, discussões científicas (e não científicas) e pela imprescindível ajuda nos experimentos.

À Nair, pela paciência, apoio e explicações. Pela forma generosa que compartilha seu conhecimento.

À todos da coordenação da Pós-Graduação, ao Prof. Marcos Venício, Prof. Manfredo, Prof. Ronaldo Ribeiro, Prof. Fernando Soares e Ana Kurinari, por todo apoio que recebi durante o período do curso.

A todos os integrantes do laboratório de Citogenômica do Câncer: Allan, Haward, Izabelle, Júlia, Luiz Ivando, Marília, Rafael, Roberta, e aos ex-membros, Ivna, Lia, Levi e Vitor, pela ajuda na análise citogenética, pelos momentos de diversão, alegria e amizade. Cada um contribuiu da sua forma e de modo muito importante para todo este trabalho se realizar. Por serem uma EQUIPE, e por tornarem o meu dia-dia mais leve e divertido.

Aos meus professores, em especial ao Prof. Francisco Linhares Arruda Ferreira Gomes, meu orientador de iniciação científica; Prof. Francisco de Assis de Paiva Campos, do Dep. De Bioquímica da UFC e Francisco José Lima Aragão, da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, meu orientador e co-orientador de mestrado. Com eles aprendi a arte de hipotetizar; de deixar a imaginação fluir; o compromisso com a pesquisa; o respeito profissional e principalmente a conviver em harmonia, em um local de trabalho que muitas vezes não é maior do que uma sala de aula, e no qual dependemos o tempo todo do outro; seja na realização do experimento, no revezamento do uso de equipamentos, na organização do espaço em comum. Enfim, ensinamentos que me iniciaram no meio científico e ajudaram a me transformar na profissional que sou hoje.

Aos meus queridos amigos Clarisse, Clemilson, Daniele, Érica, Juliana Brasil, Juliana Vaez e Sônia, e familiares; sempre compreensivos com minha ausência, e amorosos e carinhosos nos reencontros. Que carinhosamente insistem em entender o que faço, e repetidamente perguntam: “O que é que você estuda mesmo?”.

Um agradecimento especial à minha mãe Maria da Penha, por está sempre comigo e torcendo pelo meu sucesso. Por toda dedicação dispensada na minha criação. Pelo exemplo de vida, determinação e perseverança ensinados a mim e minhas irmãs; valores e princípios que norteiam minha vida.

Ao Rodrigo, pelo amor, paciência e compreensão. Por sempre ter estado ao meu lado. Por respeitar minhas decisões e me apoiar em todos os momentos.

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

RESUMO

Heredia FF. **Estudo de proteínas relacionadas ao fuso mitótico (AURORA A e AURORA B) e ponto de checagem mitótico (CDC20 e MAD2L1) em pacientes portadores de Síndrome mielodisplásica.** Fortaleza; 2012. [Tese de Doutorado-Programa de Pós-Graduação Interinstitucional (DINTER) em Oncologia da Fundação Antônio Prudente em Parceria com Escola Cearense de Oncologia].

Síndrome mielodisplásica (SMD) representa um grupo heterogêneo de doenças hematopoéticas clonais caracterizadas por alterações displásicas e citopenias no sangue periférico. A patogênese da SMD envolve múltiplas etapas e ainda não está claramente definido como a doença progride para o estágio avançado e para leucemia mielóide aguda. A presença de alterações citogenéticas desempenha importante papel no prognóstico e seguimento desses pacientes. Alguns estudos demonstram que alterações na expressão de proteínas relacionadas ao fuso mitótico (AURORA A e AURORA B) e ao ponto de checagem mitótico (CDC20 e MAD2L1) estão envolvidas na instabilidade cromossômica, aneuploidia e progressão tumoral em diferentes tumores sólidos e neoplasias hematológicas. No entanto, pesquisas que investiguem a expressão destes genes em pacientes com SMD são escassas, e estudos que avaliem essas proteínas podem contribuir para o entendimento da fisiopatologia da doença. Nesse sentido, este trabalho teve como objetivo avaliar o perfil de expressão destes genes em pacientes com SMD, e investigar sua relação com as variáveis clínicas e laboratoriais da doença. O estudo das alterações cromossômicas foi realizado por bandamento G, a análise de amplificação para os genes *AURKA* e *AURKB* foi realizada através da técnica de hidridização *in situ* por fluorescência (FISH), e a expressão dos genes *AURKA*, *AURKB*, *CDC20* e *MAD2L1* foi realizada, através de PCR Quantitativo em Tempo Real, em 61 amostras de medula óssea de pacientes portadores de SMD. Assim como em outras

neoplasias, a maioria dos pacientes estudados (55,8%) apresentaram cariótipo alterado, refletindo a instabilidade cromossômica decorrentes do processo de patogênese da doença. Apesar da heterogeneidade intrínseca à doença e do número reduzido de pacientes de alto risco (grupos INT-2 e HIGH da classificação IPSS), os pacientes com SMD apresentaram maior expressão dos genes *CDC20* e *MAD2L1* quando comparados a indivíduos saudáveis, para todas as variáveis analisadas (celularidade, número de citopenias, dependência transfusional, citogenética, classificação OMS, índice prognóstico IPSS). Ademais, a celularidade apresentou diferença significativa entre os grupos de pacientes, sendo os grupos hipercelular e normocelular mais expressos que o grupo hipocelular. Esse dado corrobora com outros estudos, que sugerem que SMD variante hipocelular pode ser uma entidade com características e patogênese distintas dos demais subtipos de SMD. A presença de amplificação do gene *AURKA* foi observada em aproximadamente 10% dos casos, os quais também apresentaram níveis de expressão significativamente ($p=0,038$) mais elevados do que o grupo controle. Esse dado sugere que a superexpressão de *AURKA* pode estar relacionada ao processo de tumorigênese da doença. Suporte financeiro: CNPq e FUNCAP.

SUMMARY

Heredia FF. **[Mitotic spindle (AURORA A e AURORA B) and mitotic checkpoint (CDC20 and MAD2L1) related protein study in patients with myelodysplastic syndrome]**. Fortaleza; 2012. [Tese de Doutorado-Programa de Pós-Graduação Interinstitucional (DINTER) em Oncologia da Fundação Antônio Prudente em Parceria com Escola Cearense de Oncologia].

Myelodysplastic syndrome (MDS) represents a heterogeneous group of clonal hematopoietic disorders characterized by cytopenias and dysplastic changes in the peripheral blood. The pathogenesis of MDS involves multiple steps and is still not clearly defined how the disease progresses to advanced stage and acute myeloid leukemia. The presence of cytogenetic changes plays an important role in the prognosis and follow-up of these patients. Some studies show that alterations in the expression of proteins related to the mitotic spindle (Aurora A and Aurora B) and the mitotic checkpoint (MAD2L1 and CDC20) are involved in chromosomal instability, aneuploidy and tumor progression in various solid tumors and hematologic malignancies. However, research to investigate the expression of these genes in patients with MDS are scarce, and studies that evaluate these proteins may contribute to the knowledge of the disease pathophysiology. Thus, this study aimed to evaluate the expression profile of these genes in patients with MDS, and investigate its relationship with clinical and laboratory variables of disease. The cytogenetics analysis was carried out by G-banding, the analysis of *AURKA* and *AURKB* amplification genes was performed using the technique of fluorescent in situ hybridization (FISH), and the expression of genes *AURKA*, *AURKB*, *CDC20* and *MAD2L1* was performed by Quantitative Real-Time PCR in 61 samples of bone marrow from patients with myelodysplastic syndromes. As in other cancers, most patients (55.8%) had karyotype changes, reflecting chromosomal instability resulting from the

process of pathogenesis. Despite the intrinsic heterogeneity of the disease and the small number of high-risk patients (IPSS classification groups INT-2 and HIGH), patients with MDS showed higher expression of genes *MAD2L1* and *CDC20* when compared to healthy subjects for all variables (cellularity, number of cytopenias, transfusion dependence, cytogenetics, WHO classification, IPSS prognostic index). Moreover, the cellularity showed a significant difference between groups of patients, normocellular and hypercellular groups expressed more than the hypocellular group. This corroborate to other studies which suggest that SMD hypocellular variant may be an entity with distinct characteristics and pathogenesis from other MDS subtypes. The presence of *AURKA* gene amplification was observed in approximately 10% (4/41) of the cases, which also showed expression levels significantly higher ($p = 0.038$) than the group control. These data suggest that overexpression of *AURKA* may be related to the disease process of tumorigenesis. Financial support: CNPq and FUNCAP.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Doenças da célula progenitora hematopoética: sobreposição de achados e situação de diagnóstico difícil.....	3
Figura 2	Mecanismos envolvidos na patogênese da SMD.....	11
Figura 3	Esquema de mudança conformacional de MAD2.....	33
Figura 4	Progressão da metáfase para anáfase.....	35
Figura 5	Ciclo do centrôssomo.....	41
Figura 6	Amplificação dos centrôssomos decorrente de superexpressão de AURKA.....	49
Figura 7	Dinâmica das proteínas envolvidas na biorientação dos cromossomos.....	51
Figura 8	Sonda AURKA (20q13)/20q11, Cat#KBI-10721, Kreatech Diagnostics, Amsterdam, NL.....	61
Figura 9	Sonda AURKB (17p13)/SE17, Cat#KBI-10722, Kreatech Diagnostics, Amsterdam, NL.....	61
Figura 10	Distribuição dos pacientes portadores de SMD primária, segundo classificação OMS (2008).....	71
Figura 11	Distribuição dos pacientes portadores de SMD primária, segundo Sistema Internacional de Escore Prognóstico (IPSS 1997).....	71

Figura 12	Distribuição dos pacientes portadores de SMD, segundo grupos citogenéticos utilizados pelo Sistema Internacional de Escore Prognóstico (IPSS-1997).....	74
Figura 13	Distribuição dos pacientes portadores de SMD, de acordo com o resultado do cariótipo (banda G).....	74
Figura 14	Caso 8. Citogenética Clássica (bandamento G). Cariótipo com apenas uma alteração cromossômica: 46, XY,del(5).....	75
Figura 15	Caso 42. Citogenética Clássica (bandamento G). Cariótipo com duas alterações cromossômicas: 46,XY,del(5)(q15q33),del(11)(q23).....	76
Figura 16	Caso 28. Citogenética Clássica (bandamento G). Cariótipo complexo: 48,XY,add(13)(p11),+22,+mar.....	77
Figura 17	Distribuição dos pacientes portadores de SMD segundo a presença ou não de aneuploidia.....	78
Figura 18	Distribuição dos pacientes portadores de SMD segundo o cromossomo envolvido nas alterações citogenéticas apresentadas.....	78
Figura 19	Comparação entre a expressão gênica de <i>AURKA</i> de pacientes com amplificação de <i>AURKA</i> e grupo controle.....	80
Figura 20	FISH para <i>AURKA</i> com 4% das células demonstrando amplificação do gene <i>AURKA</i> (caso 37).....	81
Figura 21	FISH para <i>AURKB</i> com 17% das células demonstrando polissomia do cromossomo 17 (caso 55).....	81

Figura 22	Perfil eletroforético do RNA total.....	83
Figura 23	Avaliação da integridade do RNA extraído das amostras controles.....	84
Figura 24	Perfil eletroforético do PCR para amplificação de DNA genômico.....	85
Figura 25	Valor de estabilidade atribuído aos genes endógenos em reação de PCR em tempo real com amostras de medula óssea (Programa Genorm).....	87
Figura 26	Comparação entre a expressão gênica de AURKA (a) e AURKB (b) em pacientes portadores de SMD de acordo com a celularidade medular.....	88
Figura 27	Comparação entre a expressão gênica de <i>CDC20</i> (a) e <i>MAD2L1</i> (b) em pacientes portadores de SMD de acordo com a celularidade medular.....	90
Figura 28	Comparação entre a expressão gênica de <i>CDC20</i> (a) e <i>MAD2L1</i> (b) em pacientes portadores de SMD de acordo com o número de citopenias apresentadas no sangue periférico.....	92
Figura 29	Comparação entre a expressão gênica de <i>CDC20</i> em pacientes portadores de SMD de acordo com a necessidade transfusional.....	94
Figura 30	Comparação entre a expressão gênica de <i>MAD2L1</i> em pacientes portadores de SMD de acordo com a necessidade transfusional.....	95

Figura 31	Comparação entre a expressão gênica de <i>CDC20</i> (a) e <i>MAD2L1</i> (b) em pacientes portadores de SMD de acordo com a presença de alterações citogenéticas encontradas no cariótipo (banda G).....	97
Figura 32	Comparação entre a expressão gênica de <i>CDC20</i> (a) e <i>MAD2L1</i> (b) em pacientes portadores de SMD de acordo com a presença ou não de aneuploidia dentre as alterações citogenéticas encontradas no cariótipo (banda G).....	99
Figura 33	Comparação entre a expressão gênica de <i>CDC20</i> (a) e <i>MAD2L1</i> (b) em pacientes portadores de SMD de acordo com os subgrupos citogenéticos utilizados no Sistema Internacional de Escore Prognóstico (1997).....	101
Figura 34	Comparação entre a expressão gênica de <i>CDC20</i> (a) e <i>MAD2L1</i> (b) em pacientes portadores de SMD de acordo com os subgrupos, segundo classificação OMS (2008).....	103
Figura 35	Comparação entre a expressão gênica de <i>CDC20</i> (a) e <i>MAD2L1</i> (b) em pacientes portadores de SMD de acordo com os grupos de risco, segundo IPSS (1997).....	105

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Evolução na classificação da Síndrome Mielodisplásica.....	9
Tabela 2	Frequência de alterações citogenéticas em pacientes com SMD <i>de novo</i> e SMD secundária.....	22
Tabela 3	Nova proposta de estratificação citogenética.....	29
Tabela 4	Características dos pacientes portadores de SMD.....	70
Tabela 5	Dados citogenéticos dos pacientes portadores de SMD.....	73

LISTA DE QUADROS

Quadro 1	Taxa de incidência de Síndrome Mielodisplásica nos EUA por idade ao diagnóstico, no período de 2004-2008.....	4
Quadro 2	Papel do sistema imunológico em pacientes com SMD de baixo e alto risco.....	15
Quadro 3	Perfil de expressão de <i>MAD2L1</i> em diferentes neoplasias.....	37
Quadro 4	Perfil de expressão de <i>CDC20</i> em diferentes neoplasias.....	43
Quadro 5	Perfil de expressão de <i>AURKA</i> em diferentes neoplasias.....	45
Quadro 6	Perfil de expressão de <i>AURKB</i> em diferentes neoplasias.....	46
Quadro 7	Protocolo de exclusão de causas não clonais que, com frequência, cursam com citopenias e/ou dispoeses na medula.....	57
Quadro 8	Lista dos genes utilizados na avaliação da expressão gênica por PCR em Tempo Real.....	66
Quadro 9	Linhagens celulares que compõem o RNA referência.....	67

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

μL	microlitro
°C	graus Celsius
2HG	<i>2-hydroxiglutarate</i>
ACTB	β-actina
AIRK	<i>Aurora/Ipl1 related kinase</i>
AML1	<i>Acute myeloid leukemia 1 protein</i>
AMP	Amplificação
AR	Anemia refratária
AREB	Anemia refratária com excesso de blastos
AREB-t	AREB em transformação
ARSA	Anemia refratária com sideroblastos em anel
ARSA-T	ARSA com trombocitopenia
ASXL1	<i>Additional sex combs like-1</i>
AURKA	Aurora quinase A
AURKB	Aurora quinase B
B2M	β2-microglobulina
BUB	<i>Budding uninhibited by benzimidazoles</i>
BUBR1 (BUB1B)	<i>BUB1 beta</i>
CBFA2	<i>Core-binding factor subunit alpha-2</i>
CCM	Complexo de checagem mitótico
CD	<i>Cluster of differentiation</i>
CDC20	<i>Cell division cycle 20</i>
CDK	<i>Cyclin-dependent kinase</i>
CDKI	<i>Cyclin-dependent kinase inhibitor</i>
cDNA	DNA complementar
C-MAD2	<i>Closed-MAD2</i>
CPA	Complexo promotor de anáfase
CRDM	Citopenia refratária com displasia multilineagem
CRDM-AS	CRDM com sideroblastos em anel

CRDU	Citopenia refratária com displasia unilinhagem
Ct	Ciclo <i>threshold</i>
CTH	Células-tronco hematopoéticas
CTO	Controle
DAPI	<i>4',6-diamidino-2-phenylindole</i>
Del	Deleção
DNA	Ácido desoxirribonucléico
DNMT	<i>DNA methyltransferase</i>
dNTP	Desoxirribonucleotídeos trifosfatados
EGR1	<i>Early growth response 1</i>
EZH2	<i>Zeste homolog 2</i>
FAB	Franco-americano-britânico
FISH	<i>Fluorescence in situ hybridization</i>
FITC	<i>Fluorescein isothiocyanate</i>
FLT3	<i>Fms-like tyrosine kinase 3</i>
Fw	<i>Forward</i>
G2	<i>Gap 2</i>
Gadd45a	<i>Growth arrest and DNA-damage-inducible protein 45 alpha</i>
GAPDH	Gliceraldeído fosfato desidrogenase
GDP	<i>Hydrolyze guanosine diphosphate</i>
GM-CSF	<i>Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor</i>
GTG	Tripsina-Giemsa
GTP	<i>Hydrolyze guanosine triphosphate</i>
H3	Histona 3
Hb	Hemoglobina
HDAC	<i>Histone deacetylases</i>
HIPER	Hipercelular
HIPO	Hipocelular
HMT	<i>Histone methyltransferase</i>
HOX	<i>Homeobox</i>
HP1	<i>Heterochromatin Protein 1</i>
HPN	Hemoglobinúria paroxística noturna

ICUS	<i>Idiopathic cytopenia of undetermined significance</i>
IDH	<i>Isocitrate dehydrogenase</i>
IFN-γ	<i>Interferon-gamma</i>
IL	<i>Interleukin</i>
IMRAW	<i>International MDS Risk Assessment Working</i>
INCENP	<i>Inner centromere protein</i>
INT	Intermediário
IPI	Índice prognóstico internacional
IPSS	<i>International Prognostic Score System</i>
IRF-1	<i>Interferon regulatory factor 1</i>
ISCN	<i>International system for human cytogenetic nomenclature</i>
JAK-2	<i>Janus kinase 2</i>
LA	Leucemia aguda
LDGC	Linfoma difuso de grandes células
LLA	Leucemia linfóide aguda
LLC	Leucemia linfóide crônica
LMA	Leucemia mielóide aguda
LMC	Leucemia mielóide crônica
LMCa	Leucemia mielóide crônica atípica
LMMC	Leucemia mielomonocítica crônica
LMMJ	Leucemia mielomonocítica juvenil
LNH	Linfoma não-Hodgkin
MAD	<i>Mitotic arrest defective</i>
MAPK	<i>Mitogen-activated protein kinases</i>
MCAK	<i>Mitotic centromere-associated kinesin</i>
MCS-F	<i>Macrophage colony-stimulating factor</i>
Mdm2	<i>Murine double minute</i>
MgCl₂	cloreto de magnésio
mL	mililitros
MLH1	<i>MutL homolog 1</i>
mM	miliMolar
NADP	<i>Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate</i>

NCOA1	<i>Nuclear receptor coactivator 1</i>
NF-κB	<i>Nuclear factor kappa-B</i>
ng	nanograma
nM	nanoMolar
NORMO	Normocelular
NR	Neutropenia refratária
NUP98	<i>Nuclear pore complex protein 98</i>
O-MAD2	<i>Open-MAD2</i>
OMS	Organização Mundial da Saúde
P53	<i>Protein 53</i>
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i>
PCR2	<i>Polycomb Repressive Complex 2</i>
PI3K	<i>Phosphatidylinositol 3-kinase</i>
Plk1	<i>Polo-like kinase 1</i>
POLI	Polissomia
PP1	<i>Phosphoprotein phosphatase 1</i>
PTEN	<i>Phosphatase and tensin homolog</i>
PTPN11	<i>Tyrosine-protein phosphatase non-receptor type 11</i>
RB	Retinoblastoma
Rev	<i>Reverse</i>
RNA	Ácido ribonucleico
RPS14	<i>40S ribosomal protein S14</i>
RUNX1	<i>Runt-related transcription factor 1</i>
SEER	<i>Surveillance, Epidemiology, and End Results</i>
SIDA	Síndrome da imunodeficiência adquirida
SMD	Síndrome mielodisplásica
SMD/DMP	SMD/ doenças mieloproliferativas
SMD/NMP	SMD/ neoplasias mieloproliferativas
SMD-U	<i>SMD unclassified</i>
SNP	<i>Single-nucleotide polymorphism</i>
SPARC	<i>Secreted protein acidic and rich in cysteine</i>
SSC	<i>Saline-sodium citrate buffer</i>

STAT5	<i>Signal transducer and activator of transcription 5</i>
TA	Temperatura ambiente
TACC	<i>Transforming acidic coiled-coil-containing protein</i>
TET2	<i>Ten-eleven translocation 2</i>
TNF-α	<i>Tumor necrosis factor-alpha</i>
TP53	<i>Tumor protein 53</i>
TR	Trombocitopenia refratária
UBC	Ubiquitina C
UNG	<i>Uracil-N-glycosylase</i>
VEGF	<i>Vascular endothelial growth factor</i>
αKG	<i>Alpha ketoglutarate</i>

ÍNDICE

1	INTRODUÇÃO	1
1.1	Síndrome Mielodisplásica.....	1
1.1.1	Aspectos Gerais	1
1.1.2	Epidemiologia e Etiologia	4
1.1.3	Classificação	6
1.2	Patogênese	10
1.2.1	Alteração epigenética - importante mecanismo para a patogênese da SMD	12
1.2.2	Microambiente medular na patogênese da SMD	13
1.2.3	Sistema imunológico na patogênese da SMD	15
1.2.4	Mutações.....	17
1.2.5	Alterações cromossômicas.....	22
1.2.6	Proteínas relacionadas ao ponto de checagem mitótico	30
1.2.7	Proteínas relacionadas ao fuso mitótico.....	43
2	OBJETIVOS	55
2.1	Objetivo Geral	55
2.2	Objetivos Específicos	55
3	PACIENTES, MATERIAIS E MÉTODOS	57
3.1	Pacientes.....	57
3.2	Coleta das amostras.....	58
3.3	Citogenética Clássica	58
3.4	Hibridização <i>in situ</i> por fluorescência (FISH).....	59
3.5	Extração e purificação do RNA total.....	63
3.6	Reação por RT-PCR	64
3.7	Reação por PCR em tempo real.....	65
3.8	Análise estatística.....	68
3.9	Aspectos Éticos	68

4	RESULTADOS	69
4.1	Características epidemiológicas dos pacientes.....	69
4.2	Resultados citogenéticos.....	72
4.2.1	Citogenética clássica (banda G).....	72
4.2.2	Citogenética molecular (FISH).....	79
4.3	Resultados de expressão gênica.....	82
4.3.1	Celularidade.....	86
4.3.2	Número de citopenias.....	91
4.3.3	Dependência transfusional.....	93
4.3.4	Variáveis citogenéticas.....	96
4.3.5	Subgrupos OMS (2008).....	102
4.3.6	Grupos de risco IPSS (1997).....	104
5	DISCUSSÃO	106
6	CONCLUSÃO	121
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	123

ANEXOS

- Anexo 1** Termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE)
- Anexo 2** Protocolos
- Anexo 3** Resultados da citogenética clássica (bandamento G) dos pacientes portadores de SMD.
- Anexo 4** Resultados da citogenética molecular (FISH) dos pacientes portadores de SMD.
- Anexo 5** Resultados da expressão gênica (PCR em Tempo Real) dos pacientes portadores de SMD.
- Anexo 6** Artigo: Heredia F, Sousa J, Magalhães S, Pinheiro R. Therapy-related myelodysplastic syndrome with 17p deletion following long-term azathioprine treatment. Leuk Res 10; 34:e311-2.

1 INTRODUÇÃO

1.1 SÍNDROME MIELODISPLÁSICA

1.1.1 Aspectos Gerais

A Síndrome Mielodisplásica (SMD) é uma doença clonal caracterizada por alterações morfológicas de dispoese e citopenias no sangue periférico (SWERDLOW et al. 2008).

A hematopoese ineficaz é atribuída a uma suscetibilidade anormal à apoptose nas células progenitoras e à capacidade de resposta limitada dessas células a fatores de crescimento. Acredita-se que esses sinais pró-apoptóticos resultam de uma sinalização anormal, causada pelo excesso de citocinas pró-inflamatórias e/ou resposta imune alterada das células T. Por isso, apesar das citopenias apresentadas no sangue periférico, na maioria dos pacientes a medula apresenta-se hiper celular (TEFFERI e VARDIMAN 2009).

A anemia com necessidade freqüente de transfusões, os sangramentos devido à plaquetopenia e as infecções recorrentes estão entre as principais complicações advindas dessa doença, além do risco de transformação em leucemia aguda (LA), o qual ocorre em 30% dos pacientes, em média (GREENBERG et al. 1997).

Anemia isolada é a apresentação mais comumente observada em pacientes com SMD, que são classificados como anemia refratária (10-20%)

ou anemia refratária com sideroblastos em anel (3-11%). Aproximadamente 30% dos casos de SMD são pacientes com displasia em duas ou mais linhagens (CRDM) (SWERDLOW et al. 2008; STEENSMA 2009).

Pacientes que apresentam neutropenia estão mais susceptíveis a infecções. Como regra geral, quanto maior a duração da neutropenia, maiores são os riscos de complicações potencialmente fatais. Velocidade com que o número de neutrófilos diminui e número absoluto de neutrófilos são fatores que determinam maior ou menor risco de infecção em pacientes neutropênicos (CORDOBA et al. 2012; DAYYANI et al. 2012).

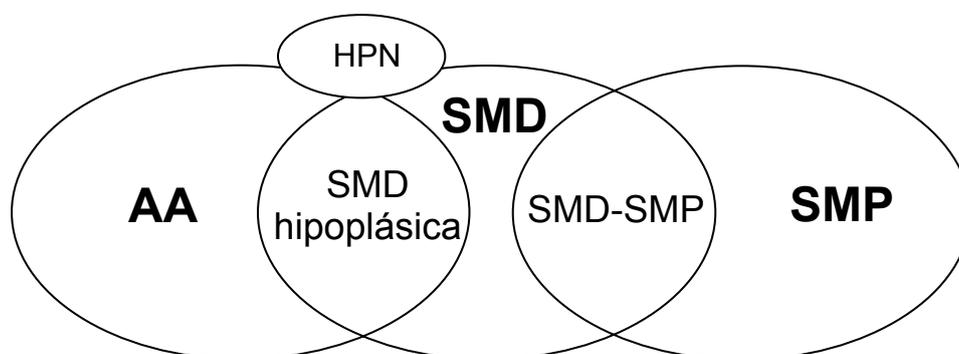
A presença de plaquetopenia é mais rara em pacientes com SMD, e está relacionada ao aumento do risco de hemorragia. As manifestações hemorrágicas habitualmente relacionadas à plaquetopenia são as petéquias, esquimoses e sangramentos de mucosas.

O diagnóstico de SMD deve ser realizado levando-se em consideração o hemograma, o mielograma, a biópsia de medula óssea e o cariótipo de células de medula óssea por banda-G (GERMING et al. 2008). O critério morfológico mínimo para o diagnóstico de SMD é a presença de displasia em 10% ou mais das células de uma ou mais linhagens hematopoéticas (SWERDLOW et al. 2008; TEFFERI e VARDIMAN 2009).

A presença de citopenias associadas à alterações displásicas medulares também pode ser devido a condições não clonais secundárias e reversíveis. A deficiência de vitamina B12 e/ou folato, a exposição recente a metais pesados, terapia citotóxica ou fatores de crescimento devem ser considerados fatores de exclusão absolutos. O etilismo, doenças

inflamatórias crônicas, auto-imunes, insuficiência hepática ou renal, disfunções hormonais e infecções virais, incluindo a síndrome da imunodeficiência adquirida (SIDA), doenças hereditárias, como anemia diseritropoética congênita, devem ser descartados ou interpretados com cautela (MAGALHÃES e LORAND-METZE 2004; TEFFERI e VARDIMAN 2009).

Algumas doenças de célula-tronco também devem ser consideradas no diagnóstico diferencial. Nos casos de SMD hipocelular, a exclusão de hemoglobinúria paroxística noturna (HPN) e anemia aplásica podem constituir situações de diagnóstico difícil por apresentarem achados similares ou que se sobrepõem. Com frequência, somente a evolução da condição permite a distinção entre essas doenças (Figura 1) (MAGALHÃES e LORAND-METZE 2004).



Legenda: HPN (hemoglobinúria paroxística noturna); SMD (síndromes mielodisplásicas); SMP (síndromes mieloproliferativas); AA (anemia aplásica).

Fonte: MAGALHÃES e LORAND-METZE (2004).

Figura 1 - Doenças da célula progenitora hematopoética: sobreposição de achados e situação de diagnóstico difícil.

1.1.2 Epidemiologia e Etiologia

Desde 2001, a SMD tem sido reportada no programa norte-americano *Surveillance, Epidemiology, and End Results* (SEER) do Instituto Nacional do Câncer. De acordo com os dados do SEER, aproximadamente 12.000 pacientes são diagnosticados com SMD por ano nos Estados Unidos e aproximadamente 20.000 na comunidade europeia. Esses dados indicam que há, significativamente, mais pacientes com SMD do que com leucemias agudas e neoplasias mieloproliferativas (GERMING et al. 2008; KOMROKJI et al. 2010).

A SMD acomete habitualmente idosos com idade, ao diagnóstico, entre 60 e 75 anos. Sua incidência em pacientes acima de 70 anos está estimada em mais de 25 casos por 100.000 pessoas/ano (Quadro 1).

Quadro 1 - Taxa de incidência de Síndrome Mielodisplásica nos EUA por idade ao diagnóstico, no período de 2004-2008.

IDADE AO DIAGNÓSTICO	AMBOS SEXOS		MASCULINO		FEMININO	
	TAXA	N°	TAXA	N°	TAXA	N°
< 40	0.2	362	0.2	190	0.2	172
40-49	0.8	465	0.7	212	0.9	253
50-59	2.5	1221	2.8	668	2.2	553
60-69	9.2	2619	11.0	1477	7.6	1142
70-79	27.1	5149	36.6	3021	19.8	2128
+ 80	49.8	6414	77.5	3480	35.2	2934

Fonte: SEER (2011)

A incidência de SMD tem aumentado principalmente devido ao envelhecimento da população mundial, melhorias na assistência geriátrica, maior divulgação e conscientização da doença entre a classe médica e

utilização de esquemas combinados de quimioterapia e radioterapia para o tratamento dos demais tumores (MUTFI 2004; SOLÉ et al. 2005; VASSALLO e MAGALHÃES 2009).

Outro aspecto interessante é a variação étnica da doença. Nos países asiáticos, pacientes com SMD são, ao diagnóstico, em média 10 anos mais jovens do que a idade média observada na Alemanha (GERMING et al. 2008).

Quanto à sua etiologia, a SMD pode ser classificada como SMD primária (*de novo*) ou SMD secundária (relacionada à terapia).

A SMD *de novo* possui uma etiologia variada e não completamente definida. Já a SMD secundária está associada a tratamentos agressivos contra outros cânceres, apresentando uma alta correlação com exposição à radiação, agentes alquilantes ou inibidores de topoisomerase II (LOOK 2005; PINHEIRO e CHAUFFAILLE 2006), e seu desenvolvimento geralmente ocorre de quatro a sete anos após a exposição inicial ao agente.

Atualmente, 80-90% dos pacientes diagnosticados são SMD *de novo*, enquanto 10-20% representam casos relacionados à terapia (SMD secundária) (MUTFI 2004; PEDERSEN-BJERGAARD et al. 2007).

A SMD secundária acomete pacientes mais jovens; há maior incidência de transformação para LMA; as citopenias são mais severas; as displasia mais acentuadas, geralmente acometendo as 3 linhagens; há maior incidência de cariótipo alterado e de alterações citogenéticas complexas. No geral, pacientes com SMD secundária apresentam pior

prognóstico do que pacientes com SMD *de novo* (MUTFI 2004; TEFFERI e VARDIMAN 2009).

1.1.3 Classificação

Propostas de classificação com implicações prognósticas visam identificar subgrupos de pacientes, orientar diferentes opções terapêuticas e permitir análise comparativa de resultados (VASSALLO e MAGALHÃES 2009).

A evolução na classificação da SMD reflete diretamente o entendimento sobre a doença (Tabela 1). A classificação do grupo franco-americano-britânico (FAB) de 1982 foi a primeira tentativa de classificação sistemática da doença. Baseada nas observações clínicas, citomorfológicas e nas porcentagens de blastos da medula e sangue periférico, essa classificação distingue cinco subgrupos: 1) anemia refratária (AR): pacientes com anemia, menos de 5% de mieloblastos e menos que 15% de sideroblastos em anel; 2) anemia refratária com sideroblastos em anel (ARSA): pacientes com 15% ou mais de sideroblastos em anel; 3) anemia refratária com excesso de blastos (AREB): pacientes com 5-20% de mieloblastos na medula e 1-4% de blastos no sangue periférico; 4) AREB em transformação (AREB-t): pacientes com 20-30% de mieloblastos na medula e 5% ou mais de blastos no sangue periférico e 5) leucemia mielomonocítica crônica (LMMC): pacientes com monocitose absoluta persistente no sangue periférico ($>1 \times 10^9/L$). A classificação FAB pode claramente diferenciar os grupos entre baixo risco (AR e ARSA) e alto risco

(AREB e AREB-t) de transformação para LMA, no entanto, apresenta algumas limitações. Não aborda critérios importantes como o número de linhagens acometidas e a presença de alteração citogenética. Além disso, o subgrupo AREB é muito heterogêneo, o comportamento e evolução do subgrupo LMMC não é bem caracterizado, e de 5 a 10% dos casos não se encaixam em nenhuma das categorias (BENNETT et al. 1982).

A classificação da Organização Mundial da Saúde (OMS) em 2001 incluiu em sua estratificação alguns desses critérios (JAFFE et al. 2001). AR e ARSA passaram a agrupar apenas pacientes com displasia na linhagem eritróide. Dois novos grupos foram criados: citopenia refratária com displasia multilinhagem (CRDM) e CRDM com sideroblastos em anel (CRDM-SA). Nesses grupos, além da displasia na linhagem eritróide, os pacientes também apresentam mais de 10% de displasia nas linhagens mielóide e/ou megacariocítica. Essa classificação reconheceu os casos de displasia uni ou bilinhagem (mielóide e/ou megacariocítica) sem o comprometimento da linhagem eritróide, agrupando esses pacientes como SMD inclassificável (SMD-U). A classificação OMS também reconheceu como grupo, pacientes que apresentavam a deleção 5q isolada e menos de 5% de mieloblastos. Esses pacientes apresentavam bom prognóstico, com baixa probabilidade de evolução para LMA. O grupo AREB foi dividido em AREB I, com 5-9% de blastos na medula, e AREB II, com 10-19% de blastos. O grupo AREB-t foi excluído, e o limiar para diagnóstico de LMA foi reduzido de 30% para 20% de mieloblastos. Essa redução foi proposta após observar-se que pacientes no grupo AREB-t apresentavam resposta ao tratamento semelhante aos

pacientes com LMA. A LMMC, por suas características clínicas e biológicas, foi retirada da classificação SMD e colocada numa nova categoria: doenças mielodisplásicas/mieloproliferativas, a qual foram agrupados pacientes com LMMC (leucemia mielomonocítica crônica), LMMJ (leucemia mielomonocítica juvenil) e LMCa (leucemia mielóide crônica atípica (JAFFE et al. 2001).

A classificação OMS foi revisada em 2008, reagrupando todas as citopenias refratárias com displasia unilinhagem (CRDU): AR (anemia refratária), NR (neutropenia refratária) e TR (trombocitopenia refratária); e SMD inclassificável (SMD-U) passou a agrupar pacientes com citopenia persistente (> 6 meses), sem displasia, mas com alteração citogenética (SWERDLOW et al. 2008).

Casos com citopenias inexplicadas e persistentes, que não preenchem os critérios mínimos para SMD, passaram a ser denominados de citopenias refratárias de significado indeterminado (ICUS, do inglês *idiopathic cytopenia of undetermined significance*). A denominação de ICUS não sugere necessariamente uma doença clonal, mas implica em algum risco de evolução para SMD (VALENT et al. 2012).

A heterogeneidade clínica da SMD, observada na tentativa de classificá-la nos diferentes subtipos, é um reflexo do espectro de mecanismos moleculares envolvidos na patogênese dessa doença. O tipo e grau de comprometimento dos mecanismos envolvidos podem determinar como a doença se manifesta clinicamente, incluindo a intensidade e número

de citopenias presentes, e se a doença terá um comportamento indolente ou agressivo (rápida progressão) (BEJAR et al. 2011).

Tabela 1 - Evolução na classificação da Síndrome Mielodisplásica.

FAB 1982	OMS 2002	OMS 2008	DISPLASIA-LINHAGEM	% blastos	% blastos
			(OMS 2008)	MO	SP
AR	AR	CRDU			
	SMD-U	AR	Eritróide	< 5	< 1
	CRDM	NR / TR	não eritróide	< 5	< 1
	del 5q	CRDM	eritróide + outra	< 5	< 1
		del 5q isolada	eritróide + mega	< 5	< 1
		SMD-U	unilinhagem + pancito ou CRDM/CRDU com 1% blastos SP	< 5	< 1
ARSA	ARSA	ARSA	eritróide*	< 5	< 1
	CRDM-SA		* > 15% sideroblasto em anel	< 5	< 1
AREB	AREB 1	AREB 1	≥ 1 linhagem	5-9	2-4
	AREB 2	AREB 2	≥ 1 linhagem	10-19	5-19
AREB-t	LMA	LMA	mielóide + outra	≥ 20	
LMMC	SMD/DMP	SMD/NMP	variável (monocitose >1 x 10 ⁹ /L)	< 20	
	LMMC	LMMC			
	LMMJ	LMMJ			
	LMCa	LMC BCR/Abl neg			
	SMD/DMP-U	SMD/NMP-U			

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

Fonte: Adaptado de KOMROKJI et al. (2010).

1.2 PATOGÊNESE

As causas da SMD permanecem pouco elucidadas e não está claramente definido como a doença progride do estágio inicial para o estágio avançado da doença e para LMA (AGGARWAL et al. 2011).

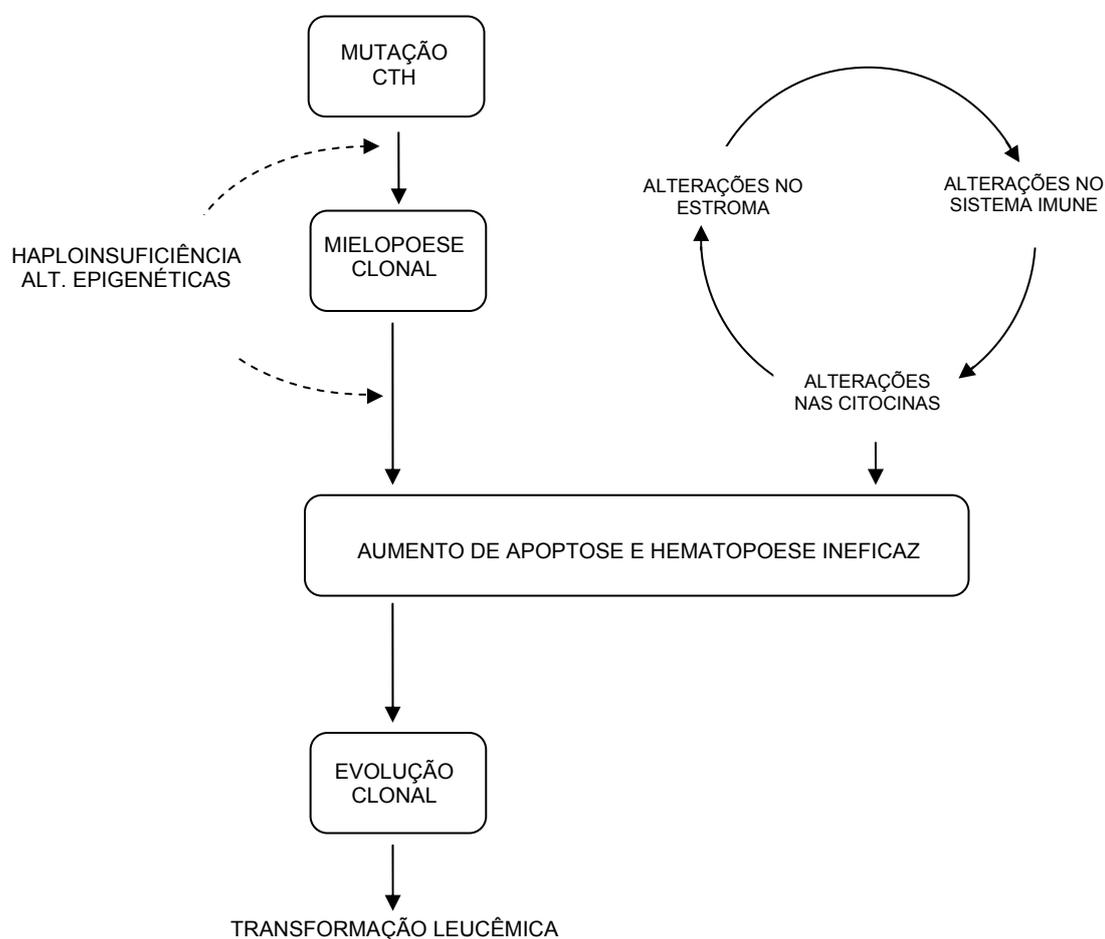
A patogênese da SMD envolve múltiplas etapas, através de uma seqüência de alterações no DNA das células-tronco hematopoéticas (CTH), que conduzem a mudanças funcionais na célula e ao surgimento e conseqüente evolução do clone pré-maligno (MUTFI 2004). É improvável que alterações genéticas individuais sejam, sozinhas, responsáveis pelas mudanças que resultam no desenvolvimento dessa doença. Ao invés disso, talvez seja preciso a combinação de duas ou mais mutações, juntamente com mudanças no status epigenético e no ambiente celular, para favorecer o desenvolvimento da SMD (Figura 2).

Dentre as etapas associadas à patogênese da SMD estão: aumento da auto-renovação das CTH ou aquisição de auto-renovação de células progenitoras, aumento na capacidade proliferativa do clone doente e/ou da sua progênie mais diferenciada, comprometimento do processo de diferenciação, instabilidade genética e epigenética, mecanismos anti-apoptóticos, evasão do sistema imune e supressão da hematopoese normal (BEJAR et al. 2011).

A capacidade de auto-renovação deve estar presente nas células que iniciam a SMD. Essas células podem originar-se de uma célula-tronco com capacidade de auto-renovação ou pode originar-se a partir de uma célula

progenitora mielóide mais diferenciada que adquira a capacidade de auto-renovação. A expansão clonal pode ocorrer através do aumento na proliferação ou por resistência à apoptose, e o microambiente medular pode favorecer o desenvolvimento do clone neoplásico (BEJAR et al. 2011).

Devido à grande complexidade das alterações genéticas na SMD, considerar como cada mutação contribui para a patogênese da doença e como elas cooperam com outras mutações e com as mudanças no microambiente, seja mais elucidativo (BEJAR et al. 2011).



Legenda: CTH: células-tronco hematopoéticas.

Fonte: Adaptado de TEFFERI e VARDIMAN (2009).

Figura 2 - Mecanismos envolvidos na patogênese da SMD.

1.2.1 Alteração epigenética – importante mecanismo para a patogênese da SMD

A transformação leucêmica na SMD envolve tanto alterações genéticas quanto epigenéticas, em um processo de múltiplas etapas (AGGARWAL et al. 2011).

O termo epigenético refere-se ao componente hereditário do fenótipo celular que não são modificados pelas mudanças na seqüência genômica do DNA (BEJAR et al. 2011). Os mecanismos moleculares mais importantes nos processos epigenéticos em SMD são o bloqueio da expressão gênica através da metilação dos resíduos de citosina no DNA e da modificação covalente das histonas (BEJAR et al. 2011).

A metilação do DNA é um mecanismo epigenético bem estabelecido que regula a transcrição gênica. As DNA metiltransferases (DNMTs) convertem as bases de citosina em 5-metilcitosina, quando estas encontram-se na primeira base dos dinucleotídeos CpG. Essas ilhas CpGs estão localizadas agrupadas próximo ou nas próprias regiões promotoras dos genes. Metilação das ilhas CpGs pode alterar a interação de proteínas com o DNA, tais como fatores de transcrição e enzimas de modificação das histonas. Normalmente, a metilação das ilhas CpGs resulta em silenciamento gênico e representa um dos mecanismos de perda da expressão dos genes supressores tumorais.

Nos casos de SMD de alto risco, a hipermetilação de alguns genes supressores tumorais está associada à pior sobrevida e aumento de risco de

transformação para leucemia (TEFFERI e VARDIMAN 2009; AGGARWAL et al. 2011; BEJAR et al. 2011).

Genes inibidores de quinase dependente de ciclina (CDKIs) *p15INK4B* e *p16INK4A* são supressores tumorais freqüentemente inativados por alterações gênicas. Os CDKIs formam complexos com as CDKs (quinase dependente de ciclinas) e contribuem para inibir o crescimento celular. *p15INK4B* é inibidor de CDK4 e CDK6. *p15INK4B* encontra-se metilado em aproximadamente 30-50% dos pacientes com SMD, e está correlacionado à porcentagem de blastos na medula, risco de evolução para LMA e pior prognóstico (HIRAI 2003; MUTFI 2004).

Desacetilação de histonas é outra alteração pós-transcricional observada em SMD e está associada com a redução da atividade transcricional. A acetilação das histonas permite o acesso à cromatina e aumenta a atividade transcricional. Para manter o balanço dinâmico entre acetilação e desacetilação, histonas deacetilase (HDACs) são recrutadas para regulação das regiões gênicas através de complexos co-repressores que diminuem a acessibilidade à cromatina, resultando no silenciamento transcricional (AGGARWAL et al. 2011).

1.2.2 Microambiente medular na patogênese da SMD

A hematopoese é regulada por elementos do nicho na medula óssea. Esses nichos são constituídos por diferentes tipos de células estromais, tais como células epiteliais, macrófagos, adipócitos, fibroblastos, osteoblastos e condrócitos, e também possuem vasos sanguíneos e elementos da matriz

extracelular. Essas células estromais participam da regulação da hematopoese através da secreção de vários tipos de citocinas e proteínas ligantes para as células hematopoéticas imaturas (AGGARWAL et al. 2011).

A angiogênese, por exemplo, é mediada por macrófagos, os quais produzem citocinas pró-inflamatórias, fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) e fator de crescimento de fibroblasto. Esses fatores angiogênicos estão elevados em SMD de alto risco quando comparados com SMD de baixo risco, o que resulta no aumento da vascularização e densidade de microvasos. Além disso, alguns fatores angiogênicos, incluindo o VEGF, provavelmente, contribuem para o microambiente imunossupressor nos casos de SMD de alto risco (AGGARWAL et al. 2011).

É conhecido que muitas células tumorais “modificam” seu nicho adjacente tornando-o um local mais adequado para a progressão tumoral, através de fatores de crescimento, interleucinas e proteases, liberadas pelas próprias células tumorais.

No entanto, mudanças no estroma não são sempre uma consequência de uma hematopoese anormal. Em estudos recentes, pesquisadores sugerem que células estromais alteradas podem atuar como um mutagênico (ISHIBASHI et al. 2011). Utilizando a estratégia de *knockout*, RAAIJMAKERS et al. (2010) produziram precursores de osteoclastos com deleção do gene *Dicer1* (essencial para a biogênese de microRNAs e processamento de RNAs), impedindo a diferenciação osteogênica. RAAIJMAKERS et al. (2010) demonstraram como uma primeira alteração na

célula estromal pode desenvolver displasia em células hematopoéticas normais e até direcionar à evolução clonal dessas células.

Acredita-se que haja outros mecanismos do microambiente medular que colaborem para a patogênese da doença.

1.2.3 Sistema imunológico na patogênese da SMD

Alguns estudos demonstraram uma significativa desregulação do sistema imune nos pacientes com SMD (Quadro 2). Embora haja evidências do papel do sistema imunológico na patogênese da SMD, o exato mecanismo através do qual a resposta imune contribui para a progressão da doença ainda não está claro (AGGARWAL et al. 2011).

Quadro 2 - Papel do sistema imunológico em pacientes com SMD de baixo e alto risco.

	SMD BAIXO RISCO	SMD ALTO RISCO	REFERÊNCIA
RESPOSTA IMUNE INATA			
CÉLULAS NK	↑	↓	Epling-Burnette et al. (2007); Chamuleau et al. (2009)
MACRÓFAGOS	↑	↓	Kitagawa et al. (1993); Sadahira et al. (1999)
CÉLULAS DENDRÍTICAS	↓	↓	Micheva et al. (2004); Ma L et al. (2007)
RESPOSTA IMUNE ADAPTATIVA			
CÉLULAS B	↓	↓	Sternberg et al. (2005); Disperati et al. (2006)
CÉLULAS Treg (CD4+FoxP3+)	↓	↑	Kotsianidis et al. (2009); Zou et al. (2009)
CÉLULAS Th17	↑	↓	Kordasti et al. (2009)
CÉLULAS T CD8+	↑	↓	Chamuleau et al. (2009); Zheng et al. (2010)
CÉLULAS NK	↑	↓	Chan et al. (2010)

Legenda: ↑ aumento da frequência de células ↓ diminuição da frequência de células

Fonte: Adaptado de AGGARWAL et al. (2011).

Sabe-se que distúrbios na resposta do sistema imune podem contribuir para as citopenias presentes no sangue periférico dos pacientes de SMD baixo risco. Na tentativa de eliminar o potencial clone nocivo, a atividade das células T, por exemplo, pode desencadear um processo de apoptose tanto de células displásicas quanto de células normais.

Os elevados níveis de citocinas pró-inflamatórias, presentes em pacientes com SMD de baixo risco, induzem à maturação das células dendríticas, fundamentais para o processo de ativação das células T antígeno específico. É provável que a apresentação cruzada de auto-antígenos (oriundos de células displásicas que entraram em apoptose por meio da atividade de células T citotóxicas (CD8⁺) e auxiliares (CD4⁺)) acione uma resposta imune adaptativa, resultando no aumento de apoptose, não apenas das células displásicas, mas também dos precursores normais (AGGARWAL et al. 2011).

Essas citocinas pró-inflamatórias (TNF- α , IL-1, IL-2, IL-6, IL-12 e INF- γ) também irão promover a expansão clonal das células T, elevando ainda mais o índice de apoptose. Proliferação e aumento da citotoxicidade de células T (CD8⁺) têm sido observados em pacientes com SMD (AGGARWAL et al. 2011).

Medula de pacientes com SMD também apresentam maior quantidade de macrófagos, o que pode ser um resultado do aumento dos níveis de MCS-F. Além disso, fibroblastos e macrófagos de pacientes com SMD secretam maiores quantidade de TNF- α , IL-6 e IFN- γ (MUTFI 2004; BERNASCONI 2008).

1.2.4 Mutações

A citogenética clássica detecta alterações cromossômicas em pelo menos metade dos pacientes com SMD (STEENSMA 2009). Pesquisadores têm demonstrado a importância de mutações pontuais e alterações epigenéticas na expressão gênica, que não são observadas pela citogenética clássica (BEJAR et al. 2011).

O arranjo de polimorfismo de nucleotídeo único (SNP) pode detectar a perda ou ganho de cópias de um determinado gene (TEFFERI e VARDIMAN 2009). Com o uso dessa tecnologia, mais sensível que a citogenética clássica, várias deleções de regiões e genes potencialmente envolvidos na gênese da SMD foram identificadas, tais como as dos genes reguladores de transcrição *ASXL1*, *TET2*, *RUNX1* e *EZH2* (AGGARWAL et al. 2011; BEJAR et al. 2011; NIMER 2011).

Os reguladores de transcrição desempenham importante papel tanto no desenvolvimento celular quanto na regulação da expressão de genes específicos das linhagens celulares (HIRAI 2003).

Mutações no gene *ASXL1* (*additional sex-comb like-1*), localizado no cromossomo 20q11, têm sido descritas em aproximadamente 10% dos casos de SMD (NIMER 2011). *ASXL1* codifica um membro da família de proteínas policomb que se liga à cromatina e está envolvida na regulação epigenética da expressão gênica. *ASXL1* atua por meio de interação direta com a histona acetiltransferase codificada pelo gene *NCOA1* ou com a histona demetilase codificada pelo gene *LSD1* (BEJAR et al. 2011).

TET2 (ten-eleven translocation 2), localizado no cromossomo 4q24, é o gene mais mutado em SMD, freqüentemente encontrado nos casos de SMD de baixo risco. Mutações em *TET2* estão presentes em aproximadamente 20% dos pacientes com SMD. *TET2* é uma alpha ketoglutarate (α KG) dioxigenase dependente que converte 5-metilcitosina em 5-hidroximetilcitosina, alterando a “marca” epigenética criada pelas DNA metiltransferases (DNMTs) (BEJAR et al. 2011; NIMER 2011).

RUNX1 (Runt-related transcription fator), localizado no cromossomo 21q22, é um gene membro da família de fatores de transcrição nuclear, também conhecido como *CBFA2* ou *AML1*, e é o segundo gene mais comumente mutado em SMD, presente em 7-15% dos pacientes com SMD *de novo* e em maior frequência em pacientes com SMD secundária (BEJAR et al. 2011). Algumas dessas alterações, além de perda funcional de *AML1*, também demonstram efeito dominante negativo sobre *AML1* normal (HIRAI 2003; NIMER 2011). Mutações no gene *RUNX1* são raras em pacientes com SMD de baixo risco, mas são observadas em aproximadamente 10% dos pacientes AREB (ISHIBASHI et al. 2011).

EZH2 (zeste homolog 2) localiza-se na região distal do braço longo do cromossomo 7 (7q) e codifica uma histona metiltransferase (HMT) que atua como subunidade catalítica da PRC2 (*polycomb repressive complex 2*). Trimetilação da lisina 27 da histona 3 por PRC2 é uma “marcação” epigenética associada ao silenciamento gênico. Nas doenças hematológicas, *EZH2* está freqüentemente mutado e parece conferir pior prognóstico. A perda de função de PRC2 tem sido associada ao aumento da

atividade e expansão das células-tronco hematopoéticas. *EZH2* encontra-se mutado em 6% dos casos de SMD e acima de 10% nos casos de SMD/NMP (neoplasias mieloproliferativas) (BEJAR et al. 2011).

Além de alterações em genes reguladores de transcrição, alguns membros da via de sinalização tirosina quinase estão mutados em SMD. Essas mutações resultam em ativação constitutiva do ciclo celular e subsequente proliferação. Mutações nessa classe de proteínas geralmente são consideradas eventos tardios no processo de leucemogênese (PEDERSEN-BJERGAARD et al. 2007).

Pacientes com SMD apresentam, mais frequentemente, mutações nos genes *RAS* (BEJAR et al. 2011). *RAS* é um importante componente da via de sinalização da proliferação celular, na qual encontra-se localizada abaixo dos receptores de tirosina quinase e acima da cascata de quinases citoplasmáticas, incluindo a MAPKs (proteínas quinases com atividade mitógena). MAPKs, por sua vez, regulam a atividade dos fatores de transcrição nuclear. *RAS* é ativada ao se ligar à molécula GTP, e inativada quando ligada à GDP. Proteínas *RAS* mutadas perdem a atividade GTPase (de hidrólise da GTP), desta forma permanecendo ativadas e conferindo uma ativação constitutiva da cascata de sinalização (HIRAI 2003).

Mutações no gene *NRAS* estão presentes entre 10-15% dos pacientes com SMD, e no gene *KRAS* entre 1-2%. Considerados isoladamente, essas mutações estão associadas com pior prognóstico e progressão para LMA (HIRAI 2003; BEJAR et al. 2011).

Outros membros dessa via de sinalização que se encontram raramente mutados em SMD incluem *BRAF*, *PTPN11* e *CBL* (BEJAR et al. 2011).

CBL codifica uma ubiquitina ligase associada à tirosina quinase que regula negativamente a sinalização dessa proteína através da sua degradação. Mutações no gene *CBL* resultam no aumento de receptores de tirosina quinase e da fosforilação de STAT5, a qual acredita-se mediar a hipersensibilidade das células mutadas à uma variedade de fatores de crescimento e citocinas. Mutantes de *CBL* são normalmente bialélicos, o que sugere que *CBL* seja um supressor tumoral. Encontra-se mutado em cerca de 5% dos pacientes de SMD (BEJAR et al. 2011).

O gene *FLT3*, que codifica um receptor tirosina quinase, está envolvido na proliferação e diferenciação dos precursores hematopoéticos. Duplicação em *tandem* desse gene é encontrada em aproximadamente 5% dos pacientes com SMD, e confere prognóstico desfavorável por estar associada à transformação leucêmica (HIRAI 2003; PINHEIRO et al. 2007; PINHEIRO et al. 2008).

A mutação *JAK-2 V617F* está presente em 50% dos pacientes do subtipo ARSA-T (anemia refratária com sideroblastos em anel e trombocitose - agrupada à categoria de doenças mielodisplásicas-mieloproliferativas) e em apenas 5% nos demais subtipos de SMD, e parece não ter nenhum significado prognóstico (BEJAR et al. 2011).

PTEN (*phosphatase and tensin homolog*) é um gene supressor tumoral que negativamente regula a via de sinalização PI3K

(*phosphoinositide 3-kinase*)/AKT, e sua mutação é encontrada na minoria dos paciente com SMD (ISHIBASHI et al. 2011).

Mutações em dois oncogenes de isocitrato desidrogenase (*IDH1* e *IDH2*) têm sido observadas em raros casos de SMD. *IDH1* e *IDH2* são enzimas dependentes de NADP^+ (nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato) que convertem isocitrato em αKG , e estão distribuídas no citoplasma e mitocôndria, respectivamente. As enzimas mutadas parecem alterar sua especificidade ao substrato. *IDH* mutantes consomem NADPH enquanto convertem αKG em 2HG (2-hidroxioglutarato), ao invés de gerar moléculas de NADPH através da conversão de isocitrato em αKG (BEJAR et al. 2011).

Mutações no gene *TP53*, localizado no cromossomo 17p, são encontradas em uma grande variedade de tumores e estão associadas à instabilidade genômica. Em SMD, *TP53* está mutado em 5-15% dos pacientes de SMD *de novo* e em maior frequência (20-30%) em pacientes de SMD que tiveram exposição prévia à agentes alquilantes e radiação (HIRAI 2003; PEDERSEN-BJERGAARD et al. 2007; BEJAR et al. 2011).

A proteína p53 é ativada por uma variedade de fatores de estresse celular, podendo causar parada no ciclo celular, ativar resposta de reparo ao DNA e induzir apoptose (BEJAR et al. 2011). A perda de p53 selvagem, por mutações pontuais ou alterações na região 17p, está associada com cariótipo complexo, resistência ao tratamento e pior prognóstico (KITA-SASAI et al. 2001; BEJAR et al. 2011).

1.2.5 Alterações cromossômicas

As alterações cromossômicas (estruturais e numéricas) encontradas em SMD podem ser distribuídas em 3 tipos: 1) pacientes com alterações não balanceadas, com perda ou ganho de material cromossômico; 2) pacientes com alterações balanceadas, com rearranjos cromossômicos sem nenhuma perda ou ganho visível de material; 3) pacientes com cariótipo normal (Tabela 2) (PEDERSEN-BJERGAARD et al. 2007).

Tabela 2 - Frequência de alterações citogenéticas em pacientes com SMD *de novo* e SMD secundária.

	NÃO BALANCEADA (5q-/5, 7q-/7, +8)	BALANCEADA (11q23, 21q22, 17q21, 16q22)	CARIÓTIPO NORMAL
SMD <i>de novo</i>	15-25 %	raro	50-60 %
SMD secundária	50-70 %	raro	5-10 %

Fonte: Adaptado de PEDERSEN-BJERGAARD et al. (2007).

A distribuição difere entre os pacientes com SMD *de novo* e SMD secundária. Entre os pacientes com SMD *de novo*, mais de 50% apresentam cariótipo normal e 15-25% apresentam alterações não balanceadas. Entre os pacientes com SMD secundária, cinquenta a setenta por cento possuem alterações não balanceadas e cinco a dez por cento possuem cariótipo normal. Em ambos, alterações balanceadas são raras (PEDERSEN-BJERGAARD et al. 2007).

Dentre as alterações não balanceadas, as mais comuns são a deleção do braço longo do cromossomo 5q (del(5q)), monossomia do cromossomo 7 ou deleção do braço longo do cromossomo 7 (del(7q-)), trissomia do 8 (+8), deleção do 20q (del(20q)), e nulissomia do cromossomo Y (ROMEO et al. 2002; BEJAR et al. 2011; LIMA et al. 2012).

Deleção envolvendo a região 5q é a alteração citogenética mais comum em pacientes com SMD, com uma incidência em torno de 15-20% (ROMEO et al. 2002; HIRAI 2003; BEJAR et al. 2011; LIMA et al. 2012). Quando isolada, a deleção 5q está associada com um prognóstico favorável (AGGARWAL et al. 2011). Deleções na região 5q afetam genes envolvidos na patogênese da doença, tais como: *RPS14*, gene que codifica um componente da subunidade ribossomal 40S, envolvido na maturação eritróide; *SPARC*, gene supressor tumoral, envolvido na adesão, angiogênese, proliferação e regulação da matriz extracelular e *EGR1* (do inglês *early growth response gene*), deleção de uma cópia desse gene aumenta a auto-renovação das células progenitoras (TEFFERI e VARDIMAN 2009; AGGARWAL et al. 2011; BEJAR et al. 2011).

Os pontos de quebra são variáveis entre os pacientes, mas a região mais deletada encontra-se entre as regiões 5q31 e 5q33. Vários genes que codificam receptores e fatores de transcrição hematopoéticos, tais como IL-3, IL-4, IL-5, M-CSF, GM-CSF e o receptor para M-CSF, estão localizados no braço longo do cromossomo 5. *IRF-1*, um gene com atividade anti-oncogênica, é localizado na região 5q31.1 (HIRAI 2003). O aumento da

expressão deste gene tem sido associado a presença de fenômenos de auto-imunidade em SMD com e sem 5q- (PINHEIRO et al. 2006).

A haploinsuficiência (perda de um alelo funcional e a não alteração do alelo remanescente), em vez da inativação homozigótica, pode ser outra possibilidade através da qual os genes que localizam-se na região 5q alteram a biologia da célula nos casos de SMD 5q- (TEFFERI e VARDIMAN 2009; NIMER 2011). Esse tipo de alteração pode resultar em hemizigose e revelação de oncogenes, mudanças nos níveis protéicos de expressão de genes ou inativação de genes supressores tumorais (MUTFI 2004).

Monossomia e deleção intersticial do 7q estão associadas com prognóstico desfavorável, tanto se isolada ou como parte de cariótipo complexo, e aproximadamente 10% dos pacientes com SMD possuem alterações no cromossomo 7. Essa frequência pode chegar a 50% em pacientes com SMD secundária, previamente tratados com agentes alquilantes (BEJAR et al. 2011).

Deleções na região 20q acometem aproximadamente 5% das SMD *de novo* (HIRAI 2003). Alterações citogenéticas 20q- isoladas, assim como nulissomia do cromossomo Y e cariótipo normal são consideradas de prognóstico favorável (GREENBERG et al. 1997; BEJAR et al. 2011). A perda do cromossomo Y é frequentemente considerada um fenômeno relacionado à idade e nem sempre é indicativo de doença clonal (TEFFERI e VARDIMAN 2009).

Deleções no braço longo dos cromossomos 11, 12 e 13 são menos frequentes, mas presentes em pacientes com SMD. O gene *RB*, localizado

na região 13q14, é deletado em alguns casos de SMD com del(13q) (HIRAI 2003).

Trissomia do 8 é alteração numérica mais comumente observada em SMD. Quando isolada, a trissomia do 8 é encontrada em aproximadamente 8% dos casos de SMD, e é considerada uma alteração citogenética de risco intermediário (GREENBERG et al 1997; BEJAR et al. 2011).

Embora alterações balanceadas sejam raras, translocações envolvendo a região 11q23 (*locus* do gene *MLL*) estão presentes em uma fração significativa dos casos de SMD com cariótipo complexo. *MLL* é reconhecidamente um importante componente da fusão de proteínas, participando de translocações com mais de 40 diferentes *loci* (LOOK 2005).

Entre os alvos de rearranjo de *MLL* estão os genes *Hoxa7* e *Hoxa9*, fatores de transcrição membros da família de genes *HOX* (do inglês *homeobox*). Os genes *HOX* são importantes no controle da morfogênese nos estágios iniciais da embriogênese, além de participarem do processo de diferenciação das células hematopoéticas (TEFFERI e VARDIMAN 2009). Estudos publicados sugerem que alguns genes *HOX* (*Hoxa7*, *Hoxa9* e *Hoxa10*) estão envolvidos na patogênese da SMD (AYTON e CLEARY 2003; DAVIDSON et al. 2003; POPPE et al. 2004; LOOK 2005). Duplicação em *tandem* do gene *MLL* também foi encontrada em pacientes de SMD com cariótipo normal ou com trissomia do cromossomo 11 (HIRAI 2003).

Outro gene envolvido em translocações com os genes da família *HOX* é o gene *NUP98*, localizado na região 11p15 (HIRAI 2003; BERNASCONI 2008). *NUP98* é uma nucleoporina envolvida na importação e exportação

nuclear de proteínas e RNAs. Rearranjos envolvendo o gene *NUP98* são mais freqüentes em pacientes com SMD secundária ao uso de inibidores topoisomerase II (PEDERSEN-BJERGAARD et al. 2007).

A Citogenética e impacto prognóstico na SMD

Desde que 30-50% dos casos de SMD *de novo* e 80% dos pacientes com SMD secundária possuem alterações citogenéticas clonais, estudos dos cromossomos possuem um importante papel no diagnóstico, seguimento, decisão terapêutica e prognóstico dos pacientes portadores dessa doença (HIRAI 2003; MUTFI 2004; LOOK 2005; HAASE 2008).

Além disso, o acompanhamento desses pacientes, com repetições periódicas do cariótipo, é fundamental, pois cerca de 30% dos pacientes adquirem alterações adicionais com o passar do tempo e 12% dos casos com cariótipo normal ao diagnóstico adquirem alterações subseqüentes, apresentando um prognóstico desfavorável quando comparados com indivíduos que permanecem com cariótipo inalterado (PINHEIRO et al. 2009).

Devido à heterogeneidade da patogênese da SMD, o seu curso clínico e prognóstico são altamente variáveis, e por isso há necessidade de se utilizar um modelo de estratificação de risco para direcionar a terapia a ser utilizada (KOMROKJI et al. 2010).

O estudo multicêntrico internacional realizado pelo grupo IMRAW (do inglês *International MDS Risk Assessment Working*) com 816 pacientes, resultou na elaboração do IPSS (do inglês *International Prognostic Score*

System), publicado por GREENBERG et al.(1997). O modelo prognóstico e sistema de escore foram baseados no número de citopenia, tipo de alteração citogenética e porcentagem de blastos na medula óssea. O escore de risco foi ponderado em relação ao seu poder estatístico. Baseado na soma dos escores de risco, pacientes foram divididos em 4 grupos de risco.

Com esse estudo, GREENBERG et al. (1997) demonstraram a importância das alterações citogenéticas na evolução dos pacientes ao dividirem essas alterações em grupos. Os casos com cariótipo indicativo de bom prognóstico (del (20q), del (5q), -Y e normal), de cariótipo desfavorável (alterações no cromossomo 7 e cariótipo complexo) e de cariótipo intermediário (outras alterações) possuem sobrevida média de 3.8, 0.8 e 2.4 anos, respectivamente.

O IPSS é o sistema de classificação e estratificação de risco mais usado, porém possui algumas limitações. O sistema de escore foi desenvolvido baseado em uma coorte de pacientes não tratados, para ser aplicado no momento do diagnóstico e não foi validado para ser um modelo flexível que pudesse ser aplicado em diferentes momentos. O sistema de pontuação considera para valor prognóstico o número de citopenias, e não leva em consideração a severidade da citopenia (KOMROKJI et al. 2010). Além disso, o IPSS incluiu apenas um número limitado de alterações citogenéticas, incluindo apenas as 5 alterações citogenéticas mais comuns associadas à SMD (STEENSMA 2009).

Devido à heterogeneidade citogenética encontrada em pacientes com SMD, o impacto de muitas alterações raras (frequência menor que 2%

(HAASE et al. 2007), assim como combinações de alterações permanecem sem “valor”, só podem ser delineados com base em estudos cooperativos multicêntricos de grande escala internacional (HAASE 2008).

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

As alterações citogenéticas encontradas foram classificadas em 5 subgrupos: muito bom prognóstico (del(11q), -Y); bom prognóstico (normal, del(12p), del(20q), del(5q) isolada ou com 1 alteração adicional); cariótipo intermediário (del(7q), +8, i(17q), +19, +21, clones com 1 alteração (exceto as mencionados como bom prognóstico), clones com 2 alterações (exceto del(5q)+1); cariótipo desfavorável (inv(3)/t(3q)/del(3q), monossomia do cromossomo 7, -7/del(7q) com 1 alteração adicional, cariótipo complexo com 3 alterações) e muito desfavorável (cariótipo complexo > 3 alterações), com sobrevida média de 60.8, 48.6, 26, 15.8 e 5.9 meses, respectivamente (Tabela 3).

Tabela 3 – Nova proposta de estratificação citogenética.

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

Legenda: NA = não alcançado

Fonte: Adaptado de SCHANZ et al. (2012).

Os dados deste estudo mostraram que a deleção da região 7q é mais favorável, quando comparada com a perda de todo o cromossomo 7, no que diz respeito à sobrevida média e ao risco de transformação para LMA.

Clones com -7/del(7q) e alteração adicional estão associados com pior prognóstico. Todos os demais clones com 2 alterações mostram ter impacto prognóstico intermediário. Além disso, SCHANZ et al. (2012) conseguiram demonstrar que os cariótipos complexos com 3 alterações apresentaram diferença significativa em relação ao prognóstico quando comparados com os casos com mais de 3 alterações.

Por esse novo modelo prognóstico, noventa e um por cento de todos os pacientes podem ser estratificados, aumentando o poder de predição do

risco citogenético. No entanto, os novos subgrupos ainda precisam ser incorporados à um novo sistema de escore.

1.2.6 Proteínas relacionadas ao ponto de checagem mitótico

Alterações cromossômicas são consideradas o principal fator prognóstico em SMD, porém os mecanismos associados a estas alterações necessitam de maiores estudos. As possíveis causas associadas ao fenômeno da aneuploidia, por exemplo, não são completamente entendidas e pouco tem sido feito no sentido de se avaliar a fisiopatologia deste fenômeno relacionado à SMD.

A segregação inapropriada dos cromossomos durante a mitose pode ser um fator importante. Como mostrado em vários tipos de tumores, problemas nos pontos de checagem permitem que as células prossigam com a mitose antes da formação da maquinaria apropriada, ocasionando erros na segregação cromossômica (WARNER et al. 2003).

O ponto de checagem mitótico assegura que os cromossomos sejam corretamente segregados, evitando que células com cromossomos desalinhados (não ligados corretamente aos microtúbulos do fuso) finalizem a mitose. Essa verificação consiste de três componentes: um sensor que detecta a presença de cromossomos desalinhados; um transdutor que amplifica o sinal gerado pelo sensor; um inibidor que é capaz de parar o ciclo celular até que todos os cromossomos estejam corretamente alinhados (SUDAKIN et al. 2001). Isso garante que um único cinetocoro (complexo protéico localizado em torno do centrômero dos cromossomos) não ligado

ou ligado de forma incorreta aos microtúbulos possa gerar sinais inibitórios suficientes para evitar que a célula prossiga à mitose (SUDAKIN et al. 2001).

Quando o ponto de checagem mitótico é acionado, a atividade do Complexo Promotor da Anáfase (uma proteína ubiquitina ligase) é inibida, impedindo a progressão da metáfase para anáfase do ciclo celular (ACQUAVIVA e PINES 2006).

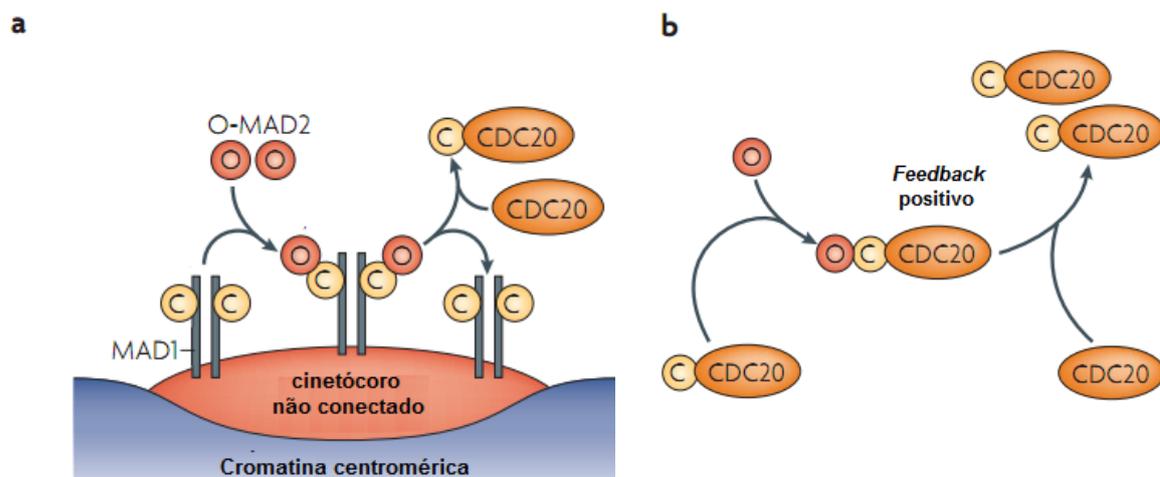
O Complexo Promotor da Anáfase (CPA) parece ser um alvo-chave na intervenção do ponto de checagem (FANG et al. 1999), sendo sua atividade intimamente controlada no ciclo celular. A ativação de CPA na mitose é iniciada através de sua fosforilação por CDK1/ciclina B (PATRA e DUNPHY 1998; FARRUGGIO et al. 1999). A fosforilação de CPA aumenta sua afinidade por CDC20, um cofator de reconhecimento protéico (LI et al. 1997). Através da adição de subunidades de ubiquitina, o complexo CPA^{CDC20} indica quais proteínas serão degradadas, permitindo, desta forma, a transição entre metáfase e anáfase, e a progressão do ciclo celular (PETERS 2006).

A ativação do ponto de checagem mitótico, através da inibição de CPA, é realizada por meio do complexo inibitório CCM (Complexo de Checagem Mitótico), composto pelas proteínas BUB1, BUBR1 (BUB1B), BUB3, MAD1 (MAD1L1) e MAD2 (MAD2L1), que seqüestram as moléculas de CDC20, impedindo a ativação de CPA até o completo e correto alinhamento dos cromossomos ao fuso mitótico (SUDAKIN et al. 2001; BRAUNSTEIN et al. 2007; MONDAL et al. 2007; MUSACCHIO e SALMON 2007).

Durante a mitose, moléculas de MAD2, um componente chave desse processo, são recrutadas por MAD1, receptores localizados nos cinetócoros. Associadas à MAD1, MAD2 modifica sua conformação e forma um complexo estável (MAD2-MAD1), que será responsável pela modificação de outras moléculas de MAD2 livres no citoplasma (Figura 3a).

Os mecanismos bioquímicos e estruturais envolvidos da interação entre MAD2, MAD1 e CDC20, revelam que MAD2 assume duas formas conformacionais distintas, denominadas *open*-MAD2 (O-MAD2) e *closed*-MAD2 (C-MAD2).

Em um primeiro momento, os cinetócoros não conectados aos microtúbulos ou incorretamente alinhados, recrutam através de MAD1, moléculas O-MAD2. Ao interagir com MAD1, O-MAD2 modifica sua conformação para C-MAD2, e forma, juntamente com MAD1, o complexo estável C-MAD2-MAD1. Este complexo, por sua vez, recruta novas moléculas de O-MAD2, livres no citoplasma, aos cinetócoros. Como moléculas com conformação O-MAD2 não interagem com CDC20, o complexo C-MAD2-MAD1 funciona como uma plataforma de conversão das moléculas de MAD2 (da conformação O-MAD2 para C-MAD2). Após ligar-se à CDC20, o complexo formado (C-MAD2-CDC20) adquire propriedades catalíticas e também atua como uma plataforma conversora de moléculas MAD2, amplificando o sinal inibitório à CDC20 (MUSACCHIO e SALMON 2007; LAD et al. 2009) (Figura 3 a,b).



Legenda: a) Moléculas de MAD1, dispostas em cinetócoros não conectados, formam um complexo estável com MAD2 (C-MAD2-MAD1). Este complexo recruta e modifica a estrutura conformacional de moléculas O-MAD2, que se encontram livres no citoplasma, em moléculas C-MAD2. Por sua vez, moléculas C-MAD2 interagem e inibem CDC20 (C-MAD2-CDC20). b) O complexo C-MAD2-CDC20 também possui atividade catalítica que o permite modificar moléculas O-MAD2, em uma reação de auto-amplificação.

Fonte: Adaptado de MUSACCHIO e SALMON (2007).

Figura 3 - Esquema de mudança conformacional de MAD2.

SUDAKIN et al. (2001) demonstraram que a população de MAD2 livre em células HeLa está presente em níveis de 20 a 50 vezes maiores que a população de MAD2 encontrada em CCM, porém não inativam CPA.

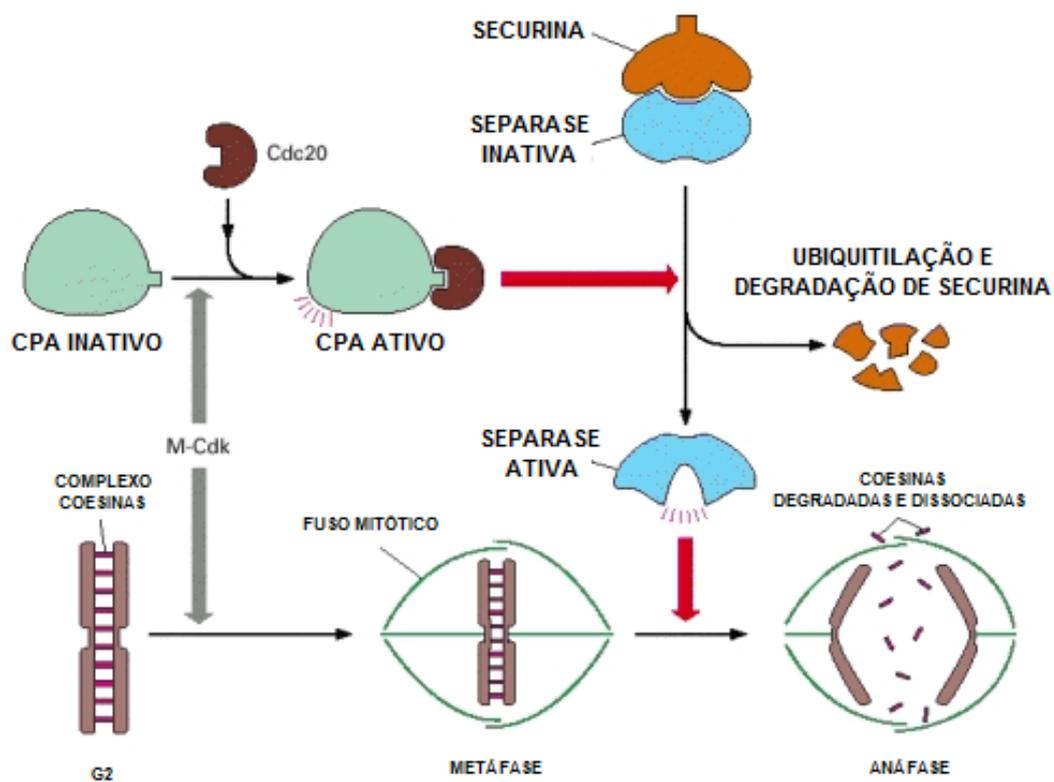
Desta forma, MAD2 funciona como um sensor do ponto de checagem mitótico (CHEN et al. 1996; LI e BENEZRA 1996), monitorando a conexão dos cinetócoros com os microtúbulos, impedindo a atividade de CPA (LI et al. 1997). Enquanto MAD2 estiver ligado à CDC20, CPA não é ativado.

Após todos os cromossomos estarem alinhados corretamente na metáfase, MAD2 dissocia-se de CDC20, permitindo a ativação de CPA (LI et al. 1997; FANG et al. 1999; BRAUNSTEIN et al. 2007).

Securina, uma das inúmeras proteínas marcadas pelo complexo CPA^{CDC20}, é degradada, o que resulta na liberação de separase. Livre e ativa, separase degrada as moléculas de coesinas, as quais, até o momento, mantinham as cromátides irmãs unidas, permitindo a migração das cromátides para os pólos e a transição de metáfase para anáfase (Figura 4). Em vertebrados, a anáfase inicia apenas quando securina e ciclina B estão quase totalmente degradados (CLUTE e PINES 1999; HAGTING et al. 2002; BRITO e RIEDER 2006).

Assim, o equilíbrio entre CDC20 e seus inibidores é imprescindível para assegurar uma adequada ativação de CCM em condições fisiológicas.

WANG et al. (2000, 2002) encontraram expressão reduzida de MAD2 em 40% (2/5) e 43% (3/7) das linhagens de células de carcinoma de nasofaringe e câncer de ovário analisadas, respectivamente.



Legenda: Após degradação de securina, mediada pelo complexo CPA^{CDC20}, separase é liberada e degrada as moléculas de coesinas, permitindo a migração das cromátides para os pólos e a progressão do ciclo celular.

Fonte: Adaptado de ALBERTS et al. (2008)

Figura 4 - Progressão da metáfase para anáfase.

Baixas concentrações de MAD2 reduzem a capacidade de sinalização do ponto de checagem, proporcionando falhas na segregação cromossômica e o aparecimento de aneuploidias. MICHEL et al. (2001) demonstraram que perda parcial de MAD2 resulta em degradação de securina e separação das cromátides irmãs prematuramente, resultando em altos índices de aneuploidia e poliploidia. Ademais, a completa perda de MAD2 mostrou-se letal durante o desenvolvimento embrionário de camundongos (DOBLES et al. 2000; MICHEL et al. 2004a, b).

Mutações nos genes da família MAD e BUB, componentes do ponto de checagem mitótico, são extremamente raros, no entanto, níveis reduzidos de expressão de MAD2 foram encontrados em diferentes tipos de cânceres, sugerindo que mecanismos transcricionais e/ou translacionais estão envolvidos na alteração de expressão do gene MAD2 (WANG et al. 2000; WANG et al. 2002; JEONG et al. 2004; BURUM-AUENSEN et al. 2010; DÍAZ-RODRÍGUEZ et al. 2011) (Quadro 3).

JEONG et al. (2004) demonstraram que os baixos níveis transcricionais de MAD2 encontrados em linhagens celulares de hepatocarcinoma estavam relacionados ao silenciamento transcricional por hipermetilação do promotor.

DÍAZ-RODRÍGUEZ et al. (2011) investigaram o perfil de expressão gênica e protéica de 23 genes relacionados com a dinâmica dos cinetócoros e com o ponto de checagem mitótico em doze linhagens celulares de mieloma múltiplo. Dentre elas, duas linhagens apresentaram níveis protéicos de MAD2 bastante reduzidos, a despeito dos níveis normais de RNAm, implicando em defeitos de translação ou de estabilidade protéica. Essa redução nos níveis de MAD2 foi associada a falhas no processo de segregação cromossômica. Fragmentos de cromossomos e DNA deixados para trás durante a anáfase e telófase, e formação de pontes cromossômicas foram freqüentemente observadas nessas linhagens.

Superexpressão de MAD2 também tem sido relatada em diferentes tipos de cânceres (LI e ZHANG 2004; YUAN et al. 2006; PINTO et al. 2007; SOTILLO et al. 2007; ZHANG et al. 2008; WANG et al. 2009) (Quadro 3).

Quadro 3 - Perfil de expressão de MAD2L1 em diferentes neoplasias.

NEOPLASIA	OBSERVAÇÃO	REFERÊNCIA
MIELOMA MÚLTIPLO	Expressão gênica e protéica normal (exceto 2 linhagens) → baixa expressão	Díaz-Rodríguez et al. 2011
TUMOR DE CÉLULAS GEMINAIS TESTICULARES	Baixa expressão protéica	Burum-Auensen et al. 2010
CÂNCER GÁSTRICO	Alta expressão gênica e protéica Correlação com agressividade tumoral	Wang et al. 2009
HEPATOCELULAR	Alta expressão gênica e protéica Correlação com agressividade tumoral	Zhang et al. 2008
	Baixa expressão gênica → hipermetilação da região promotora do gene	Jeong et al. 2004
CARCINOMA RENAL	Alta expressão gênica	Pinto et al. 2007
CANCER DE MAMA	Alta expressão gênica e protéica	Yuan et al. 2006
CÂNCER COLORETAL	Alta expressão protéica Correlação com agressividade tumoral	Li e Zhang 2004
OVÁRIO	Baixa expressão protéica (43% das linhagens)	Wang et al. 2002
CARCINOMA DE NASOFARINGE	Baixa expressão protéica (40% das linhagens)	Wang et al. 2000

Estudo de microarranjo tecidual com diferentes neoplasias hematológicas (leucemia linfocítica crônica, linfoma folicular, linfoma de células do manto, linfoma difuso de grandes células, diferentes linfomas de células T e mieloma) mostrou que apenas os casos de LDGC, um subgrupo de linfoma folicular grau 3, linfoma de Burkitt e linfoma linfoblástico de células T apresentavam superexpressão de MAD2 (SOTILLO et al. 2007).

Em carcinoma hepatocelular, câncer coloretal e gástrico, o aumento nos níveis protéicos de MAD2 mostrou estar associado ao grau de diferenciação histológica (tumores menos diferenciados apresentaram níveis mais elevados de MAD2), presença de metástase linfonodal (exceto para

carcinoma hepatocelular) e pior prognóstico (LI e ZHANG 2004; ZHANG et al. 2008; WANG et al. 2009).

SOTILLO et al. (2007) demonstraram que a superexpressão de MAD2 pode iniciar o processo de tumorigênese e cooperar com outros estímulos oncogênicos. Fibroblastos murinos expressando elevados níveis de MAD2 mostraram aumento no número de fragmentos de cromossomos, fusão de extremidades (cromossomos acêntricos e dicêntricos), formação de pontes cromossômicas, assim como quebra de cromátides, resultando em células mono e binucleadas com alteração no número de cromossomos. Estes fibroblastos também apresentaram evidência de separação da heterocromatina nos centrômeros, provavelmente devido à tensão exercida pelos microtúbulos por um prolongado período durante o bloqueio metafásico.

A superexpressão de MAD2 retarda a progressão da mitose, adiando a proteólise de ciclina B pelo complexo CPA, no entanto, o complexo de checagem mitótico (CCM) não bloqueia as células permanentemente. BRITO e RIEDER (2006) demonstraram que ciclina B é progressivamente degradada pelos mecanismos proteossoma-dependentes durante o bloqueio por CCM. Com isso, baixos níveis, porém constantes, de ubiquitilação e proteólise decrescem aos poucos a quantidade de ciclina B necessária para manter a mitose bloqueada, permitindo a progressão e finalização da mitose. A presença dessas alterações cromossômicas descritas por SOTILLO et al. (2007) refletem a tentativa da célula em contornar o bloqueio mitótico imposto pela superexpressão de MAD2.

Isso demonstra que mudanças de expressão de MAD2 estão diretamente relacionadas às alterações no processo de divisão celular, e que o grau de comprometimento do ponto de checagem está intimamente associado à incidência de instabilidade cromossômica.

Além das alterações nos níveis de expressão de MAD2, FANG et al. (1999) demonstraram que altas concentrações de CDC20 são suficientes para ativar CPA, independente do seu estado de fosforilação. Em concentrações normais, a desfosforilação de CPA proporcionaria o desligamento de CDC20 e a inativação de CPA (FANG et al. 1998). Desta forma, a superexpressão de CDC20 pode pender a balança para ativação imprópria de CPA, sobrepondo os efeitos inibitórios do complexo de checagem mitótico (CCM).

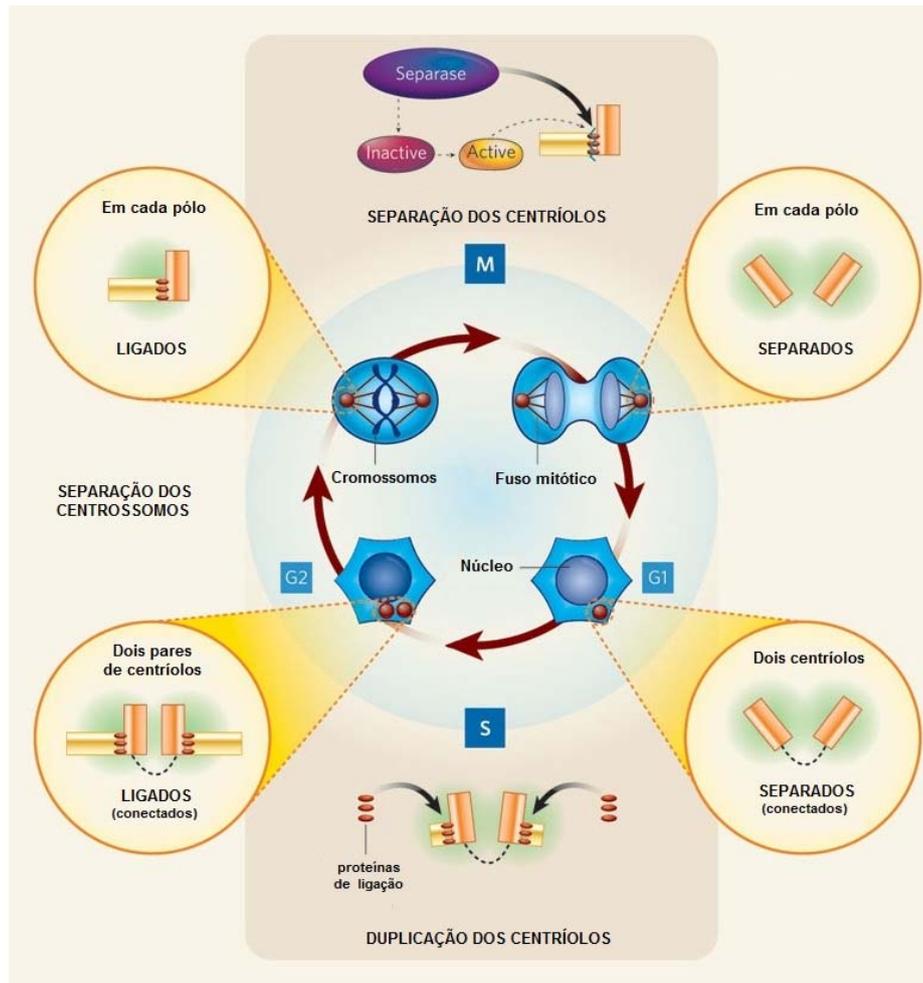
Em seu trabalho, RAJKUMAR et al. (2011) sugerem que a superexpressão de CDC20 apresenta efeitos mais deletérios à função do CCM do que a baixa expressão de MAD2, já que outros componentes do CCM (BUB3/BUBR1) também desempenham ação inibitória contra CDC20 durante o bloqueio mitótico.

CDC20 localiza-se no centrossomo durante a interfase, e nos pólos do fuso e cinetócoros durante a mitose, e sua superexpressão também pode, através da ativação prematura de CPA, interferir no ciclo de duplicação dos centrossomos (LIU et al. 2010).

Os centrossomos são organelas constituídas por um par de centríolos submerso em uma matriz protéica, denominada material pericentriolar (NIGG 2007), e funcionam como âncora para a nucleação dos microtúbulos,

centro organizador do fuso mitótico e plataforma para o recrutamento de proteínas estruturais, motoras e catalíticas (WARNER et al. 2003).

Durante o ciclo do centrossomo (Figura 5), a separação dos centríolos é a fase decisiva que permite que um novo ciclo se inicie. Separase é uma das proteínas envolvidas na separação dos centríolos e, portanto, desregulação ou ativação prematura de separase pode criar condições que permitam vários ciclos de duplicação dos centríolos durante um único ciclo celular e causar a formação de fuso multipolar (NIGG 2006; TSOU e STEARNS 2006; LUKASIEWICZ e LINGLE 2009; TSOU et al. 2009).



Legenda: O ciclo do centrossomo é caracterizado pela separação, duplicação e desenvolvimento dos centríolos, e pela maturação e separação dos centrossomos. As células iniciam a fase G1 com um centrossomo contendo um par de centríolos. No final da mitose ou início de G1, as duas unidades de centríolos são separadas. A duplicação dos centríolos inicia-se na fase S, caracterizada pela formação dos pró-centríolos na base de cada centríolo original. Cada pró-centríolo permanece ligado ao centríolo original, impedindo a reduplicação dos centríolos. O completo desenvolvimento do pró-centríolo ocorre durante o restante da fase S e G2 do ciclo celular. Ao final da fase G2, a célula possui dois centrossomos com quatro centríolos. A separação dos centrossomos inicia-se em G2, o que permite a migração dos centrossomos e a formação dos pólos do fuso mitótico. Após a segregação cromossômica e citocinese, são geradas duas células-filhas, cada uma com um centrossomo contendo um par de centríolos (centríolo original + pró-centríolo). Ao final da mitose, início de G1, o ciclo do centrossomo inicia-se novamente com a separação das unidades de centríolos.

Fonte: Adaptado de NIGG (2006).

Figura 5 - Ciclo do centrossomo.

A interação entre o ciclo do centrossomo e o ciclo celular é imprescindível para garantir a estabilidade genômica. Qualquer alteração no número de centrossomos pode resultar na formação de fusos mono ou multipolares, com conseqüências para a segregação cromossômica. Assim, alterações centrossomais têm sido relacionadas à aneuploidia e ao desenvolvimento do câncer (NIGG 2007; LUKASIEWICZ e LINGLE 2009).

Estudos comprovam sua superexpressão em câncer de pâncreas (LI et al. 2003), linhagens de células de câncer gástrico (KIM et al. 2005) e de mama (YUAN et al. 2006; JIANG et al. 2011), carcinoma de ovário (OUELLET et al. 2006) e carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço (MONDAL et al. 2007), gliomas (MARUCCI et al. 2008); câncer de bexiga (ZARAVINOS et al. 2011) e cervical (RAJKUMAR et al. 2011) (Quadro 4).

RHODES et al. (2004) realizaram uma metanálise dos dados de microarranjos e identificaram que *CDC20* é um dos genes mais comumente superexpressos em tecidos indiferenciados de câncer humano.

MONDAL et al. (2007) observaram alteração no número de centrossomos e presença de divisões mitóticas multipolares em carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço.

Alguns trabalhos relatam que a superexpressão de *CDC20* está associada à agressividade tumoral (Quadro 4).

Quadro 4 - Perfil de expressão de CDC20 em diferentes neoplasias.

NEOPLASIA	OBSERVAÇÃO	REFERÊNCIA
MIELOMA MÚLTIPLO	Expressão gênica e protéica normal (exceto 1 linhagem) → baixa expressão	Díaz-Rodríguez et al. 2011
CÂNCER DE MAMA	Alta expressão gênica	Jiang et al. 2011
	Alta expressão gênica e protéica	Yuan et al. 2006
CÂNCER CERVICAL	Alta expressão gênica	Rajkumar et al. 2011
CÂNCER DE BEXIGA	Alta expressão gênica	Zaravinos et al. 2011
GLIOBLASTOMA	Alta expressão gênica e protéica Correlação com agressividade tumoral	Marucci et al. 2008
CARCINOMA DE CÉLULAS ESCAMOSAS DE CABEÇA E PESCOÇO	Alta expressão gênica e protéica	Mondal et al. 2007
CÂNCER DE OVÁRIO EPITELIAL	Alta expressão protéica (tissue array) Correlação com agressividade tumoral	Ouellet et al. 2006

OUELLET et al. (2006) demonstraram que a superexpressão de CDC20 estava correlacionada à menor sobrevida em pacientes com carcinoma epitelial de ovário invasivo. MARUCCI et al. (2008) mostraram que gliomas de alto grau apresentavam superexpressão de CDC20, enquanto que encontrava-se baixo expresso nos tumores de baixo grau.

1.2.7 Proteínas relacionadas ao fuso mitótico

Existem outras proteínas associadas à segregação inapropriada dos cromossomos durante a mitose. Atenção especial tem sido dada a um grupo de proteínas da família das serina/treonina kinases, Aurora/Ipl1 Kinases Relacionadas (AIRKs), que está associado à regulação da duplicação dos centrossomos e segregação dos cromossomos (TONG et al. 2004).

Das três AIRKs humanas (AURORA A, B e C) já identificadas, AURORA A (AURKA) e B (AURKB) têm sido associadas a diversas neoplasias (Quadros 5 e 6).

O gene *AURKA* codifica uma proteína com 403 aminoácidos e localiza-se no cromossomo 20q13.2-q13.3 (TONG et al. 2004), uma região frequentemente amplificada em tumores malignos humanos e alvo de deleções em Síndrome Mielodisplásica.

Amplificação gênica e superexpressão de *AURKA* têm sido demonstradas em vários tipos de tumores humanos, incluindo câncer pancreático, de bexiga, coloretal, carcinoma invasivo de células uroteliais e LMA (SEN et al. 2002; ROJANALA et al. 2004; PARK et al. 2008; VEERAKUMARASIVAM et al. 2008; LASSMANN et al. 2009; LUCENA-ARAUJO et al. 2011) (Quadro 5).

Quadro 5 - Perfil de expressão de AURKA em diferentes neoplasias.

NEOPLASIA	OBSERVAÇÃO	REFERÊNCIA
LEUCEMIA MIELÓIDE AGUDA	Amplificação Aumento da expressão gênica (10% dos pcts) Correlação o WBC Correlação com agressividade tumoral	Lucena-Araujo et al. 2011
	Aumento expressão protéica (66,3%)	Huang et al. 2008
LEUCEMIA MIELÓIDE AGUDA E SMD	Aumento expressão gênica e protéica	Ye et al. 2009
LEUCEMIA AGUDA (LLA/LMA)	Aumento expressão gênica	Ikezoe et al. 2007
LINFOMA DO MANTO E LINFOMA DIFUSO DE GRANDE CÉLULAS-B	Sem amplificação Aumento da expressão gênica Correlação com proliferação celular	Camacho et al. 2006
LINFOMA NÃO-HODGKIN	Aumento expressão gênica Correlação com agressividade tumoral	Hamada et al. 2003
TUMOR DE CÉLULAS GERMINAIS TESTICULARES	Aumento expressão protéica	Burum-Auensen et al. 2010
CARCINOMA HEPATOCELULAR	Aumento expressão protéica	Lin et al. 2010
	Sem amplificação Aumento da expressão gênica e protéica Correlação com agressividade tumoral	Jeng et al. 2004
GLIOMA	Aumento expressão gênica Correlação com agressividade tumoral	Loh et al. 2010
CÂNCER COLORETAL ESPORÁDICO	Amplificação Aumento da expressão gênica e protéica Correlação com agressividade tumoral	Lassmann et al. 2009
CARCINOMA CERVICAL ESCAMOSO	Aumento expressão protéica	Twu et al. 2009
CÂNCER DE BEXIGA	Amplificação Aumento expressão gênica e protéica Correlação com agressividade tumoral	Park et al. 2008
	Amplificação Aumento expressão protéica Correlação com agressividade tumoral	Sen et al. 2002
CARCINOMA INVASIVO DE CÉLULAS UROTELIAIS	Amplificação Aumento expressão gênica e protéica Correlação com agressividade tumoral	Veerakumarasivam et al. 2008
CÂNCER PANCREÁTICO	Amplificação Aumento expressão gênica e protéica	Rojanala et al. 2004
CÂNCER DE OVÁRIO	Sem amplificação Aumento expressão gênica e protéica	Gritsko et al. 2003
CÂNCER GÁSTRICO	Sem amplificação Aumento expressão gênica	Sakakura et al. 2001

Quadro 6 - Perfil de expressão de AURKB em diferentes neoplasias.

NEOPLASIA	OBSERVAÇÃO	REFERÊNCIA
LEUCEMIA MIELÓIDE AGUDA	Aumento da expressão gênica (10% dos pcts) Correlação com aumento de WBC	Lucena-Araujo et al. 2011
	Aumento expressão protéica (40,8% dos pcts)	Huang et al. 2008
LEUCEMIA AGUDA (LLA/LMA)	Aumento expressão gênica	Ikezoe et al. 2007
LEUCEMIA LINFOCÍTICA CRÔNICA	Aumento da expressão gênica	Careta et al. 2011
LINFOMA NÃO-HODGKIN	Aumento expressão protéica (48% LDGC; 86% L. Burkitt) Correlação com agressividade tumoral	Ikezoe et al. 2009
CARCINOMA HEPATOCELULAR	Aumento expressão protéica (61%) Correlação com agressividade tumoral	Lin et al. 2010
CARCINOMA CERVICAL ESCAMOSO	Aumento expressão protéica	Twu et al. 2009
CÂNCER GÁSTRICO	Aumento expressão gênica Correlação com bom prognóstico: superexpressão=↑aneuploidia = supressão tumoral	Enjoji et al. 2009
CARCINOMA PULMONAR DE CÉLULAS NÃO PEQUENAS	Aumento expressão protéica (78%) Correlação com agressividade tumoral	Vischioni et al. 2006
CARCINOMA DE TIREÓIDE	Aumento expressão protéica Correlação com agressividade tumoral	Sorrentino et al. 2005

KE et al. (2003) demonstraram que sua superexpressão interfere na formação do CCM (Complexo de Checagem Mitótico), mais especificamente, na interação CDC20-BUBR1. ANAND et al. (2003) sugeriram que AURKA, quando superexpressa, age suprimindo MAD2 e estimulando CDC20, sobrepondo o ponto de checagem mitótico.

Além de intervir na dinâmica do CCM, AURKA interage com diferentes proteínas (Gadd45a, p53, TACC, Plk1, Eg5), e, por conseguinte, sua superexpressão interfere em diversos processos celulares que resultam em falhas no processo mitótico e instabilidade genômica (TONG et al. 2004).

A interação entre AURKA e p53, por exemplo, resulta na inibição ou degradação de p53. Fosforilação de p53 em Ser215 impede a ligação de p53 ao DNA, interferindo da ativação transcricional de genes alvo (p21 e PTEN, por exemplo). Ao fosforilar o resíduo Ser315, AURKA direciona a ubiquitilação de p53 por Mdm2 e sua subsequente proteólise (LUKASIEWICZ e LINGLE 2009). A superexpressão de AURKA também ativa NF- κ B, através da inibição do seu inibidor I κ B. NF- κ B por sua vez, promove a expressão de Bcl-2 (proteína anti-apoptótica) (HECKMAN et al. 2002; BRIASSOULI et al. 2007). Portanto, a superexpressão de AURKA interfere nos mecanismos de reparo do DNA, sobrevivência e transformação celular.

A superexpressão de AURKA também tem sido correlacionada com a amplificação dos centrossomos (MERALDI et al. 2002; LITTLEPAGE e RUDERMAN 2002; TONG et al. 2004). Amplificação do centrossomo ocorre quando a célula possui mais do que 2 centrossomos ou 4 centríolos, ou quando o centrossomo é maior do que o normal (excesso de material pericentriolar), e é um fenômeno comum tanto em neoplasias hematológicas quanto em tumores sólidos (LUKASIEWICZ e LINGLE 2009).

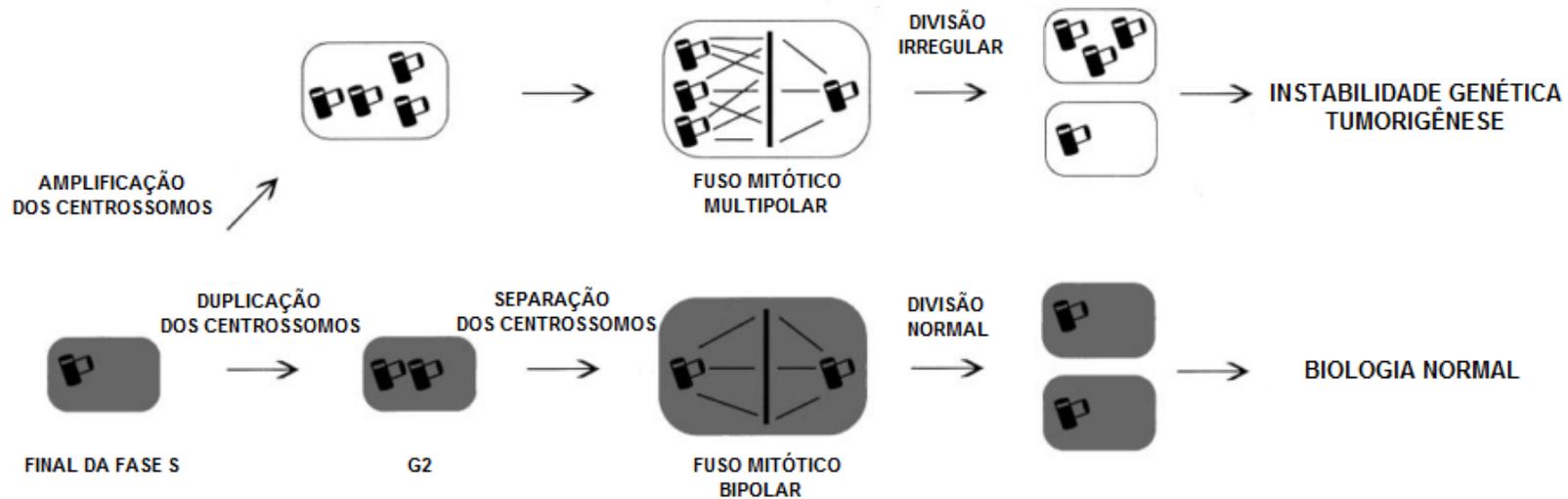
AURKA é a principal proteína reguladora do processo de maturação dos centrossomos, que ocorre no final da fase G2 e durante a prófase, e consiste principalmente no recrutamento de diferentes proteínas (LUKASIEWICZ e LINGLE 2009). A perda na regulação da duplicação e maturação dos centrossomos, consequência da superexpressão de AURKA,

resulta em células com número anormal destes elementos (multipolares) e falhas na dinâmica do aparelho mitótico (LI et al. 2003).

A sobreposição ao CCM juntamente com a amplificação dos centrossomos, ambos decorrentes da superexpressão de AURKA, corroboram para o aparecimento de aneuploidias e o processo de tumorigênese (DUTERTRE e PRIGENT 2003; WARNER et al. 2003) (Figura 6).

Outro importante membro da família das serina/treonina kinases associada a neoplasias é o gene da *AURKB* (17p13) que codifica uma proteína que interage com INCENP (proteína interna do centrômero), borealina e survivina, formando um complexo que, durante a prófase, localiza-se ao longo de todo o cromossomo, concentra-se no interior da região central dos centrômeros durante a prometáfase e metáfase, e no início da anáfase, migram para a região central do fuso para participar da citocinese (VAGNARELLI e EARNSHAW 2004; BOLANOS-GARCIA 2005). As três subunidades não enzimáticas do complexo regulam a atividade enzimática e estabilidade de AURKB (SABBATTINI et al. 2007; ENJOJI et al. 2009).

AURKB tem sido associada à segregação cromossômica e citocinese, e sua atividade é necessária para a orientação bipolar e condensação dos cromossomos (DEWAR et al. 2004). Sua superexpressão tem sido correlacionada com múltiplos defeitos na maquinaria mitótica, dentre os quais, perda da conexão entre cinetócoro e microtúbulos e finalização da mitose sem os eventos característicos da anáfase ou citocinese (MURATA-HORI et al. 2002).



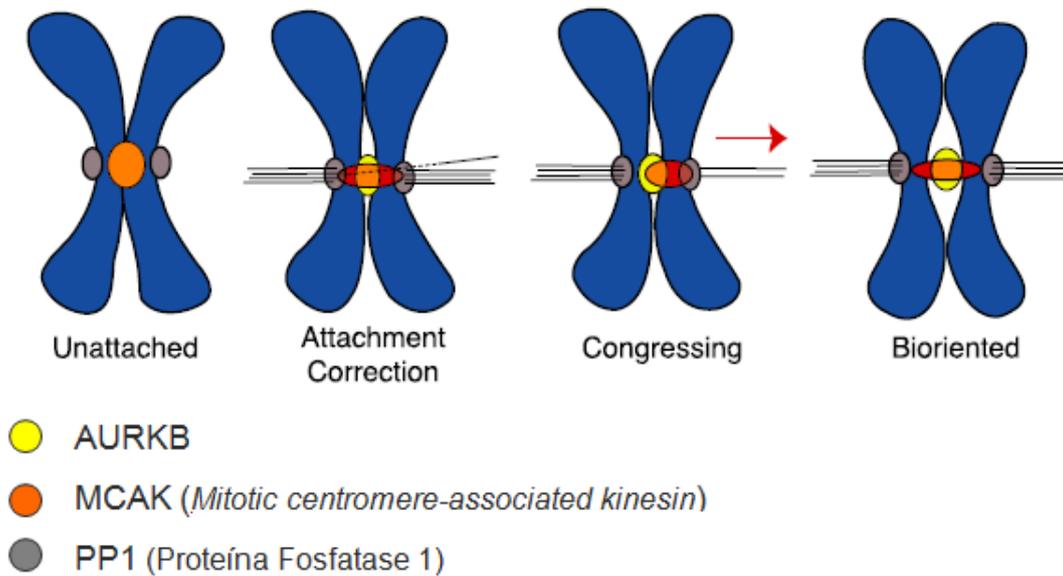
Legenda: Sob condições biológicas normais, os centrossomos migram para as extremidades opostas da célula, formando os pólos do fuso mitótico, que permitem a correta segregação dos cromossomos. Superexpressão de AURKA causa amplificação dos centrossomos e a formação de fuso multipolar, que juntamente com a capacidade de sobreposição ao CCM, também proporcionada pela superexpressão de AURKA, resulta em instabilidade genética e tumorigênese.

Fonte: Adaptado de WARNER et al. (2003).

Figura 6 - Amplificação dos centrossomos decorrente de superexpressão de AURKA.

AURKB é requisitada na liberação de cinetócoros inapropriadamente conectados à microtúbulos até que uma orientação bipolar seja alcançada. Nesse modelo físico, AURKB promove o rompimento contínuo dos microtúbulos ligados ao cinetócoro até que a tensão exercida pela orientação bipolar afaste os cinetócoros da camada interna do centrômero e da zona de influência de AURKB (VAGNARELLI e EARNSHAW 2004; CARMENA et al. 2009) (Figura 7).

A ligação incorreta de microtúbulos do fuso aos cromossomos é um evento relativamente comum no início da mitose, e as células dispõem de mecanismos redundantes para corrigir esses erros. O ponto de checagem mitótico (CCM), por exemplo, é um mecanismo de fiscalização que atrasa o início da anáfase até que todos os cromossomos estejam bi-orientados e sob tensão. CCM “percebe” tanto se os cinetócoros estão ocupados por microtúbulos, quanto se houve alterações na tensão gerada pelos microtúbulos. A tensão regula a estabilidade da ligação dos microtúbulos, e AURKB é requisitada pelo CCM em resposta a ausência de tensão. Uma vez que todos os cromossomos alcançaram o estado de bi-orientação, CCM é “desligado” e dar-se o início da degradação de ciclinas e outros substratos alvo de CPA, culminando no início da anáfase com a separação das cromátides-irmãs (CARMENA et al. 2009). Desta forma, a inibição da atividade de AURKB nos cinetócoros contribui para a estabilidade da ligação entre cinetócoros e microtúbulos.



Legenda: AURKB e MCAK co-localizam-se na camada interna dos centrômeros nos cromossomos não conectados aos microtúbulos, permitindo que AURKB mantenha fosforilação inibitória sobre MCAK. Após ligação dos microtúbulos e sob diferentes tensões, a posição de MCAK é modificada, aproximando-se da camada externa, que contém PP1. PP1 desfosforila e ativa MCAK, que promove a despolimerização local dos microtúbulos. A tensão exercida pela orientação bipolar afasta os cinetócoros da camada interna do centrômero e da zona de influência de AURKB.

Fonte: Adaptado de DUCAT e ZHENG (2004).

Figura 7 - Dinâmica das proteínas envolvidas na biorientação dos cromossomos.

Além de participar da dinâmica de ligação entre cinetócoros e microtúbulos, AURKB também induz modificações na cromatina (fosforilação das histonas H3 em Ser10) necessárias para adequada condensação e segregação cromossômica (OTA et al. 2002). Fosforilação de H3 promove uma descondensação local da cromatina, que por sua vez facilita a ligação de fatores que irão promover a condensação dos cromossomos no final da fase G2, início da mitose. Falhas na segregação cromossômica podem ser

um efeito secundário às alterações sutis na condensação cromossômica (WEI et al. 1999).

No entanto, a fosforilação H3Ser10 interfere na metilação de resíduos de lisina 9 em H3 (H3K9). A metilação de K9 é encontrada nas regiões de heterocromatina constitutiva, próxima aos centrômeros, e também está envolvida no silenciamento epigenético de genes localizados na eucromatina. Uma vez metilados, os grupos H3K9 atuam como sítio de reconhecimento da proteína heterocromatina 1 (HP1). Por sua vez HP1 recruta histonas metiltransferase, promovendo mais metilação de H3K9, e histonas deacetilase, que juntas reforçam o processo de heterocromatização e silenciamento gênico (SABBATTINI et al. 2007; VERDAASDONK e BLOOM 2011).

Nesse sentido, a superexpressão de AURKB poderia interferir nos mecanismos regulatórios da cromatina, resultando em alterações epigenéticas (ativação/ silenciamento de genes) que proporcionariam o desenvolvimento do câncer.

Essa alteração no padrão de fosforilação proporcionada pela superexpressão de AURKB também tem sido relacionada à indução de erros na segregação cromossômica. OTA et al. (2002) observaram a presença de pontes cromossômicas e cromossomos “em atraso” durante anáfase em células com superexpressão de AURKB. Ademais, células multinucleares também foram observadas, provavelmente devido à alterações na fosforilação de outras proteínas envolvidas no processo de formação e ativação do anel contrátil durante citocinese.

Superexpressão de *AURKB* tem sido observada em diferentes tipos de câncer, incluindo carcinoma hepatocelular e cervical, câncer gástrico, doenças linfoproliferativas e leucemias agudas (HUANG et al. 2008; ENJOJI et al. 2009; IKEZOE et al. 2009; TWU et al. 2009; LIN et al. 2010; LUCENA-ARAÚJO et al. 2011, CARETA et al. 2011) (Quadro 6).

IKEZOE et al. (2007) estudaram a expressão de *AURKA* e *AURKB* em linhagens celulares de leucemia e células mononucleares de leucemia isoladas de pacientes e encontraram expressão aberrante em várias doenças hematológicas, incluindo LMA, LLA e LMC.

O mesmo grupo encontrou superexpressão de *AURKB* em linfomas difuso de grandes células (48% dos casos) e linfoma de Burkitt (86% dos casos) após análise por imuno-histoquímica de diferentes tipos de linfomas não-Hodgkin de células B. Nenhum caso de linfoma de baixo grau expressou altos níveis de *AURKB*, sugerindo que superexpressão de *AURKB* está correlacionado com o grau histológico dos LNH. Ademais, os níveis de *AURKB* foram correlacionados com estágio clínico avançado, assim como com altos escores IPI (IKEZOE et al. 2009).

YE et al. (2009) avaliaram a expressão de *AURKA* em 20 pacientes portadores de SMD e nove pacientes com LMA. Ambos os grupos apresentaram níveis significativamente maiores de *AURKA* quando comparados ao controle; porém não mostraram correlação entre porcentagem de blastos na medula, alterações citogenéticas e escore IPSS.

HUANG et al. (2008) também demonstraram elevada expressão de *AURKA* (66,3% dos casos) e *AURKB* (40,8% dos casos) em células CD34+

de pacientes portadores de LMA *de novo* quando comparadas à doadores sadios.

Da mesma forma, LUCENA-ARAUJO et al. (2011) demonstraram superexpressão de *AURKA* e *AURKB* em aproximadamente 10% dos pacientes portadores de LMA *de novo* e associação significativa com resultados de citogenética desfavorável.

Recentemente, CARETA et al. (2011) avaliaram medula óssea e sangue periférico de seis pacientes portadores de LLC, e encontraram superexpressão de *AURKA* e *AURKB* nas amostras de medula dos pacientes quando comparados com a amostras controles.

As alterações de expressão destas proteínas estão fortemente relacionadas à instabilidade cromossômica, aneuploidia e progressão tumoral em diferentes tumores sólidos e neoplasias hematológicas.

Tendo em vista que pesquisas que investiguem o perfil de expressão destes genes em pacientes com SMD são escassas, estudos que avaliem essas proteínas podem contribuir para o entendimento da fisiopatologia da SMD, a doença clonal primária da medula óssea mais comum do mundo ocidental em indivíduos com idade superior a 60 anos.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o perfil de expressão gênica das proteínas envolvidas no mecanismo de ação do fuso mitótico (*AURKA* e *AURKB*) e ponto de checagem mitótico (*MAD2L1* e *CDC20*), e investigar sua possível relação com as variáveis clínicas e laboratoriais de pacientes portadores de SMD.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1) Detectar as alterações cromossômicas pelo estudo do cariótipo por banda G, em pacientes com SMD;
- 2) Detectar a amplificação de *AURKA* e *AURKB* por FISH em pacientes com SMD;
- 3) Detectar a expressão de *AURKA A*, *AURKB*, *CDC20* e *MAD2L1* por PCR (Reação em Cadeia da Polimerase) em Tempo Real;
- 4) Correlacionar a frequência e tipos de alterações citogenéticas encontradas com os níveis de expressão gênica;
- 5) Correlacionar os níveis de expressão gênica com as características clínicas/laboratoriais (celularidade, número de citopenias, dependência transfusional) da doença;

- 6) Correlacionar os níveis de expressão gênica com os subgrupos segundo sistema de classificação OMS (2008) e o sistema prognóstico IPSS (1997) (GREENBERG et al. 1997; SWERDLOW et al. 2008).

3 PACIENTES, MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 PACIENTES

Foram incluídos no estudo 61 pacientes, de ambos os sexos, com diagnóstico de Síndrome Mielodisplásica (SMD), segundo os critérios da OMS (SWERDLOW et al. 2008), recentemente diagnosticados e regularmente inscritos no ambulatório de Hematologia do Hospital Universitário Walter Candólio/Universidade Federal do Ceará e do Hospital Haroldo Juaçaba/Hospital do Câncer, no período de março de 2008 a julho de 2011. Todos os pacientes foram previamente submetidos ao protocolo de exclusão durante investigação da doença (Quadro 7).

Quadro 7 - Protocolo de exclusão de causas não clonais que, com frequência, cursam com citopenias e/ou dispoeses na medula. Protocolo aplicado à pacientes que encontram-se sob investigação de SMD.

Deficiências nutricionais: vitamina B12 e ácido fólico
Exposição recente a agentes tóxicos: metais pesados, benzeno e derivados do petróleo.
Exposição recente a drogas citotóxicas e fatores de crescimento.
Disfunções endócrinas
Etilismo
Disfunções metabólicas: doença hepática crônica e insuficiência renal
Doenças inflamatórias crônicas
Infecções virais: SIDA, hepatites, CMV, toxoplasmose, parvovirus B19
Doenças auto-imunes

Fonte: MAGALHÃES e LORAND-METZE (2004).

Como grupo controle, foram incluídos 10 indivíduos saudáveis, dos quais amostra de medula óssea foi coletada para a realização dos estudos citogenéticos, por banda G e FISH, e para a avaliação da expressão gênica.

Todos os indivíduos incluídos neste estudo foram informados sobre os objetivos e metodologia da pesquisa, e aqueles que concordaram em participar assinaram termo de consentimento livre-esclarecido (Anexo 1).

3.2 COLETA DAS AMOSTRAS

As amostras de medula óssea para avaliação do cariótipo por banda G e FISH, e para análise de expressão gênica foram coletadas em tubos 15x75 mm, após consentimento informado. O estudo do cariótipo por banda - G foi realizado à época das coletas. As amostras para realização da FISH e análise de expressão gênica foram estocadas em solução de Carnoy, a -20°C e em TRIzol LS, a -80°C, respectivamente.

3.3 CITOGENÉTICA CLÁSSICA

A citogenética clássica por banda G foi realizada no Laboratório de Citogenômica do Câncer (Universidade Federal do Ceará-UFC), segundo CHAUFFAILLE et al. (1996). A medula óssea colhida em heparina de forma estéril foi dividida em dois frascos contendo 7 mL de meio RPMI (pH 7,0) e 3 mL de soro fetal bovino. Este material foi cultivado por 24 horas em estufa a 37 °C. Uma hora antes do término da cultura foram adicionados 50 uL de

colchicina (Colcemid®), por 30 minutos. Em seguida, o material foi centrifugado e ressuspensão em solução hipotônica de KCl 0,075 M e lavado com solução fixadora (solução de ácido acético e metanol, proporção 3:1), por 4 vezes. Para confecção das lâminas para análise, o material foi gotejado em lâminas de microscopia e em seguida aquecido por 3 minutos em microondas, na potência alta. O bandamento foi realizado pela técnica de tripsina-Giemsa (GTG) com kit Panótico. O procedimento encontra-se descrito de forma esquemática em PROTOCOLO I (Anexo 2). Foram analisadas pelo menos 20 mitoses e os cromossomos classificados de acordo com o Sistema Internacional de Nomenclatura Citogenética Humana (ISCN) (SHAFFER e TOMMERUP 2005). As metáfases foram capturadas e analisadas em sistema computadorizado (CHROMU) com software para cariotipagem.

3.4 HIBRIDIZAÇÃO *IN SITU* POR FLUORESCÊNCIA (FISH)

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

Para a FISH foram utilizadas sondas para a região 20q13 (AURKA (20q13)/20q11, Cat#KBI-10721, Kreatech Dianostics, Amsterdam, NL) e região 17p13 (AURKB (17p13)/SE17, Cat#KBI-10722, Kreatech Dianostics, Amsterdam, NL) seguindo-se as instruções do fabricante, com algumas modificações, descritas no PROTOCOLO II (Anexo 2).

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

Inicialmente as lâminas foram submersas em solução SSC 2X por 2 minutos. Em seguida, foram desidratadas em etanol a 70%, 80% e 100% e então secadas à temperatura ambiente. Para a desnaturação do DNA tumoral, as lâminas foram incubadas em solução de formamida 70%/SSC 2X, a 73°C , por dois minutos. A sonda a ser utilizada também passou por processo de desnaturação, sendo aquecida em banho-maria a 90°C , por dez minutos. Após desnaturação, adicionou-se 5 μL da sonda sobre a lâmina com DNA tumoral, cobrindo-o com lamínula. A lâmina foi então aquecida em uma placa aquecedora por 2 minutos à 75°C , e em seguida transferidas para câmara úmida e incubadas a 37°C , por 12 horas.

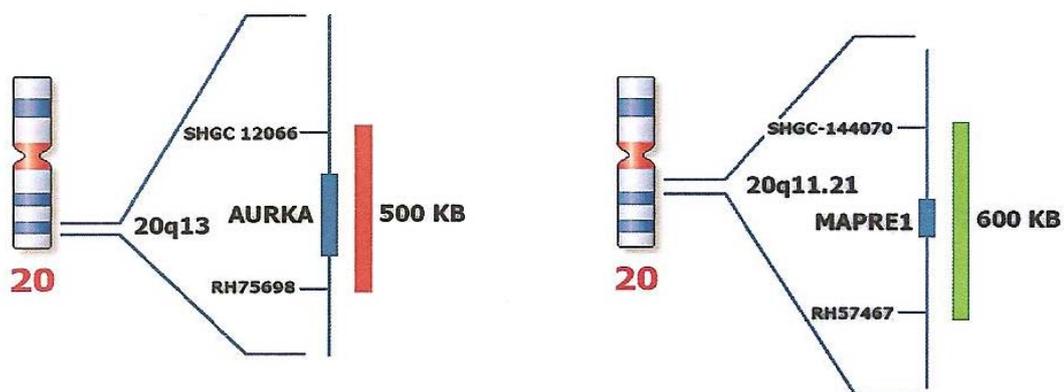


Figura 8 - Sonda AURKA (20q13)/20q11, Cat#KBI-10721, Kreatech Dianostics, Amsterdam, NL. Região alvo 20q13 (sinal vermelho) e região controle 20q11 (sinal verde).



Figura 9 - Sonda AURKB (17p13)/SE17, Cat#KBI-10722, Kreatech Dianostics, Amsterdam, NL. Região alvo p13 (sinal vermelho) e região controle: centrômero do 17 (sinal verde).

Após a hibridação da sonda com o DNA tumoral, as lamínulas foram removidas e as lâminas lavadas em solução de NP40 0,3%/SSC 0,4X a 73°C, por dois minutos e NP40 0,1%/SSC 2X, por um minuto. Depois de secadas à temperatura ambiente, adicionou-se 15 uL de contra-corante DAPI (4,6 diamidino-2-phenylindone-dihydrochloride).

A sonda para AURKA liga-se a duas regiões do cromossomo 20: região 20q11 (sinal verde) e a região 20q13 (sinal vermelho) (Figura 8). Utilizou-se os filtros verde (FITC), vermelho (Texas Red), azul (DAPI) e triplo para visualização dos sinais e da célula.

A sonda para AURKB liga-se a duas regiões do cromossomo 17: centrômero do cromossomo 17 (sinal verde) e a região 17p13 (sinal vermelho) (Figura 9). Utilizou-se os filtros verde (FITC), vermelho (Texas Red), azul (DAPI) e triplo para visualização dos sinais e da célula.

As células avaliadas foram divididas em:

- 2 sinais vermelhos e 2 sinais verdes = normal
- ≥ 3 sinais vermelhos e o mesmo número de sinais verdes = polissomia do cromossomo 20
- ≥ 3 sinais vermelhos e 2 sinais verdes = amplificação
- 1 verde e/ou 1 vermelho = pode ocorrer devido à sobreposição de células ou devido à falha de hibridação. Se mais do que 10% das células apresentassem este padrão, o exame era repetido.
- ausência de sinal = falha de hibridação

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

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

3.5 EXTRAÇÃO E PURIFICAÇÃO DO RNA TOTAL

Os procedimentos referentes às análises moleculares foram realizados no Laboratório de Genômica e Biologia Molecular do Hospital A.C. Camargo da Fundação Antônio Prudente.

Após coleta, as amostras foram centrifugadas (1811 x g por 15 minutos a 4 °C) e a camada leucocitária transferida para tubos RNA-free contendo 3 mL de TRIzol LS (Invitrogen). Em seguida, as amostras foram homogeneizadas em vortex por 15 segundos e armazenadas a -80 °C até o momento da extração.

A extração de RNA total baseou-se nas instruções do fabricante, com algumas modificações, descritas no PROTOCOLO III (Anexo 2). A dosagem das amostras foi realizada através de leitura em espectrofotômetro

(NanoDrop ND 1000 Specterphotometer). A qualidade do RNA total extraído foi verificada em gel de agarose 1%.

Todas as amostras de RNA total foram tratadas com o reagente Turbo DNA-free™ (Ambion) segundo instruções do fabricante. A presença ou não de contaminação por DNA genômico após tratamento, foi determinada através da análise em gel de agarose 1% da presença da banda correspondente ao amplicon resultante da reação de PCR feita com *primers* para o gene *MLH1*. Como controle positivo foi utilizada amostra de DNA genômico da linhagem de mama C5.2. Os controles negativos foram feitos sem amostra de RNA. As reações de PCR foram feitas em um volume final de 25 µl, com 2,5 µl Buffer 10X (Easy Taq), 0,8 µl MgCl₂ 50 nM, 0,5 µl dNTP Mix 10 mM, 1,25 µl Primer *MLH1* Fw 10 µM, 1,25 µl Primer *MLH1* Rev 10 µM, 0,2 µl Easy Taq Polimerase (5U/1 µl), 0,5 µl RNA (25 ng) e 18 µl água milli-Q. A ciclagem utilizada foi de 94°C por 4 minutos, seguidos de 35 ciclos de 94°C por 45 segundos, 55°C por 45 segundos e 72°C por 1 minuto, e uma extensão final de 72°C por 6 minutos.

3.6 REAÇÃO DA POLIMERASE EM CADEIA POR TRANSCRIPTASE REVERSA (RT-PCR)

Após extração e purificação, a síntese do cDNA a partir do RNA total foi realizada de acordo com o protocolo do Kit *High Capacity RNA-to-cDNA* (Cat#4387406, Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA). A síntese de cDNA foi realizada para todas as amostras na mesma reação. Os controles

negativos da RT foram feitos sem enzima. Os cDNAs foram armazenados a -20°C .

3.7 REAÇÃO DA POLIMERASE EM CADEIA (PCR) EM TEMPO REAL

As reações foram realizadas no aparelho 7500 Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems), em placas transparentes de 96 wells (Applied Biosystems). O volume final de cada reação foi de $20\mu\text{l}$, sendo $10\mu\text{l}$ de TaqMan Universal Master Mix II, com UNG (2x), $1\mu\text{l}$ de primer (TaqMan Assay) e $9\mu\text{l}$ de cDNA; as reações foram feitas em duplicatas. A ciclagem utilizada foi a indicada pelo Kit TaqMan® Universal Master Mix II, com UNG (Cat#4440038, Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA): 2 minutos a 50°C , 10 minutos a 95°C , seguidos de 40 ciclos de desnaturação a 95°C por 15 segundos e extensão de 1 minuto a 60°C .

Para análise da expressão gênica foram utilizados ensaios adquiridos (TaqMan® *Gene Expression Assay*) com marcação FAM-MGB pela Applied Biosystems (Quadro 8).

Foram utilizados quatro pares de genes normalizadores: *β -actina*, *β 2-microglobulina*, *GAPDH* e *ubiquitina C*. Os resultados da expressão desses genes foram aplicados no programa GeNorm (VANDESOMPELE et al. 2002) para seleção do par de gene mais estável. Além disso, a amostra referência (*pool* de diversas linhagens de tumores humanos) foi incluída em

todas as placas, para minimizar as diferenças de amplificação entre as reações (Quadro 9).

Quadro 8 - Lista dos genes utilizados na avaliação da expressão gênica por PCR em Tempo Real.

GENES	CÓDIGO DE REFERÊNCIA (Applied Biosystems)
Genes normalizadores	TaqMan® <i>Gene Expression Assay</i>
ACTB (β -actina)	Hs99999903_m1
B2M (β 2-microglobulina)	Hs99999907_m1
GAPDH (gliceraldeído fosfato desidrogenase)	Hs99999905_m1
UBC (ubiquitina C)	Hs00824723_m1
Genes de interesse	TaqMan® <i>Gene Expression Assay</i>
AURKA (aurora quinase A)	Hs00269212_m1
AURKB (aurora quinase B)	Hs00177782_m1
CDC20 (<i>cell division cycle 20</i>)	Hs00426680_mH
MAD2L1 (<i>mitotic arrest defective</i>)	Hs01554513-g1

Quadro 9 - Linhagens celulares que compõem o RNA referência.

<i>Linhagem em</i>	<i>Número ATCC ou outra referência</i>	<i>Descrição</i>	<i>Método de extração de RNA</i>
Daudi	CCL-213	Linfoma de Burkitt	TRizol
DLD-1	CCL-221	Adenocarcinoma de Cólon	TRizol
DU 145	HTB-81	Carcinoma de Próstata	TRizol
FaDU	HTB-43	Carcinoma Epidermóide de Faringe	TRizol
GM 637	Kucherlapati et al. 1978	Fibroblasto	RNeasy Midi
H 1080	CCL-121	Fibrossarcoma	TRizol
H 146	HTB-173	Carcinoma de Pulmão	RNeasy Midi
HB4 α		Célula Luminal de Mama	Cloreto de Césio
HEK 293	CRL-1573	Human Embriónary Kidney	RNeasy Midi
Jurkat	TIB-152	Leucemia Aguda de Células T	TRizol
Saos-2	HTB-85	Osteossarcoma	TRizol
SK-BR-3	HTB-30	Adenocarcinoma de Mama	TRizol
SK-MEL-28	HTB-72	Melanoma	TRizol
T24	HTB-4	Carcinoma de Bexiga	TRizol
T98G	CRL-1690	Glioblastoma	TRizol

Para a avaliação da expressão utilizou-se a fórmula:

$$\text{Expressão relativa} = \frac{\Delta\text{Ct gene alvo}}{\Delta\text{Ct gene normalizador}}$$

$$\Delta\text{Ct} = 2^{(\text{Ct Ref} - \text{Ct amostra alvo})}$$

Gene alvo = cada um dos genes de interesse

Gene normalizador = média dos ΔCt s dos 2 genes endógenos mais estáveis (GeNorm)

Ref = amostra referência (amostra calibradora) (*pool* de linhagens de tumores humanos)

Ct = valor do ciclo que cruza a linha limiar (*threshold*) na curva de amplificação

Os resultados de expressão gênica foram agrupados e analisados segundo as seguintes variáveis: celularidade, número de citopenias, dependência transfusional, características citogenéticas, subgrupos da classificação OMS (2008) e grupos de risco IPSS (1997).

3.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para análise de expressão gênica, foi analisado o valor logado da expressão de *AURKA*, *AURKB*, *CDC20* e *MAD2L1* ($\log_2(\text{expressão})$). A associação entre as expressões dos genes e as variáveis de interesse foi avaliada por meio dos testes não-paramétricos de Wilcoxon (comparação de dois grupos) e de Kruskal-Wallis (comparação de 3 grupos ou mais). O nível de significância adotado foi o de 5%. Na comparação de três grupos ou mais, no caso de significância estatística, comparações múltiplas foram realizadas adotando a metodologia descrita em SIEGEL e CASTELLAN (1988). Não foram incluídos nas comparações para os genes *AURKA* e *AURKB* os dados dos controles, pois o número de observações por grupo/categoria foi inferior a cinco.

3.9 ASPECTOS ÉTICOS

O presente estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Ceará/Hospital Universitário Walter Cantídio. CEP N° 075.11.08.

4 RESULTADOS

4.1 CARACTERÍSTICAS EPIDEMIOLÓGICAS DOS PACIENTES

Dos 61 pacientes incluídos neste estudo, seis (9,8%) foram classificados como SMD secundária ao tratamento e 55 (90,2%) pacientes foram classificadas como SMD primária. A idade mediana foi de 66 anos (mínima: 15 anos, máxima: 91 anos) e a razão entre o sexo masculino e feminino foi 1,3:1 (Tabela 4).

Entre os pacientes com SMD primária, a maioria (56,8%) apresentou medula hiperclular e 2 ou 3 citopenias no sangue periférico (60,4%) (Tabela 4).

Em relação à dependência transfusional, quando utilizado o critério de 1 transfusão a cada 8 semanas durante período de 4 meses (MALCOVATI et al. 2005), 49% dos pacientes mostraram-se dependentes transfusionais. Quando utilizado o critério de valores de hemoglobina menor que 8g/dL para mulheres e 9g/dL para homens (MALCOVATI et al. 2011), a maioria dos pacientes (62,3%) mostrou-se dependentes transfusionais (Tabela 4).

O subtipo predominante foi CRDM (51%), seguido pelo subtipo ARSA (16,4%) (Figura 10). A maioria dos pacientes pertence aos grupos de menor risco, sendo 27,5% (11/40) de baixo risco e 57,5% (23/40) de risco intermediário I, segundo estratificação IPSS (1997) (Figura 11).

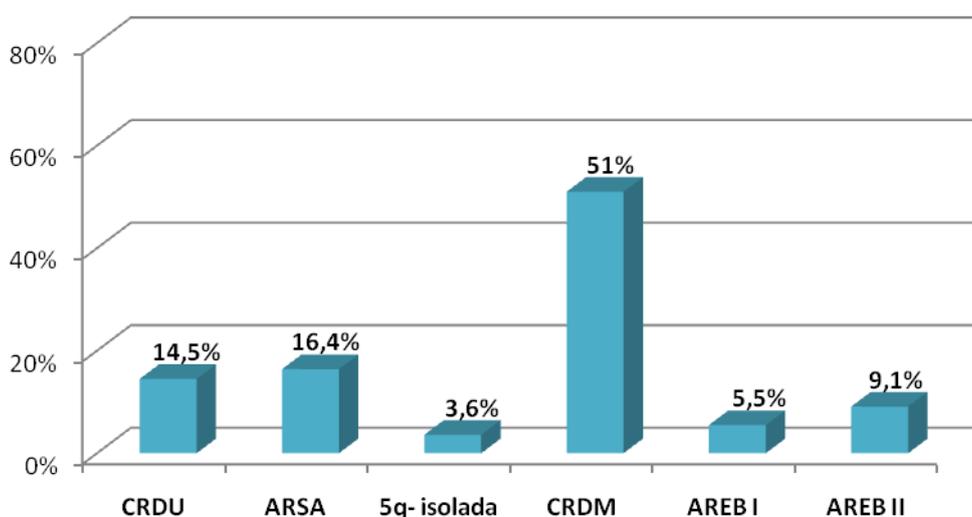
Tabela 4 - Características dos pacientes portadores de SMD.

	GERAL	SMD1^a	SMD2^a
Idade/Sexo			
Mediana (anos)	66		
Média (anos)	60,1 (15-91)	60,4 (15-91)	56,2 (18-82)
≤60 anos	26/61 (42,6%)	24/55 (43,6%)	02/06 (33,3%)
>60 anos	35/61 (57,4%)	31/55 (56,4%)	04/06 (66,7%)
M/F	1,3:1		
Celularidade			
Hipocelular	14/50 (28%)	10/44 (22,7%)	04/06 (66,7%)
Normocelular	10/50 (20%)	09/44 (20,5%)	01/06 (16,7%)
Hiper celular	26/50 (52%)	25/44 (56,8%)	01/06 (16,7%)
No citopenias			
0/1	25/61 (41%)	21/55 (38,2%)	04/06 (66,7%)
2/3	36/61 (59%)	34/55 (61,8%)	02/06 (33,3%)
Distribuição OMS (2008)			
CRDU	08/61 (13,1%)		
ARSA	09/61 (14,8%)		
CRDM	28/61 (46%)		
5q isolada	02/61 (3,3%)		
AREB I	03/61 (5%)		
AREB II	05/61 (8,2%)		
SMD 2 ^a	06/61 (9,8%)		
Dependência transfusional (%)*			
SIM		25/51 (49%)	
NÃO		26/51 (51%)	
Dependência transfusional (%)**			
SIM		33/53 (62,3%)	
NÃO		20/53 (37,7%)	

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

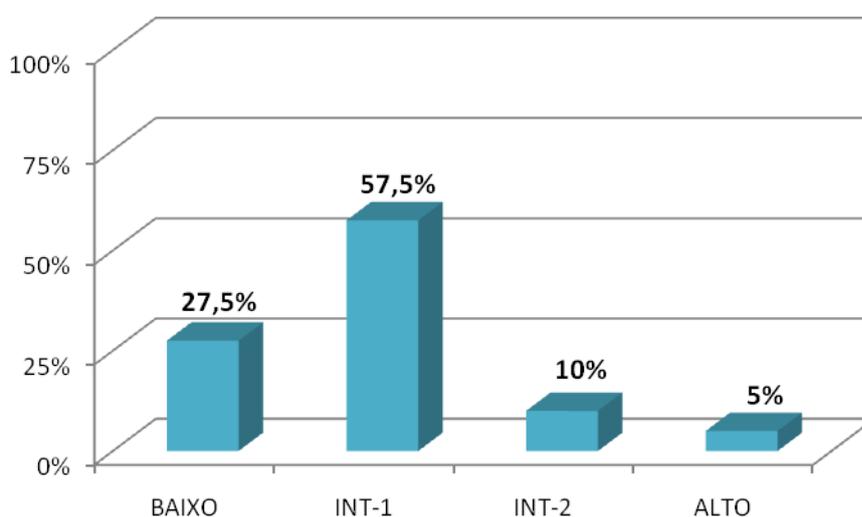
** SIM = Hb < 8g/dL mulheres; Hb < 9g/dL homens.

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



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

Figura 10 - Distribuição dos pacientes portadores de SMD primária, segundo classificação OMS (2008).



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

Figura 11 - Distribuição dos pacientes portadores de SMD primária, segundo Sistema Internacional de Escore Prognóstico (IPSS 1997).

Dos seis pacientes com SMD secundária, um paciente havia se submetido à radioterapia, dois à quimioterapia e três fizeram uso do imunossupressor azatioprina.

4.2 RESULTADOS CITOGENÉTICOS

4.2.1 Citogenética clássica (banda G)

Quarenta e cinco pacientes (73,8%) apresentaram resultados, sendo 40 pacientes de SMD primária e cinco pacientes de SMD secundária (Tabela 5 e Anexo 3). Dos pacientes com resultado, 27 pacientes (60%) foram classificados como de prognóstico favorável, dez pacientes (22%) como prognóstico intermediário e oito pacientes (18,6%) como prognóstico desfavorável, segundo critérios utilizados pelo IPSS (1997) (Figura 12).

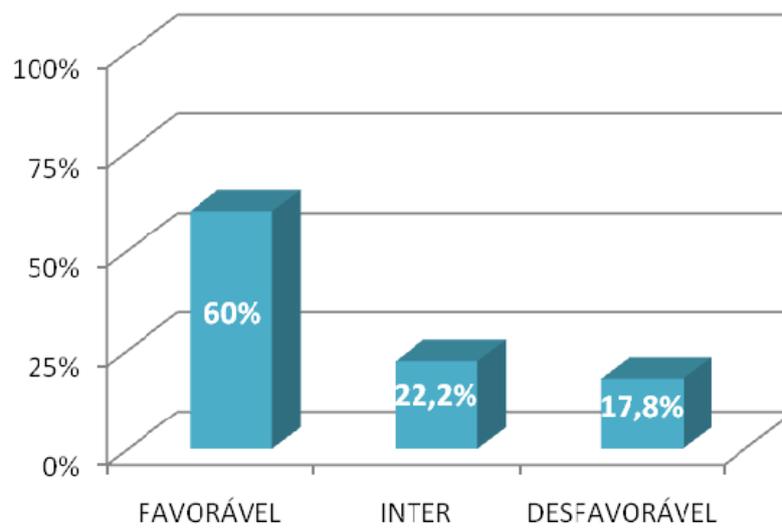
Dos 45 pacientes com resultado de banda-G, vinte pacientes (44,4%) possuíam cariótipo normal e 25 pacientes (55,6%) apresentaram cariótipo alterado (Figura 13), dos quais 48% (12/25) apresentaram uma única alteração, 28% (7/25) apresentaram clones com duas alterações e 24% (6/25) apresentavam cariótipo complexo (3 ou mais alterações citogenéticas na mesma célula) (Figuras 14, 15 e 16). Ganho ou perda de cromossomo (aneuploidia) foi observado em 60% (15/25) dos casos com cariótipo alterado (Figura 17).

As alterações mais comuns envolveram o cromossomos 5 (-5/5q-), ocorrendo em 44% dos 25 pacientes com cariótipo alterado. Foram observadas outras alterações freqüentes envolvendo o cromossomo 7 (-

7/7q-) em 20% dos casos, cromossomo 17 (-17/17p-) em 16%, cromossomo 8 (+8) em 12% e cromossomo 20 (-20/20q-) em 8% dos pacientes. Deleções isoladas do braço longo do cromossomo 5 (5q-) foram encontradas em 24% (6/25) dos casos com cariótipo alterado (Tabela 5 e Figura 18).

Tabela 5 - Dados citogenéticos dos pacientes portadores de SMD.

	GERAL
Citogenética	
Com resultado	45/61 (73,8%)
Sem metáfase	16/61 (26,2%)
Cariótipo	
Normal	20/45 (44,4%)
Alterado	25/45 (55,6%)
Aneuploidia	
Cariótipo alterado com aneuploidia	15/25 (60%)
Cariótipo alterado sem aneuploidia	10/25 (40%)
Nº alterações citogenéticas	
Uma alteração	12/25 (48%)
Duas alterações	07/25 (28%)
≥ 3 alterações	06/25 (24%)
Cromossomos envolvidos	
Cromossomo 5 (-5/5q-)	11/25 (44%)
5q- isolada	06/25 (24%)
Cromossomo 7 (-7/7q-)	05/25 (20%)
Cromossomo 8 (+8)	03/25 (12%)
Cromossomo 17 (-17/17p-)	04/25 (16%)
Cromossomo 20 (-20/20q-)	02/25 (8%)
Grupo citogenético (IPSS)	
Favorável	27/45 (60%)
Intermediário	10/45 (22,2%)
Desfavorável	08/45 (17,8%)



Legenda: INTER=Intermediário.

Figura 12 - Distribuição dos pacientes portadores de SMD, segundo grupos citogenéticos utilizados pelo Sistema Internacional de Escore Prognóstico (IPSS-1997).

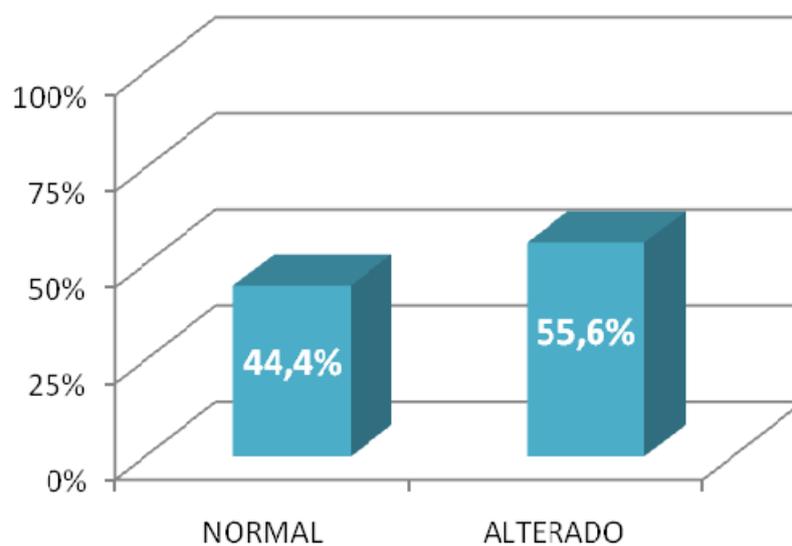


Figura 13 - Distribuição dos pacientes portadores de SMD, de acordo com o resultado do cariótipo (banda G).

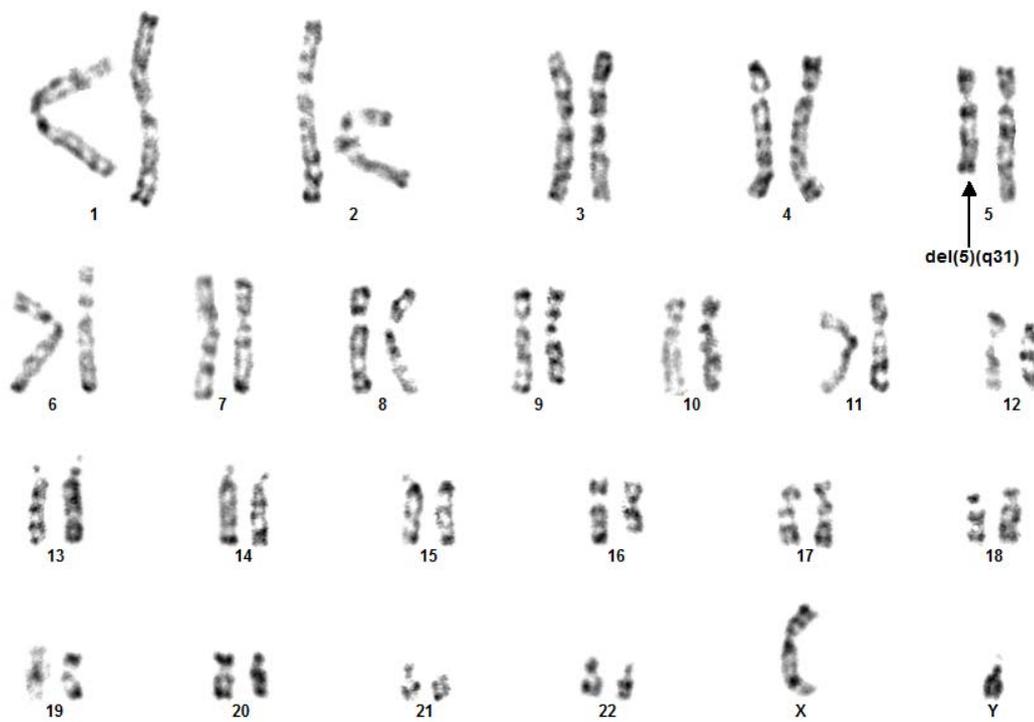


Figura 14 - Caso 8. Citogenética Clássica (bandamento G). Cariótipo com apenas uma alteração cromossômica: 46, XY,del(5).

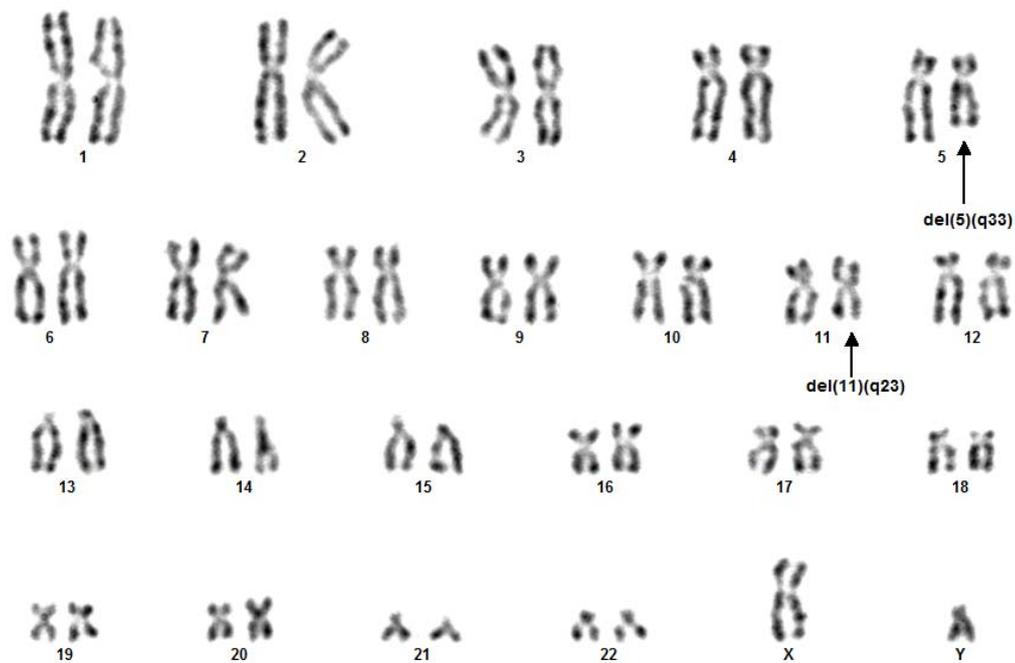


Figura 15 - Caso 42. Citogenética Clássica (bandamento G). Cariótipo com duas alterações cromossômicas: 46,XY,del(5)(q15q33),del(11)(q23).

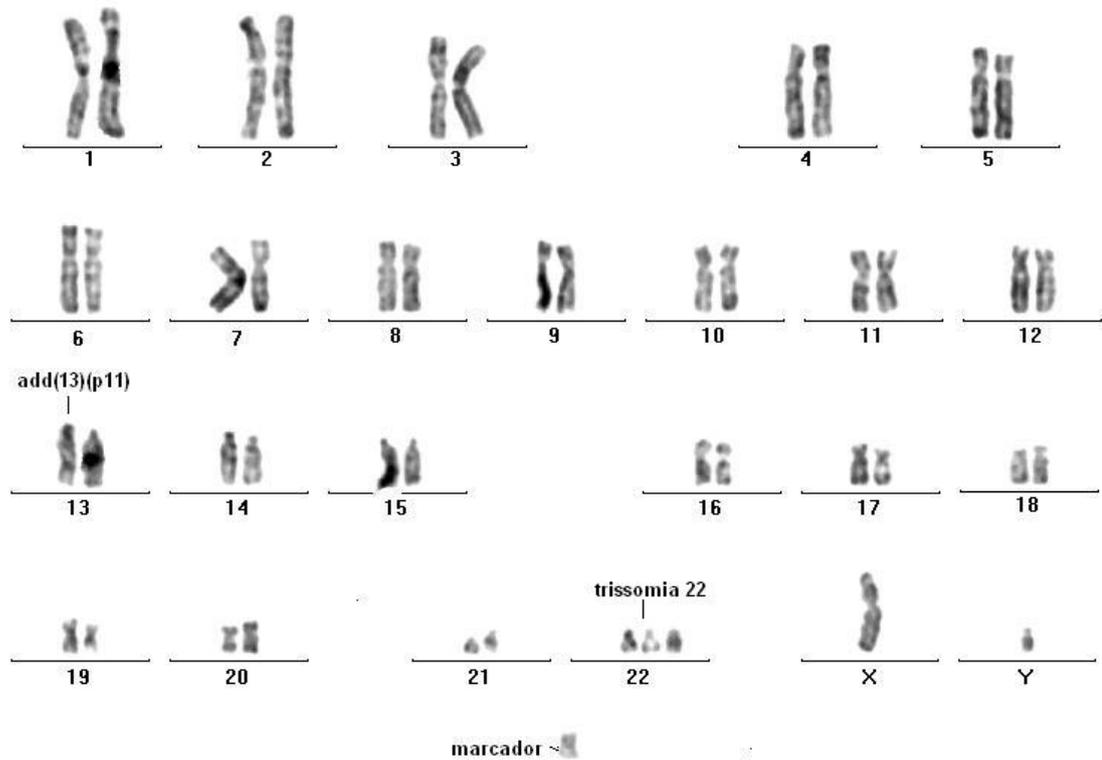


Figura 16 - Caso 28. Citogenética Clássica (bandamento G). Cariótipo complexo: 48,XY,add(13)(p11),+22,+mar.

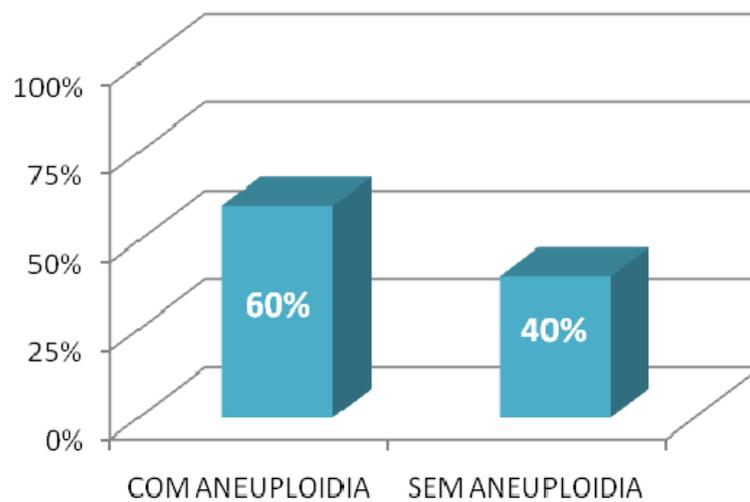


Figura 17 - Distribuição dos pacientes portadores de SMD segundo a presença ou não de aneuploidia.

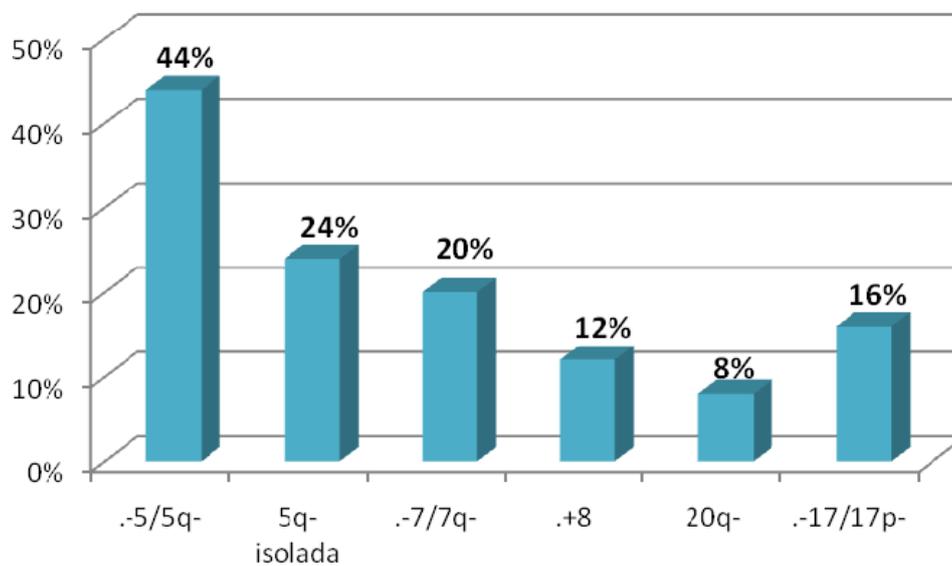


Figura 18 - Distribuição dos pacientes portadores de SMD segundo o cromossomo envolvido nas alterações citogenéticas apresentadas.

4.2.2 Citogenética molecular (FISH)

Os valores normais encontrados para cada alteração foram: amplificação *AURKA* = 0,5%, polissomia do cromossomo 20 = 3,4%, amplificação *AURKB* = 1,6% e polissomia do cromossomo 17 = 0,5%. No entanto, como o número de controles avaliados foi pequeno (seis controles para *AURKA* e quatro controles para *AURKB*), os valores considerados para confirmação das alterações citogenéticas pesquisadas foram: amplificação de *AURKA* e *AURKB* ($\geq 4\%$ das interfases positivas), e polissomia do cromossomo 20 e 17 ($\geq 5\%$ das interfases positivas).

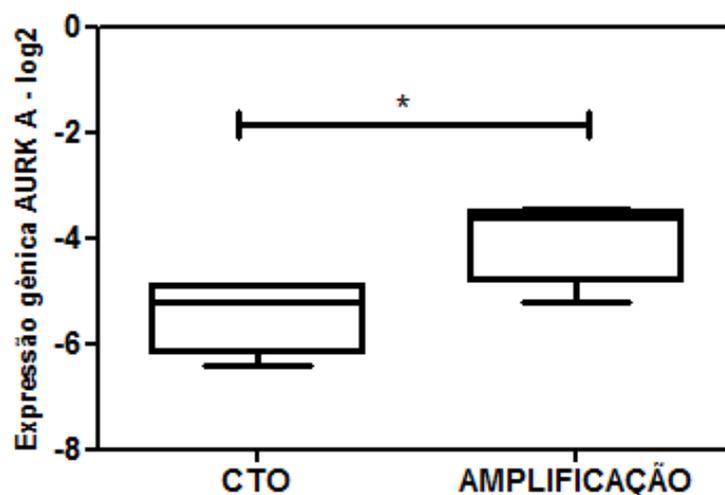
Dos 61 pacientes incluídos, não foi possível realizar a FISH em 20 casos por problemas técnicos (pouco material ou material de baixa qualidade) (Anexo 4).

Em 4/41 (9,8%) casos (casos 6, 32, 35 e 37) houve amplificação do gene *AURKA* (Figura 13). Os casos 6 e 37 apresentaram amplificação em 4% das interfases, e os casos 32 e 35, em 4,5% das interfases. Apenas o caso 37 apresentou cariótipo alterado, sendo o mesmo aneuplóide. Polissomia do cromossomo 20 foi observado em apenas 2/41 casos (casos 30 e 44). Ambos os pacientes apresentavam cariótipo alterado com aneuploidia, sendo o caso 30 com monossomia do cromossomo 20.

Quando comparados o grupo com amplificação de *AURKA* (pela FISH) e o grupo controle, a expressão gênica foi significativamente diferente ($p=0,038$) (Figura 19). A comparação entre as médias de expressão dos dois grupos mostrou uma expressão 2,8 vezes maior no grupo com amplificação.

Se analisado separadamente, o caso 37 (com aneuploidia) apresentou-se 3,3 vezes mais expresso em relação ao grupo controle.

Em 2/40 (5%) casos (casos 11 e 56) houve amplificação do gene *AURKB*. Ambos apresentaram FISH positivo com amplificação em 4% das interfases e cariótipo normal. Polissomia do cromossomo 17 foi observado em 2/40 casos (casos 35 e 55). O caso 55 apresentou cariótipo alterado com deleção da região 17p11.2 (Figura 21).



Legenda: CTO (grupo controle), * $p < 0,05$.

Figura 19 - Comparação entre a expressão gênica de *AURKA* de pacientes com amplificação de *AURKA* e grupo controle.

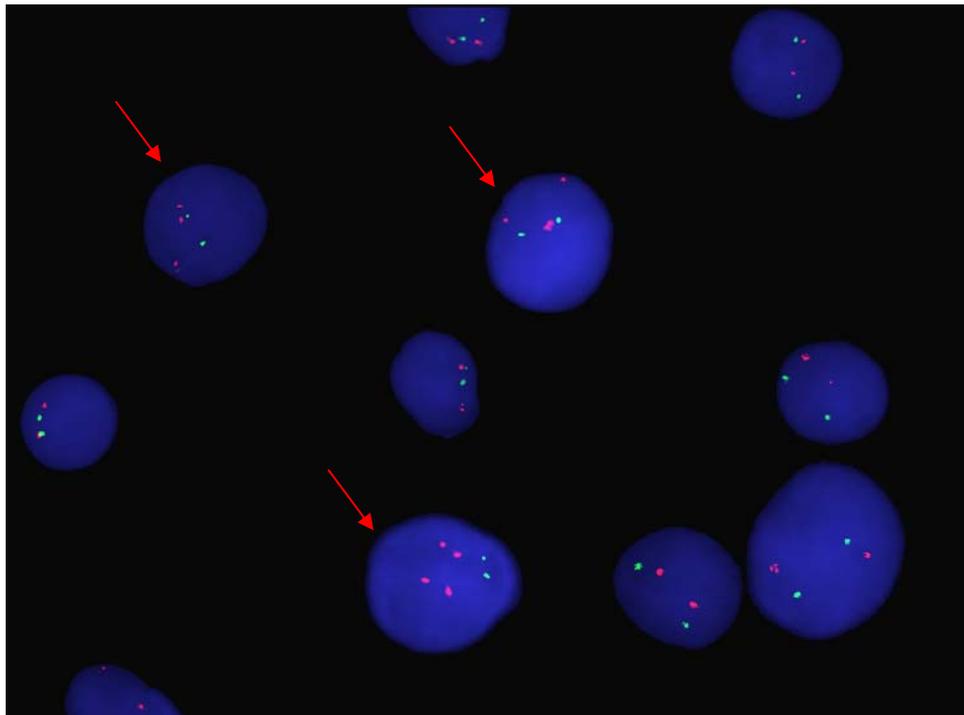


Figura 20 - FISH para AURKA com 4% das células demonstrando amplificação do gene AURKA (caso 37).

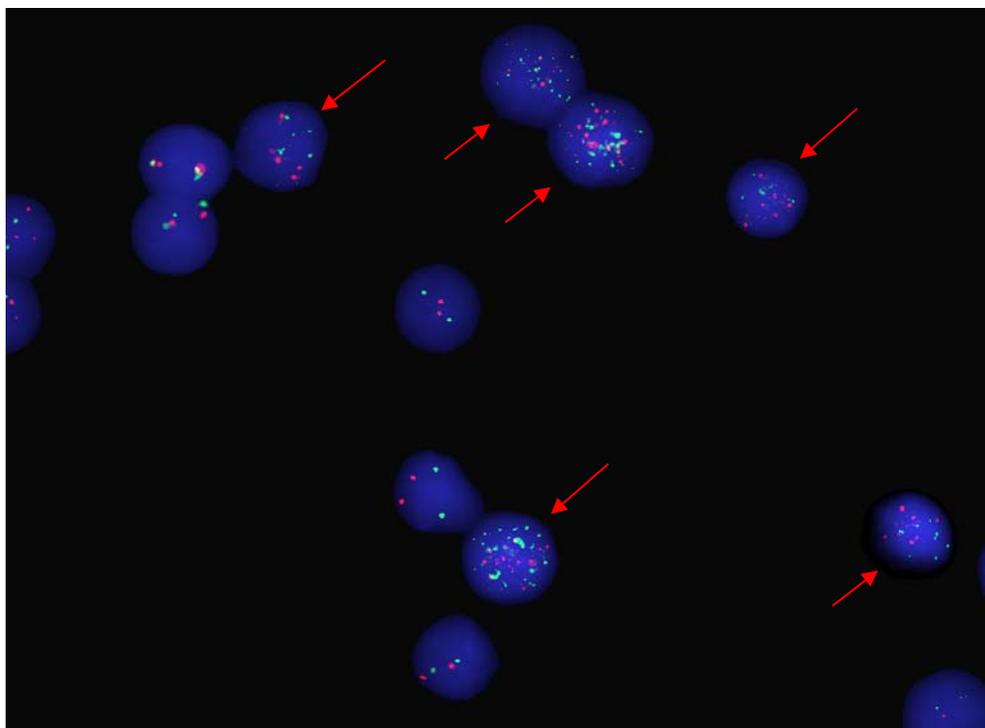


Figura 21 - FISH para AURKB com 17% das células demonstrando polissomia do cromossomo 17 (caso 55).

4.3 RESULTADOS DE EXPRESSÃO GÊNICA

Os RNAs totais extraídos das amostras apresentaram boa qualidade (integridade das bandas 28S/18S) conforme pode ser visualizado na foto proveniente de eletroforese em gel de agarose de algumas amostras (Figura 22), assim como os RNAs dos controles utilizados (Figura 23).

Devido à contaminação por DNA genômico, todas as amostras de RNA total foram tratadas com o reagente Turbo DNA-free™ (Ambion) segundo instruções do fabricante. A presença ou não de contaminação por DNA genômico após tratamento, foi determinada através da análise em gel de agarose 1% da presença da banda correspondente ao amplicon resultante da reação de PCR feita com *primers* para o gene *MLH1*. Como controle positivo foi utilizado amostra de DNA genômico da linhagem de mama C5.2. No controle negativo, não foi adicionado amostra (Figura 24).

Como normalizadores foram testados quatro genes endógenos: *GAPDH* (gliceraldeído fosfato desidrogenase), *ACTB* (β -actina), *B2M* (β -2-microglobulina,) e *UBC* (ubiquitina C). Os resultados de expressão foram submetidos ao programa GeNorm (<http://medgen.ugent.be/~jvdesomp/genorm/>).

O programa GeNorm analisa o perfil de amplificação dos genes constitutivos, considerando o Ct (ciclo *threshold*) obtido para cada amostra individualmente. As variações são calculadas e um valor de estabilidade é atribuído para cada gene (valor de M), ou um fator de normalização quando são selecionados mais de um endógeno. Além disso, um gráfico fornece os

dados sobre o perfil dos genes analisados e mostra os mais e menos estáveis.

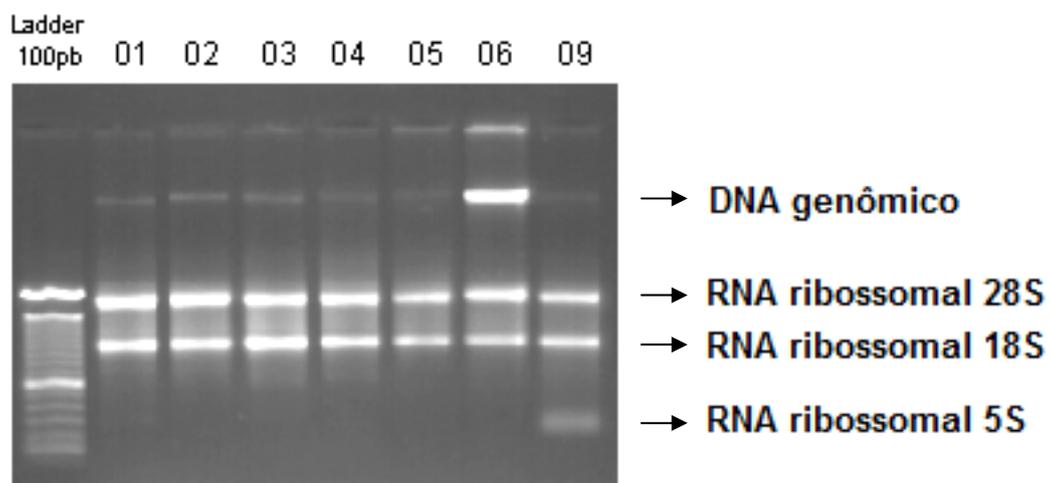
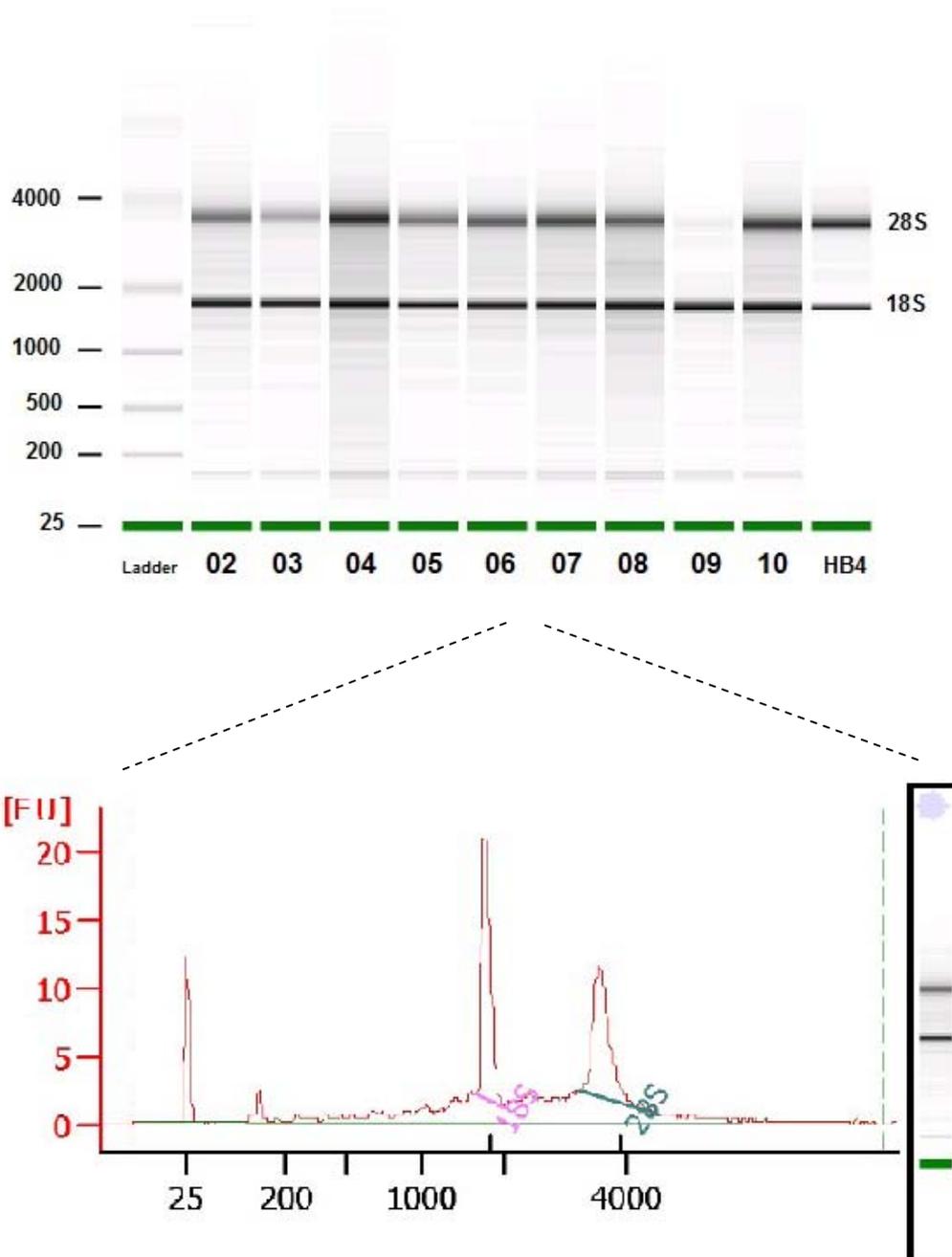


Figura 22 - Perfil eletroforético do RNA total. Eletroforese em gel de agarose 1% dos RNAs extraídos das amostras de medula 01, 02, 03, 04, 05, 06 e 09. Foram aplicados 0,5 ug de cada amostra.



Legenda: Perfil eletroforético avaliado em Bioanalyzer, das bandas 28S e 18S ribossomais, do RNA total extraído das amostras controles. As amostras números 03 e 09 apresentam-se degradadas. Ladder (marcador de tamanho). HB4 (controle da reação). Abaixo, exemplificação de curva de eletroesferograma, com picos das bandas 28S e 18S ribossomais do RNA total.

Figura 23 - Avaliação da integridade do RNA extraído das amostras controles.

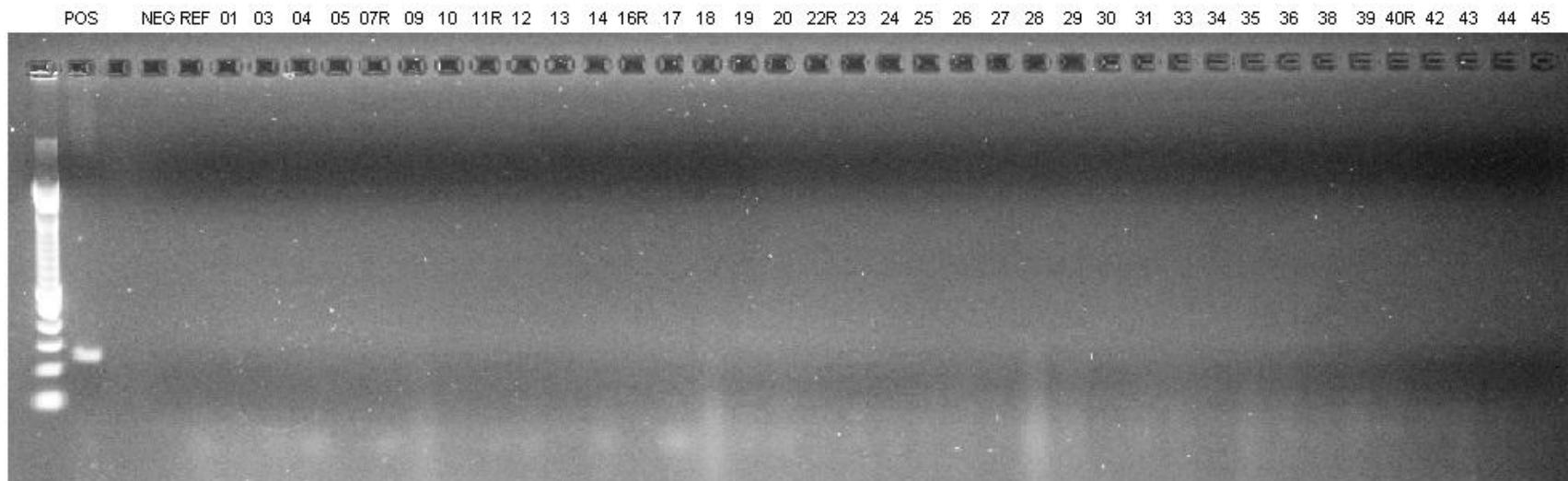


Figura 24 - Perfil eletroforético do PCR para amplificação de DNA genômico. Eletroforese em gel de agarose 1% da PCR das amostras de medula, após tratamento com Turbo DNA-free™ (Ambion). Foram aplicados 0,5 ug de cada amostra. POS (controle positivo - amostra de DNA genômico da linhagem de mama C5.2), NEG (controle negativo – amostra sem RNA), REF (amostra RNA referência - *pool* de diversas linhagens de tumores humanos).

Os genes normalizadores selecionados pelo programa ($M < 1,5$) foram *B2M* e *UBC*. Todos os cálculos de expressão relativa foram realizados com base na média dos ΔC_t s dos 2 genes endógenos selecionados (Figura 25).

Os resultados foram agrupados e analisados segundo as seguintes variáveis: celularidade, número de citopenias, dependência transfusional, características citogenéticas, subgrupos da classificação OMS (2008) e grupos de risco IPSS (1997).

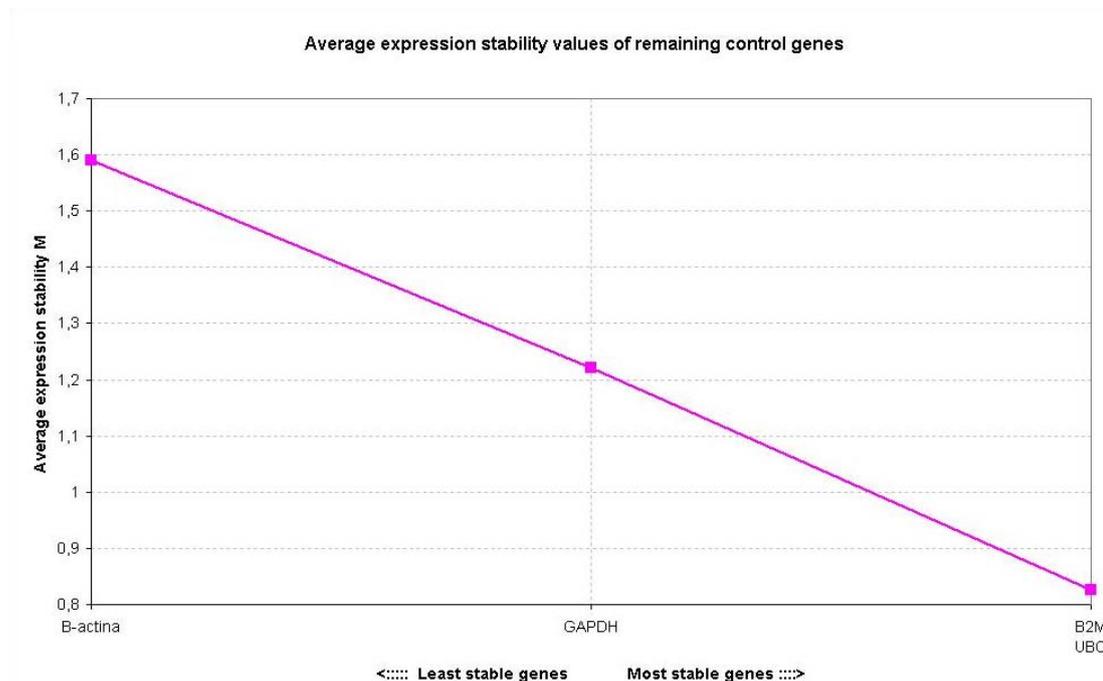
No que se refere aos controles (indivíduos saudáveis), das 10 amostras coletadas, duas (amostras 3 e 9) não apresentaram boa qualidade do RNA (material degradado) e por isso não foram utilizadas. As demais amostras foram submetidas aos mesmos procedimentos das amostras dos pacientes (extração, purificação, RT-PCR e PCR em Tempo Real).

4.3.1 Celularidade

Os pacientes foram agrupados de acordo com a celularidade da medula óssea em hiper celular (HIPER), normocelular (NORMO) e hipocelular (HIPO) (THIELE et al. 2005).

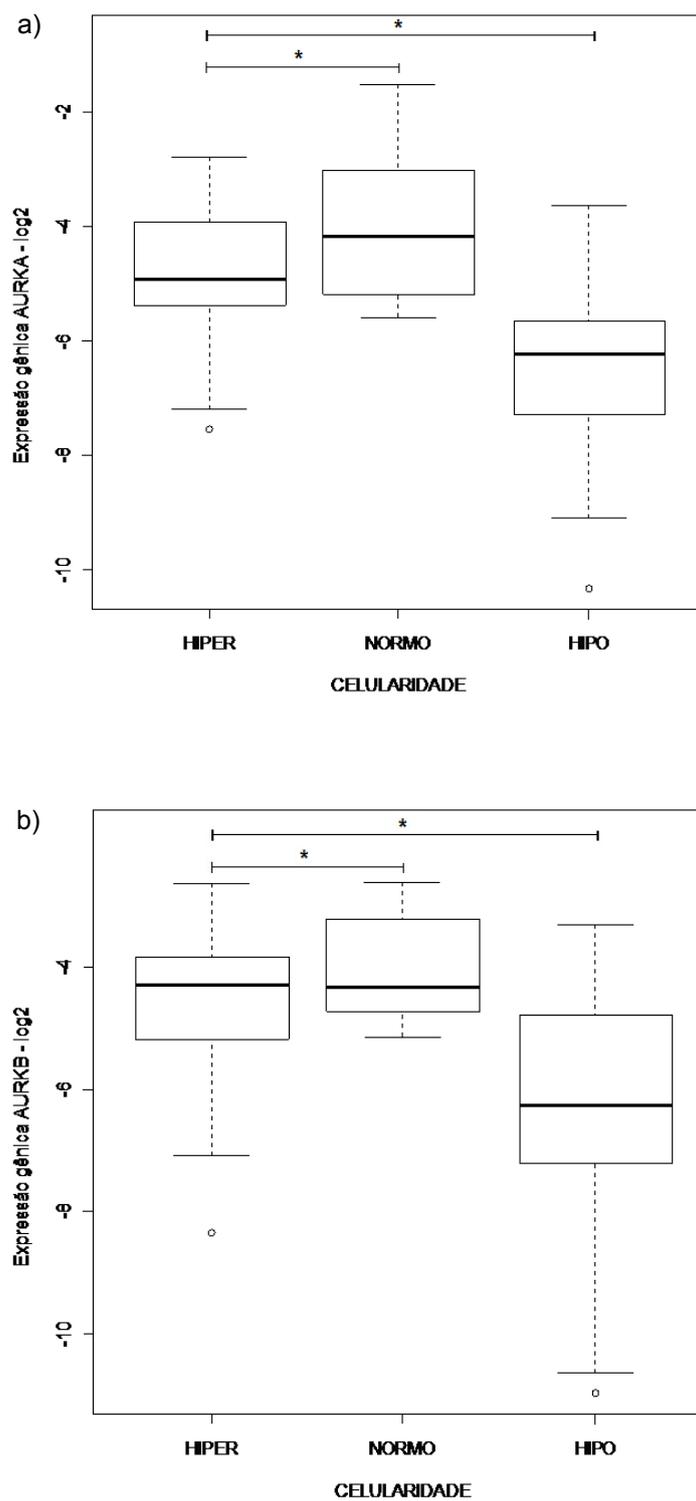
Na análise comparativa entre os grupos, a expressão de *AURKA* foi diferente entre os grupos HIPER e HIPO ($p=0,0020$; IC=-2,97 a -0,60), e NORMO e HIPO ($p=0,0003$; IC=1,13 a 4,03). Ambos, HIPER e NORMO, apresentaram maior expressão de *AURKA* em relação ao grupo HIPO, sendo 3 vezes maior no grupo HIPER em relação ao grupo HIPO, e 5,3 vezes mais expresso no grupo NORMO em relação ao grupo HIPO (Figura 26a).

AURKB também apresentou diferença entre os grupos HIPER e HIPO ($p=0,001$; IC=-3,32 a -0,77), e NORMO e HIPO ($p=0,001$; IC=0,88 a 4,04). Os grupos HIPER e NORMO foram 3 vezes mais expressos do que o grupo HIPO (Figura 26b).



Legenda: B2M (β 2-microglobulina), UBC (ubiquitina C), GAPDH (gliceraldeído fosfato desidrogenase).

Figura 25 - Valor de estabilidade atribuído aos genes endógenos em reação de PCR em tempo real com amostras de medula óssea (Programa Genorm).



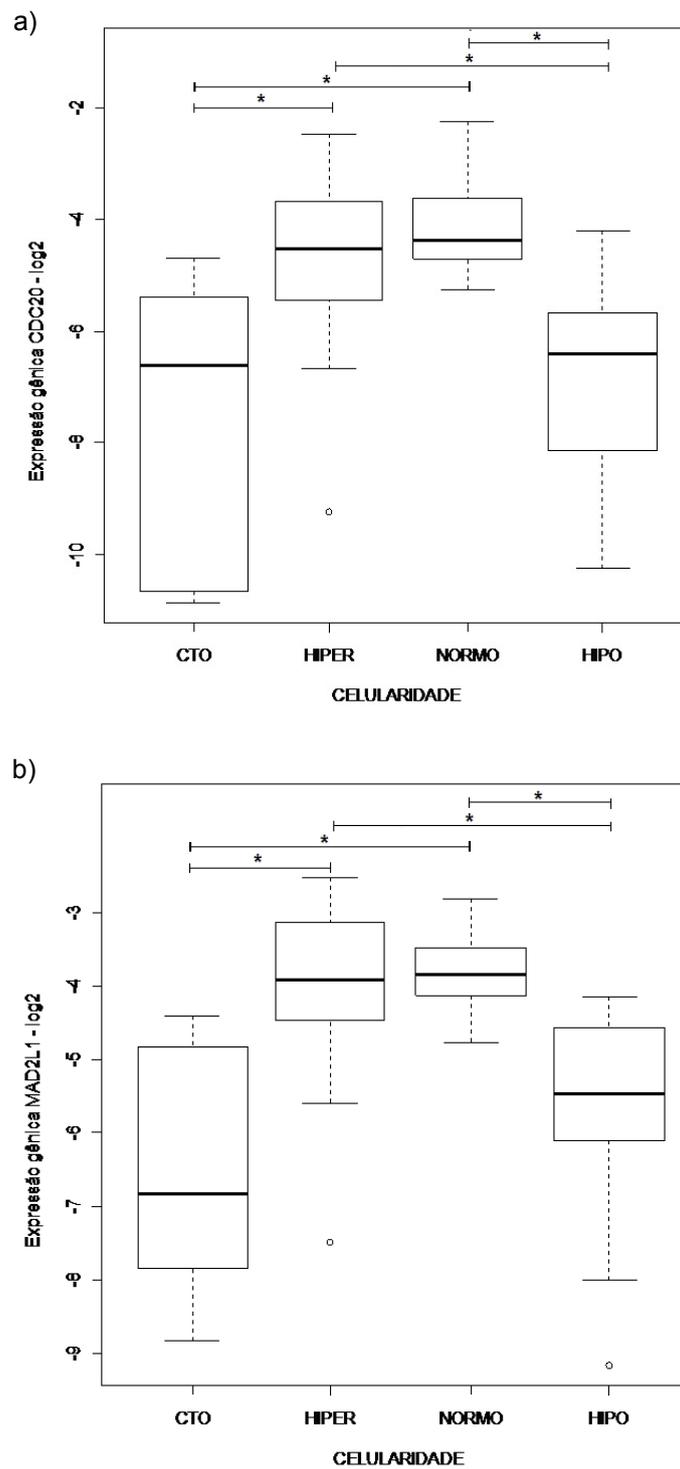
Legenda: * $p < 0,05$

Figura 26 - Comparação entre a expressão gênica de *AURKA* (a) e *AURKB* (b) em pacientes portadores de SMD de acordo com a celularidade medular.

Para os genes *CDC20* e *MAD2L1*, além das diferenças apresentadas entre os grupos HIPER e HIPO, NORMO e HIPO, houve também diferença entre o grupo controle (CTO) e os grupos HIPER e NORMO.

A análise de expressão de *CDC20* foi diferente entre os grupos HIPER e HIPO ($p=0,0012$; IC=-3,87 a -0,77), NORMO e HIPO ($p=0,0012$; IC=0,97 a 4,81), CTO e HIPER ($p<0,001$; IC=1,24 a 5,13), e CTO e NORMO ($p<0,001$; IC=1,50 a 6,01). A expressão gênica de *CDC20* encontra-se 5 e 4,5 vezes maior no grupo HIPER do que no grupo HIPO e CTO, respectivamente. Da mesma forma, o grupo NORMO está 6,4 e 5,7 vezes mais expresso em relação ao grupo HIPO e CTO (Figura 27a).

Para *MAD2L1* os grupos HIPER e NORMO mostraram-se 3 vezes mais expressos ($p<0,001$; IC=-2,86 a -0,70 e $p=0,0013$; IC=0,67 a 3,37), respectivamente) em relação ao grupo HIPO e 4 vezes mais expressos ($p<0,001$; IC=1,22 a 3,86 e 1,23 a 4,32, respectivamente) em relação ao grupo CTO (Figura 27b).



Legenda: CTO (grupo controle). * $p < 0,05$

Figura 27 - Comparação entre a expressão gênica de *CDC20* (a) e *MAD2L1* (b) em pacientes portadores de SMD de acordo com a celularidade medular.

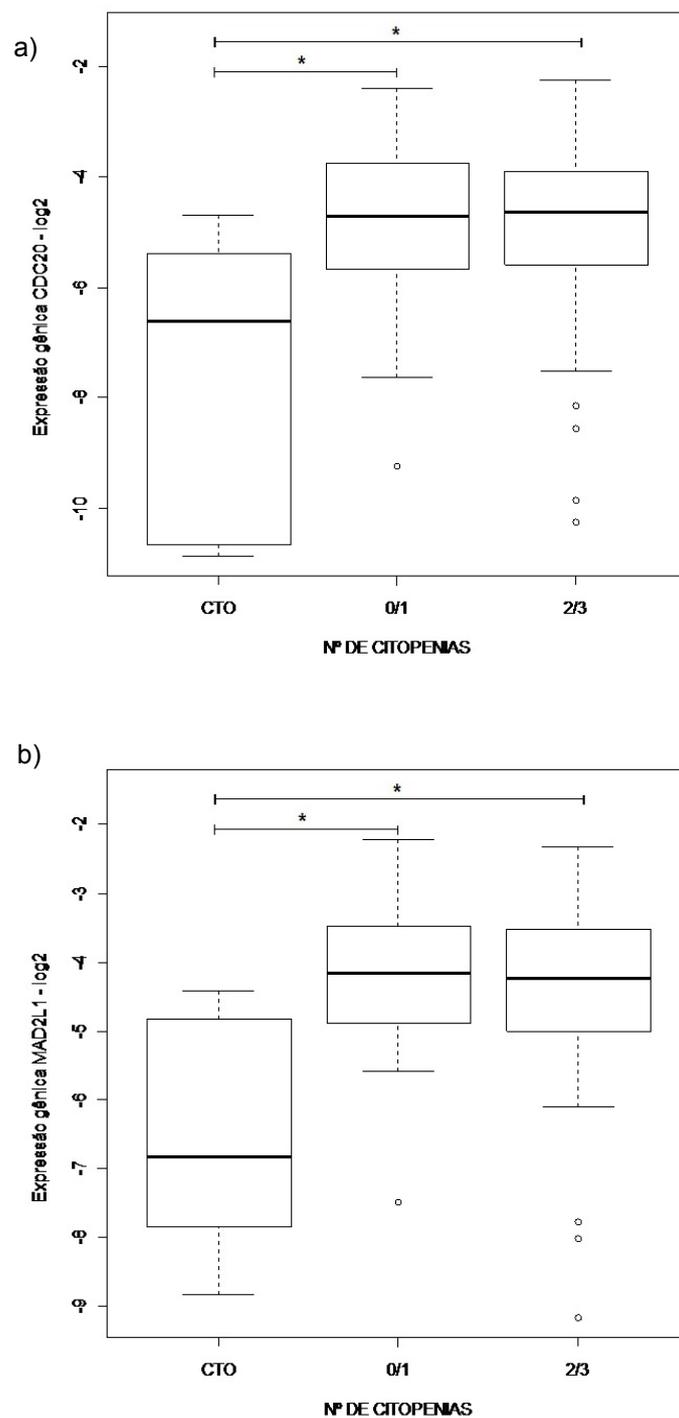
4.3.2 Número de citopenias

Os pacientes foram agrupados de acordo com o número de citopenias apresentadas no sangue periférico: nenhuma ou uma citopenia (0/1), e duas ou três citopenias (2/3).

Na análise comparativa, a expressão de *AURKA* e *AURKB* não mostrou diferença entre os grupos ($p=0,70$ e $p=0,72$, respectivamente).

CDC20 e *MAD2L1* apresentaram diferença entre os grupos 0/1 e 2/3 quando comparados ao controle (CTO). Os grupos 0/1 e 2/3 não foram diferentes entre si.

Em relação à *CDC20*, os grupos 0/1 e 2/3 mostraram-se 4 vezes mais expressos ($p=0,0023$; IC=-4,84 a -0,92 e $p=0,0033$; IC=-4,59 a -0,79, respectivamente) do que o grupo CTO, enquanto para *MAD2L1*, a expressão gênica encontra-se aproximadamente 4 vezes maior no grupo 0/1 em relação ao grupo CTO ($p<0,001$, IC=-3,68 a -0,96) e 3,6 vezes mais expresso no grupo 2/3 em relação ao grupo CTO ($p=0,0014$, IC=-3,32 a -0,70) (Figura 28).



Legenda: CTO (grupo controle). * $p < 0,05$

Figura 28 - Comparação entre a expressão gênica de *CDC20* (a) e *MAD2L1* (b) em pacientes portadores de SMD de acordo com o número de citopenias apresentadas no sangue periférico.

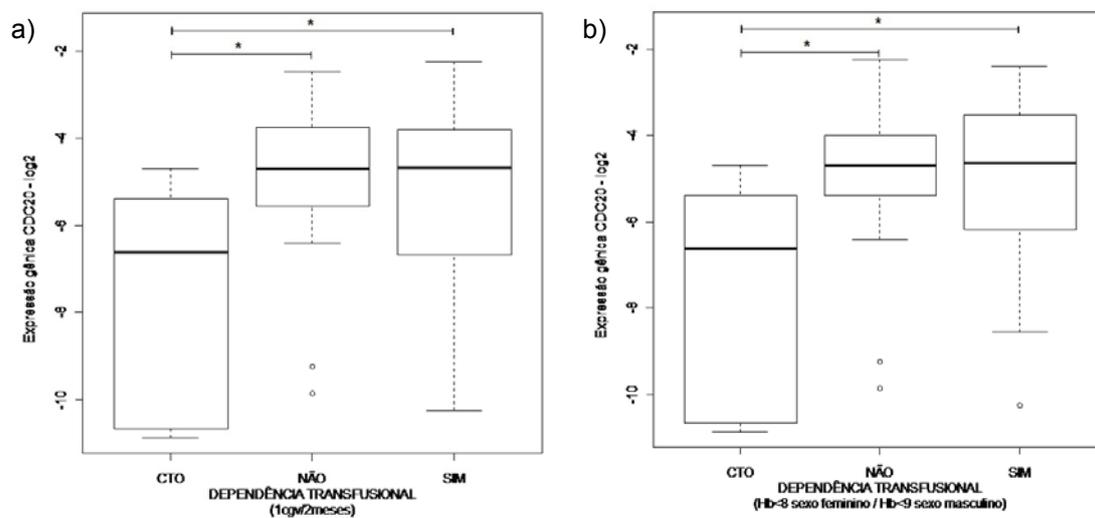
4.3.3 Dependência transfusional

Os pacientes foram agrupados de acordo com a necessidade transfusional. Foram utilizados dois critérios para definir dependência transfusional: o número de transfusões realizadas (MALCOVATI et al. 2005) e a concentração de hemoglobina (MALCOVATI et al. 2011).

Na análise comparativa, a expressão de *AURKA* e *AURKB* não mostrou diferença entre os grupos, independente do critério utilizado (número de transfusões: $p=0,31$ e $p=0,37$; concentração de hemoglobina: $p=0,99$ e $p=0,82$).

CDC20 e *MAD2L1* apresentaram diferença entre os grupos dependentes (SIM) e não dependentes (NÃO) de transfusão quando comparados ao controle (CTO) em ambos critérios analisados. Os grupos SIM e NÃO não foram diferentes entre si.

Quando utilizado o número de transfusões para definir dependência transfusional na análise do gene *CDC20*, os grupos dependentes (SIM) e não dependentes (NÃO) mostraram-se aproximadamente 4 vezes mais expressos ($p=0,0106$; IC=0,51 a 4,55 e $p=0,0032$; IC=0,85 a 4,82, respectivamente) do que o grupo CTO. Quando a dependência transfusional foi definida segundo a concentração de hemoglobina, a diferença entre os grupos mostrou-se mais evidente, sendo o grupo dependente (SIM) e não dependente (NÃO) 4,6 vezes e 3,1 vezes mais expressos do que o CTO, respectivamente ($p= 0,0025$; IC=0,86 a 4,70 e $p= 0,0033$; IC=0,84 a 4,77) (Figura 29).

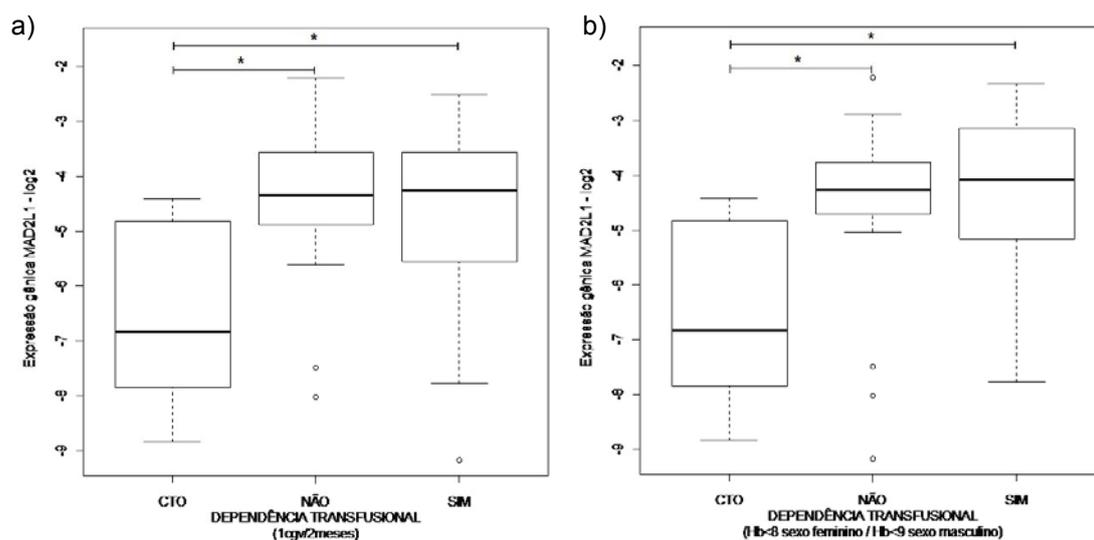


Legenda: CTO (grupo controle). * $p < 0,05$

Figura 29 - Comparação entre a expressão gênica de *CDC20* em pacientes portadores de SMD de acordo com a necessidade transfusional. Critério utilizado para definir dependência transfusional: a) número de transfusões realizadas (1 transfusão a cada 8 semanas durante período de 4 meses); b) concentração de hemoglobina (Hb menor que 8g/dL para mulheres e menor que 9g/dL para homens).

Para *MAD2L1* a expressão gênica encontra-se aproximadamente 3,4 vezes maior no grupo dependente (SIM) em relação ao grupo CTO ($p=0,0044$; IC=0,53 a 3,30) e 3,7 vezes mais expresso no grupo não dependente (NÃO) em relação ao grupo CTO ($p < 0,001$, IC=0,83 a 3,56) quando utilizado o número de transfusões como critério. No entanto, essa diferença se inverte quando dependência transfusional é definida segundo a concentração de hemoglobina. Utilizando-se esse critério, a diferença entre os dependentes (SIM) torna-se maior (4,1 vezes mais expresso em relação ao CTO) e não dependentes (NÃO) torna-se menor (3,2 vezes mais

expresso do que o CTO) quando as mesmas comparações anteriores são realizadas ($p < 0.001$; IC=0,96 a 3,62 e $p = 0,0024$; IC=0,63 a 3,34) (Figura 30).



Legenda: CTO (grupo controle). * $p < 0,05$

Figura 30 - Comparação entre a expressão gênica de *MAD2L1* em pacientes portadores de SMD de acordo com a necessidade transfusional. Critério utilizado para definir dependência transfusional: a) número de transfusões realizadas (1 transfusão a cada 8 semanas durante período de 4 meses); b) concentração de hemoglobina (Hb menor que 8g/dL para mulheres e menor que 9g/dL para homens).

4.3.4 Variáveis citogenéticas

A Cariótipo alterado e não alterado

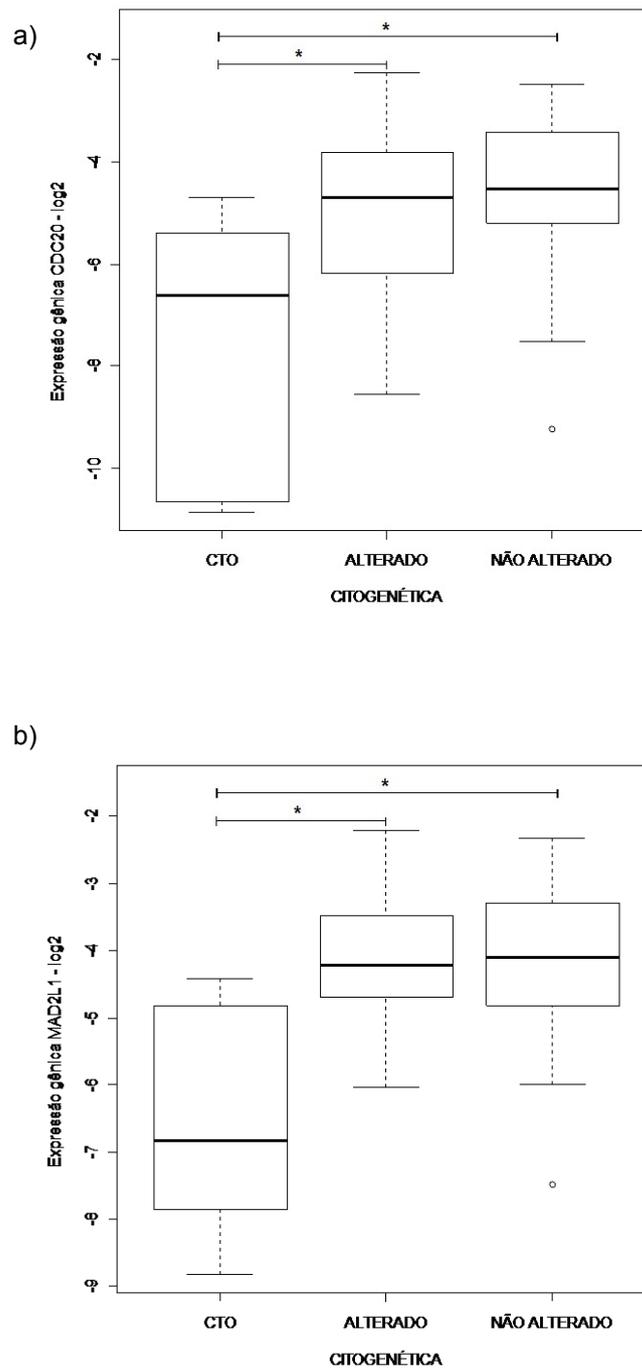
Os pacientes foram agrupados de acordo com a presença ou não de alterações citogenéticas no cariótipo de células de medula óssea.

Na análise comparativa, a expressão de *AURKA* e *AURKB* não mostrou diferença entre os grupos ($p=0,53$ e $p=0,63$, respectivamente).

CDC20 e *MAD2L1* apresentaram diferença entre os grupos ALTERADO e NÃO ALTERADO quando comparados ao controle (CTO). Os grupos ALTERADO e NÃO ALTERADO não foram diferentes entre si.

A análise de expressão de *CDC20* foi diferente entre os grupos ALTERADO e e NÃO ALTERADO quando comparados ao CTO ($p=0,0016$; IC=-4,65 a -0,97 e $p<0.001$; IC=1,24 a 5,02, respectivamente). A expressão gênica de *CDC20* encontra-se 4 vezes maior no grupo ALTERADO do que no grupo CTO. Da mesma forma, o grupo NÃO ALTERADO está 4,3 vezes mais expresso em relação ao grupo CTO (Figura 31a).

Para *MAD2L1*, a expressão gênica também foi aproximadamente 4 vezes maior no grupo ALTERADO e NÃO ALTERADO em relação ao grupo CTO ($p<0.001$, IC=-3,50 a -1,20 e 1,23 a 3,60) (Figura 31b).



Legenda: CTO (grupo controle). * $p < 0,05$

Figura 31 - Comparação entre a expressão gênica de *CDC20* (a) e *MAD2L1* (b) em pacientes portadores de SMD de acordo com a presença de alterações citogenéticas encontradas no cariótipo (banda G).

B Cariótipo aneuplóide e não aneuplóide

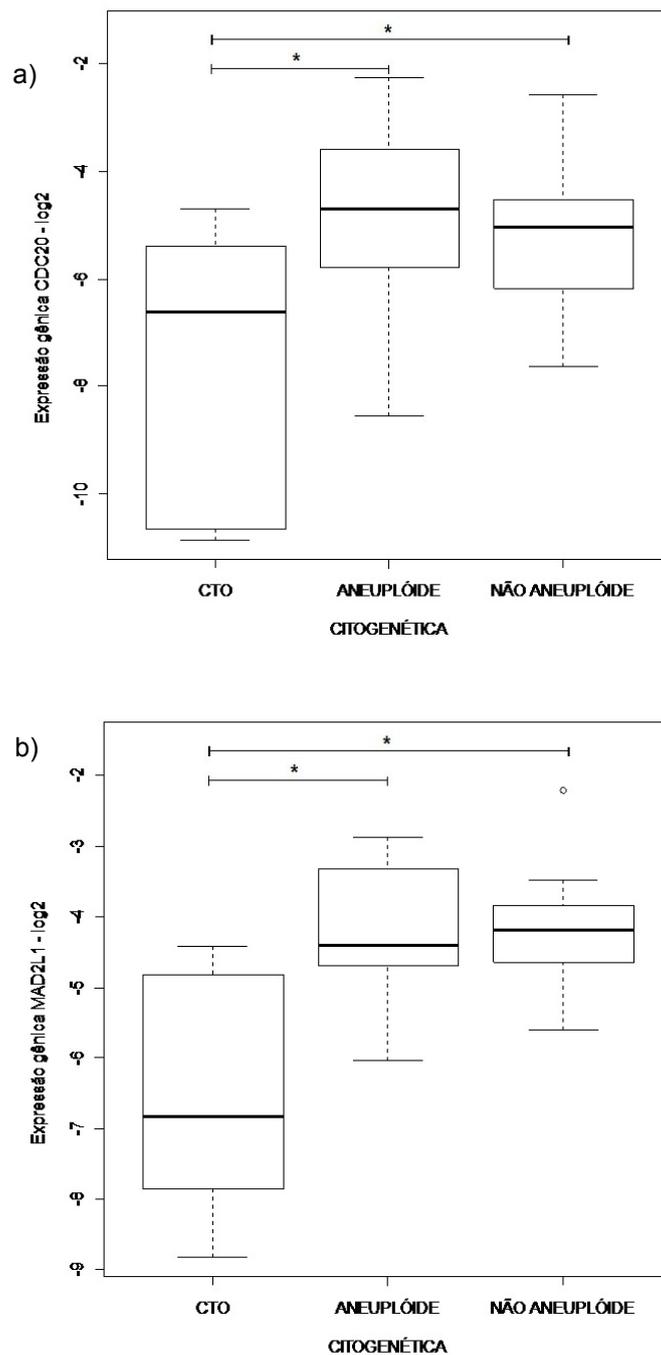
Os pacientes foram agrupados de acordo com a presença ou não de aneuploidia (ganho ou perda de cromossomo) dentre as alterações citogenéticas no cariótipo.

Na análise comparativa, a expressão de *AURKA* e *AURKB* não mostrou diferença entre os grupos ($p=0,82$ e $p=0,89$, respectivamente).

A expressão de *CDC20* foi diferente entre os grupos ANEUPLÓIDE e NÃO ANEUPLÓIDE quando comparados ao CTO ($p=0,0062$; IC=-5,11 a -0,77 e $p=0,0254$; IC=0,28 a 4,95), sendo sua expressão 4,4 vezes maior no grupo ANEUPLÓIDE e 3,1 vezes mais expresso no grupo NÃO ANEUPLÓIDE do que no grupo CTO (Figura 32a).

MAD2L1 também apresentou diferença entre os grupos ANEUPLÓIDE e NÃO ANEUPLÓIDE em relação ao controle (CTO). A expressão de *MAD2L1* foi aproximadamente 3,7 vezes maior nos grupos ANEUPLÓIDE e NÃO ANEUPLÓIDE em relação ao grupo CTO ($p<0.001$; IC=-3,64 a -1,10 e IC=0,94 a 3,69, respectivamente) (Figura 32b).

Os grupos ANEUPLÓIDE e NÃO ANEUPLÓIDE não foram diferentes entre si.



Legenda: CTO (grupo controle). * $p < 0,05$

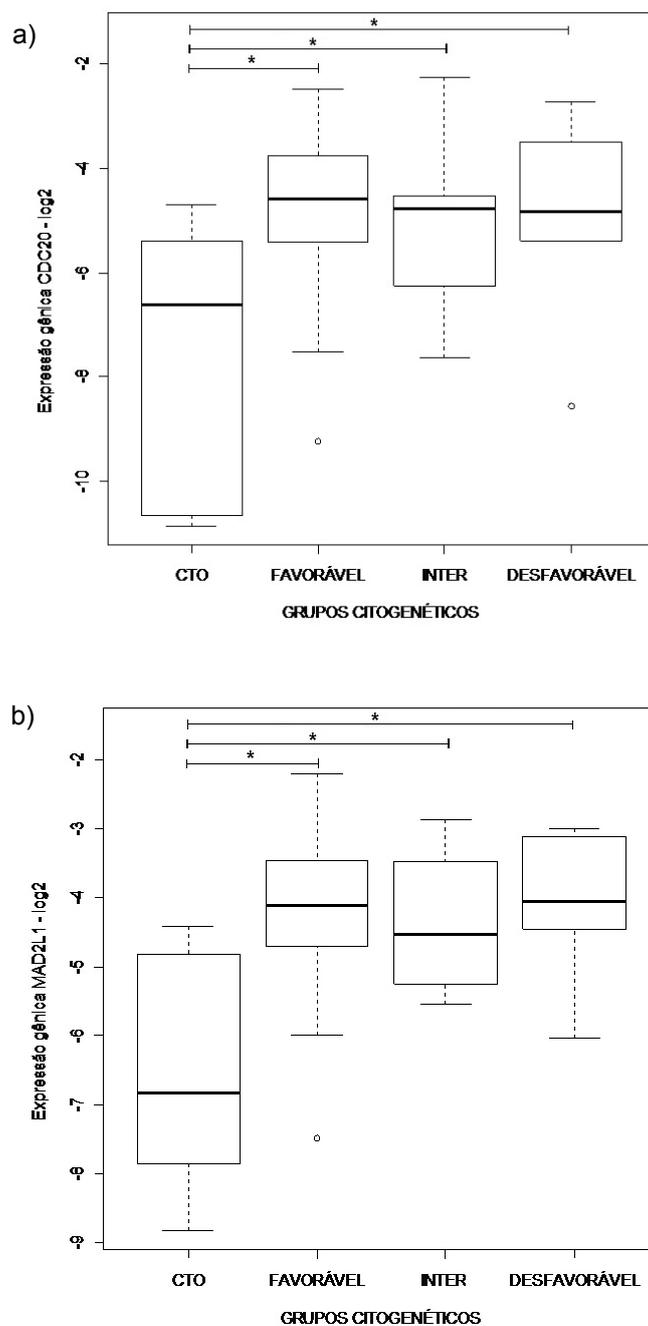
Figura 32 - Comparação entre a expressão gênica de *CDC20* (a) e *MAD2L1* (b) em pacientes portadores de SMD de acordo com a presença ou não de aneuploidia dentre as alterações citogenéticas encontradas no cariótipo (banda G).

C Grupos de Citogenética (IPSS-1997)

Os pacientes foram agrupados de acordo com os subgrupos citogenéticos utilizados no Sistema Internacional de Escore Prognóstico (IPSS 1997), no qual são descritos 3 grupos: FAVORÁVEL (cariótipo normal, nulissomia do cromossomo Y, del(5q), del(20q)) INTERMEDIÁRIO (demais alterações) e DESFAVORÁVEL (alterações envolvendo o cromossomo 7, cariótipo complexo).

Na análise comparativa, a expressão de *AURKA* e *AURKB* não mostrou diferença entre os grupos ($p=0,92$ e $p=0,55$, respectivamente).

Em relação à *CDC20*, os grupos FAVORÁVEL, INTERMEDIÁRIO e DESFAVORÁVEL mostraram-se aproximadamente 4 vezes mais expressos ($p=0,0011$; IC=1,06 a 5,12, $p=0,0247$; IC=0,25 a 4,97 e $p=0,0150$; IC=0,45 a 5,40, respectivamente) do que o grupo CTO, enquanto para *MAD2L1*, a expressão gênica foi 4 vezes maior no grupo FAVORÁVEL e DESFAVORÁVEL em relação ao grupo CTO ($p<0.001$; IC=1,15 a 3,67 e 0,92 a 4,06) e 3,4 vezes mais expresso no grupo INTERMEDIÁRIO em relação ao grupo CTO ($p=0,0016$; IC=0,71 a 3,68). Os grupos FAVORÁVEL, INTERMEDIÁRIO e DESFAVORÁVEL não foram diferentes entre si (Figura 33).



Legenda: CTO (grupo controle). * $p < 0,05$

Figura 33 - Comparação entre a expressão gênica de *CDC20* (a) e *MAD2L1* (b) em pacientes portadores de SMD de acordo com os subgrupos citogenéticos utilizados no Sistema Internacional de Escore Prognóstico (1997).

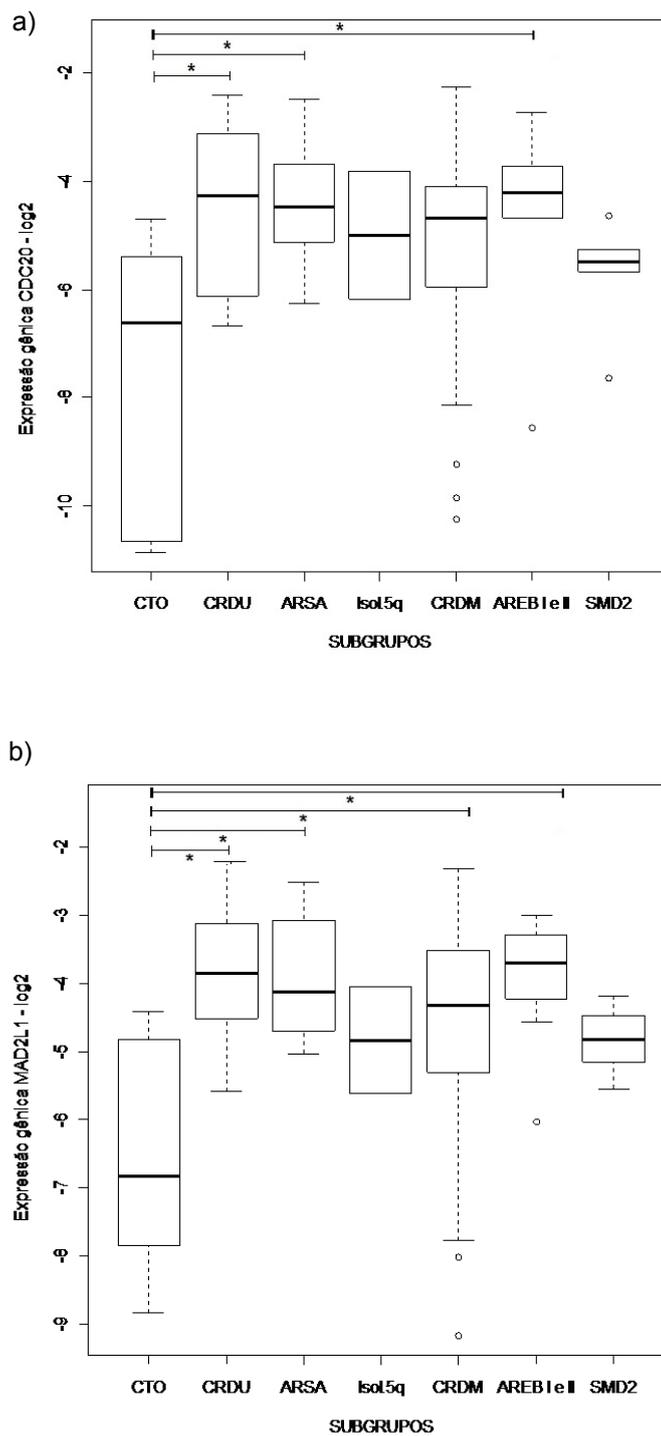
4.3.5 Subgrupos OMS (2008)

Os pacientes foram agrupados de acordo com os subgrupos utilizados pela OMS (2008): CRDU, ARSA, 5q isolado, CRDM, AREB I, AREB II e SMD secundária (SMD2).

Na análise comparativa, a expressão de *AURKA* e *AURKB* não mostrou diferença entre os grupos ($p=0,94$ e $p=0,73$, respectivamente).

A expressão de *CDC20* foi diferente entre os grupos CRDU, ARSA e AREBs (I e II) quando comparados ao CTO ($p=0,0281$; IC=-6,27 a -0,22 , $p=0,0138$; IC=-6,35 a -0,46 e $p=0,0321$; IC=-6,22 a -0,17, respectivamente), sendo sua expressão 5,9 vezes maior no grupo CRDU, 4,8 e 4,4 vezes mais expresso no grupo ARSA e AREBs do que no grupo CTO, respectivamente. Os demais grupos não foram diferentes entre si (Figura 34a).

Para *MAD2L1*, a expressão gênica entre os grupos CRDU, ARSA, CRDM e AREBs (I e II) foram diferentes em relação ao CTO ($p=0,0049$; IC=-4,80 a -0,57 , $p=0,0054$; IC=-4,65 a -0,54 , $p=0,0264$; IC=-3,53 a -0,13 e $p=0,0071$; IC=-4,71 a -0,48, respectivamente), sendo ARSA e AREBs aproximadamente 4 vezes mais expressos em relação ao grupo CTO. CRDU apresentou a maior diferença, com 5,3 vezes mais expressão do que o grupo CTO, e CRDM a menor diferença, com apenas 3,4 vezes. Os demais grupos não foram diferentes entre si (Figura 34b).



Legenda: CTO (grupo controle). * $p < 0,05$

Figura 34 - Comparação entre a expressão gênica de *CDC20* (a) e *MAD2L1* (b) em pacientes portadores de SMD de acordo com os subgrupos, segundo classificação OMS (2008).

4.3.6 Grupos de risco IPSS (1997)

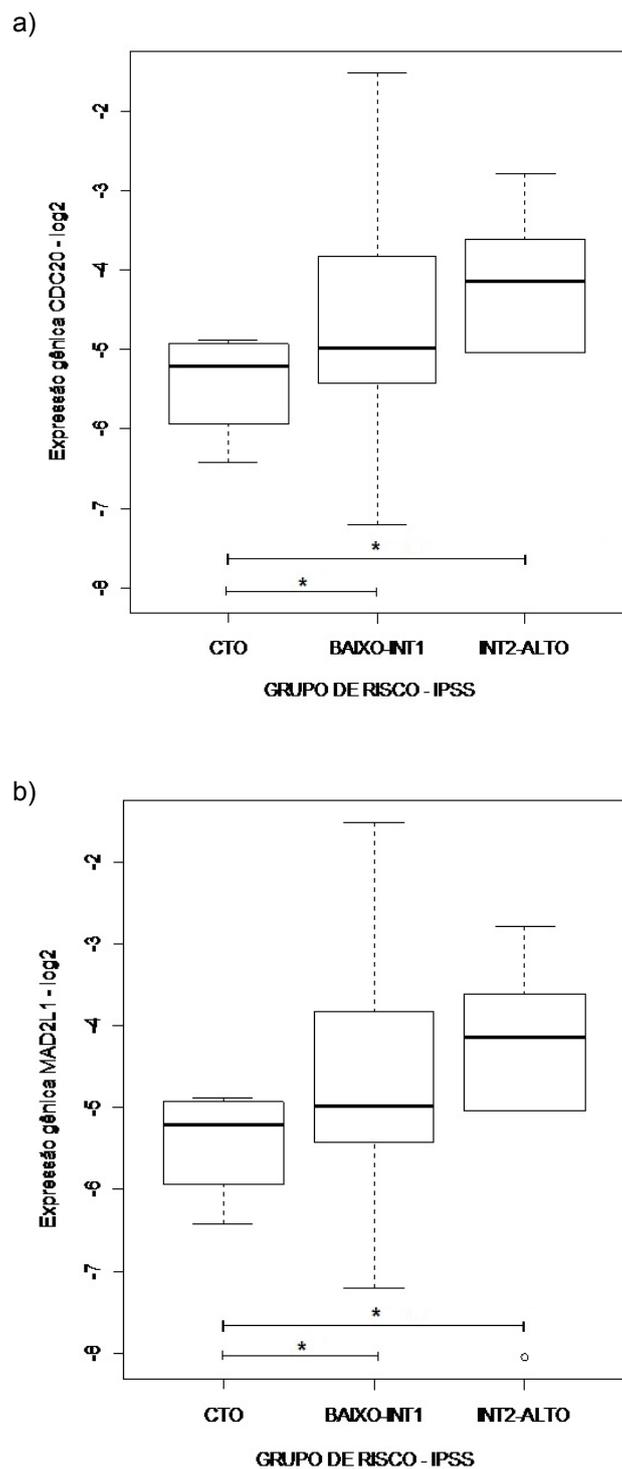
De acordo com o Sistema Internacional de Escore Prognóstico os pacientes são estratificados em baixo risco, risco intermediário I e II e alto risco. Para análise comparativa, os pacientes de baixo risco e risco intermediário I, e os pacientes de risco intermediário II e alto risco foram agrupados.

Na análise comparativa, a expressão de *AURKA* e *AURKB* não mostrou diferença entre os grupos ($p=0,56$ e $p=0,67$, respectivamente).

A expressão de *CDC20* foi diferente entre os grupos BAIXO/INT1 e INT2/ALTO quando comparados ao CTO ($p<0.001$; IC=-5,00 a -1,12 e $p=0,0142$; IC=0,49 a 5,69, respectivamente), sendo sua expressão 4,3 vezes maior no grupo BAIXO/INT1 e 4,8 vezes mais expresso no grupo INT2/ALTO do que no grupo CTO (Figura 35a).

MAD2L1 também apresentou diferença ($p<0.001$) entre os grupos BAIXO/INT1 e INT2/ALTO em relação ao controle (CTO). A expressão de *MAD2L1* foi 4 e 4,4 vezes maior no grupo BAIXO/INT1 e INT2/ALTO do que no grupo CTO (IC=-3,62 a -1,23 e IC=0,98 a 4,28) (Figura 35b).

Em nenhuma das análises realizadas, os grupos BAIXO/INT1 e INT2/ALTO foram diferentes entre si.



Legenda: CTO (grupo controle). * $p < 0,05$

Figura 35 - Comparação entre a expressão gênica de *CDC20* (a) e *MAD2L1* (b) em pacientes portadores de SMD de acordo com os grupos de risco, segundo IPSS (1997).

5 DISCUSSÃO

Os dados sobre SMD no Brasil, um país de dimensões continentais, ainda são bastante escassos. Encontramos apenas um registro retrospectivo realizado no período de 2003-2007 (MAGALHÃES et al. 2010), no qual foram incluídos um total de 476 pacientes de 12 centros distribuídos pelas regiões Nordeste, Sudeste e Sul, onde se observou uma idade mediana de 68,3 anos. No nosso estudo, a idade mediana foi de 66 anos.

Em estudos realizados nos países ocidentais, a mediana de idade é 71 anos na Alemanha (GERMING et al. 2004), 74,3 na França (NISSE et al. 2001), e 75 nos Estados Unidos (MAX et al. 2007). Já os estudos realizados em países asiáticos demonstram que os pacientes são, no mínimo, de 8-10 anos mais jovens do que nos países ocidentais. A mediana de idade é 59 anos em Taiwan (TIEN et al. 1994), 60 no Japão (OGUMA et al. 1995), 56 na Tailândia (INTRAGUMTORNCHAI et al. 1998), 53 na Coreia (LEE et al. 1999), 50 na China (ZHAO et al. 2002) e 55 na Índia (DAKSHINAMURTHY et al. 2005).

Esses dados mostram que apesar da SMD ser mais freqüente na população de idosos (≥ 60 anos), no Brasil a mediana de idade é inferior aos encontrados nos países ocidentais. Isso talvez seja uma consequência intrínseca da heterogeneidade genética da população, ou uma consequência da exposição a fatores ambientais que contribuem para o desenvolvimento de SMD.

Alguns estudos epidemiológicos (RIGOLIN et al 1998; NISSE et al 2001) sugerem que exposição ocupacional a solventes orgânicos, pesticidas, derivados de petróleo, entre outros, contribuem para o desenvolvimento de SMD primária. Hoje, o Brasil ocupa a terceira posição no ranking dos maiores produtores agrícolas do mundo, e é líder no consumo de agrotóxicos (CARNEIRO e ALMEIDA 2010). Os dados do Censo agropecuário de 2006 demonstram o uso exacerbado de agrotóxico em todo o país. Apesar de o Ceará ser o quarto maior usuário de agrotóxico do Brasil, e o primeiro do Nordeste (IBGE 2007), não foi possível inferir qualquer relação entre exposição ocupacional e incidência da doença, pois apenas 25% dos prontuários registravam questionamentos sobre exposição a carcinógenos.

É importante ressaltar que o envelhecimento da população brasileira está se acentuando e que a incidência dessa doença é maior à medida que aumenta a faixa etária. Portanto, é de se esperar um aumento na incidência dessa doença no Brasil. Em 2000, o grupo de 0 a 14 anos representava 30% da população brasileira, enquanto os maiores de 65 anos eram apenas 5%; em 2050, os dois grupos se igualarão em 18%. Em 2050, serão 259,8 milhões de brasileiros e a expectativa de vida, ao nascer, será de 81,3 anos, a mesma dos japoneses, hoje (IBGE 2011).

Ao contrário do que foi observado por MAGALHÃES et al. (2010), que mostrou discreta prevalência do sexo feminino (50,8%) em pacientes portadores de SMD, nosso trabalho apresentou razão M/F de 1,3:1. Esse dado apresenta-se de acordo com os registros internacionais (OGUMA et al.

1995; GREENBERG et al. 1997; CHEN et al. 2005; SOLÉ et al. 2005; HAASE et al. 2007), que demonstram razão M/F variando entre 1,1 e 2.

Como esperado, a maioria dos pacientes portadores de SMD apresentaram medula hipercelular (52%). Esse dado está relacionado à própria patogênese da doença, visto que a apoptose excessiva dos estágios iniciais da doença é contrabalanceada pelo aumento na proliferação das células progenitoras hematopoéticas. Essas alterações proliferativas podem ser uma característica intrínseca do clone neoplásico ou podem estar relacionadas a interações autócrinas e/ou parácrinas de citocinas (MUTFI 2004; BERNASCONI 2008; ISHIBASHI et al. 2011).

Apesar da maioria dos casos de SMD apresentarem medula hiper ou normocelular, a frequência de medula hipocelular (28%) observada em nosso estudo foi maior do que o descrito na literatura internacional (entre 10%-20% dos casos) (CATENACCI e SCHILLER 2005; GERMING et al. 2008; DELLA PORTA et al. 2009), porém condiz com estudos nacionais, os quais relatam frequência de medula hipocelular em aproximadamente um quarto dos casos (LORAND-METZE et al. 2004; VASSALLO e MAGALHÃES 2009).

A presença de cariótipos normais (44,4%) e a elevada frequência de alterações citogenéticas com deleção 5q isolada (24%) foram os principais fatores que contribuíram, em nosso estudo, para a prevalência (85%) dos grupos de baixo risco e risco intermediário 1, o que está de acordo com o observado no registro nacional (MAGALHÃES et al. 2010), onde a maioria dos casos (83,2%) foram estratificados como de baixo risco (IPSS 1997).

Ainda segundo MAGALHÃES et al. (2010) a maioria dos pacientes portadores de SMD (66,3%) apresentam dependência transfusional. No nosso estudo, os valores variaram de acordo com o critério utilizado para determinar a dependência transfusional. Quando o número de transfusões realizadas foi utilizado como critério (MALCOVATI et al. 2005), quarenta e nove por cento dos pacientes apresentaram dependência transfusional, contrapondo os 62,3% de pacientes dependentes de transfusão quando a concentração de hemoglobina foi utilizada como critério (MALCOVATI et al. 2011). Essa diferença deve-se ao caráter subjetivo da indicação transfusional, visto que pacientes com concentrações baixas de hemoglobina não necessitam, obrigatoriamente, de transfusão. Acreditamos que o número de transfusões realizadas reflete melhor a verdadeira necessidade transfusional do paciente e, conseqüentemente, a gravidade da citopenia.

A citogenética é fundamental para o diagnóstico, prognóstico e decisão terapêutica de pacientes com SMD (MUTFI 2004). A incidência de cariótipo alterado encontrada neste estudo (55,5%) mostra-se de acordo com os dados internacionais que relatam uma freqüência entre 40-60% em pacientes portadores de SMD *de novo* (SOLÉ et al. 2005; DAKSHINAMURTHY et al. 2005; HAASE et al. 2007; HAASE 2008), no entanto, superior aos estudos nacionais publicados por ROMEO et al. (2002) e PINHEIRO e CHAUFFAILLE (2009), no qual foi observada uma freqüência de 35,2% (12/34) e 20,5% (9/44) de alterações citogenéticas, respectivamente.

Assim como descrito na literatura (SOLEÉ et al. 2005; HAASE et al. 2007; PEDERSEN-BJERGAARD et al. 2007; BERNASCONI et al. 2008; HAASE 2008), as alterações cromossômicas encontradas em nosso estudo foram predominantemente alterações não balanceadas, e dentre elas, as alterações envolvendo perda da região 5q (5q-), perda do cromossomo 7 ou da região 7q (-7/7q-), trissomia do 8 (+8) e perda da região 20q (20q-) foram as mais freqüentes.

A freqüência de alterações envolvendo o cromossomo 17 (-17/17p-) encontrada (16% do total de pacientes com alteração citogenética ou 6,5% (4/61) do total de pacientes com SMD) foi bem superior as descritas por HAASE et al. (2007) e BERNASCONI (2008), que relataram freqüências em torno de 5% (do total de pacientes com alteração citogenética) e 1,2% (do total de pacientes com SMD), respectivamente.

Dentre os pacientes que apresentaram alterações envolvendo o cromossomo 17, o paciente 55 foi relatado como o primeiro caso de SMD com deleção 17p isolada secundária ao uso de azatioprina, demonstrando a toxicidade desta droga com o uso de longo prazo (HEREDIA et al. 2010). Azatioprina tem sido relacionada à indução de falhas no mecanismo de reparo do DNA, podendo promover uma pressão seletiva, facilitando a expansão dos clones alterados e contribuindo para o desenvolvimento da SMD secundária (OFFMAN et al. 2004; LEONE et al. 2007).

Dentre todas as alterações encontradas em SMD, deleções do braço longo do cromossomo 5 são as alterações citogenéticas mais freqüentes (HIRAI 2003; HAASE 2008). No estudo alemão-austríaco, HAASE et al.

(2007) encontraram del(5q) em 30% dos casos com cariótipo alterado, e deleção 5q isolada foi observada em 14% dos pacientes com cariótipo alterado. No estudo brasileiro, ROMEO et al. (2002) observaram 33,3% (4/12) de deleção da região 5q e 16,7% (2/12) de deleção 5q isolada, entre os pacientes com alteração citogenética.

Nossos dados comprovam a prevalência de alterações envolvendo o braço longo do cromossomo 5 (44%). No entanto, tanto a frequência de alterações envolvendo del(5q) quanto a deleção 5q isolada (24%) foram superiores as encontradas na literatura.

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

A hibridização *in situ* por fluorescência (FISH), caracterizada pelo anelamento de uma fita simples de DNA à uma seqüência de DNA complementar, detecta alteração cromossômica específica tanto em interfases quanto em metáfases, o que permitiu avaliar a presença de amplificação dos genes *AURKA* e *AURKB*, mesmo quando presentes em baixas frequências (clones pequenos).

Valores de normalidade variam de acordo com o tecido e gene estudados. Em nosso estudo os valores de normalidade encontrados para

amplificação de *AURKA* e *AURKB* foram < 4%. Trabalhos utilizando a técnica de FISH para investigar a amplificação desses genes em tecido hematopoético são escassos e não caracterizam o seu limiar de normalidade para amplificação.

Identificamos 4 casos (6, 32, 35 e 37) com amplificação de *AURKA* e 2 casos (11 e 56) com amplificação de *AURKB*. Em todos os casos, a frequência de amplificação variou entre 4% e 4,5%, e exceto pelo caso 37, apresentaram cariótipo normal.

Não conseguimos demonstrar associação entre amplificação destes genes e alterações cromossômicas como já descrito por alguns pesquisadores em outras neoplasias (SEN et al. 2002; PARK et al. 2008; LASSMANN et al. 2009; LUCENA-ARAUJO et al. 2011).

Amplificação da região 20q está associada com subtipos clinicamente mais agressivos de tumores (SEN et al. 2002; PARK et al. 2008; VEERAKUMARASIVAM et al. 2008; LASSMANN et al. 2009). Em diferentes tipos de tumores foi observada tanto amplificação quanto superexpressão de *AURKA* (SEN et al. 2002; ROJANALA et al. 2004; VEERAKUMARASIVAM et al. 2008; LASSMANN et al. 2009), no entanto, alguns trabalhos demonstram superexpressão de *AURKA* sem amplificação (SAKAKURA et al. 2001; SEN et al. 2002; GRITSKO et al. 2003; JENG et al. 2004; CAMACHO et al. 2006), sugerindo que a expressão de *AURKA* é influenciada não apenas pela amplificação gênica, e que alterações nos mecanismos transcricionais e pós-translacionais também podem contribuir para o aumento de expressão.

No que se refere à amplificação de *AURKB*, poucos são os trabalhos na literatura que investigaram a amplificação desse gene. A maioria relaciona apenas a superexpressão gênica e protéica com a agressividade tumoral (SORRENTINO et al. 2005; VISCHIONI et al. 2006; IKEZOE et al. 2009; LIN et al. 2010).

Na população estudada, observa-se que dentre os indicadores prognósticos utilizados pelo IPSS e WPSS, número de citopenias e dependência transfusional encontram-se desfavoráveis (mostram-se mais acentuados) nos casos com amplificação de *AURKA*. Todos os casos apresentam dependência transfusional (Hb: 2,6-7,4 g/dL), e 3/4 casos possuíam 2/3 citopenias (Hb: 2,6-7,0 g/dL; Neu: 195-1215/mm³ e Plaq.: 22.000-41.000/mm³). Em contrapartida, ambos os casos com amplificação de *AURKB* não mostraram dependência transfusional e apresentavam apenas 1 citopenia (Hb: 9,7g/dL e 10,3g/dL).

A expressão relativa de *AURKA* entre os casos com amplificação e o grupo controle, formado por 04 pacientes sadios, foi significativamente diferente ($p=0,038$). A comparação entre as médias de expressão dos dois grupos mostrou uma expressão 2,8 vezes maior no grupo com amplificação. Se analisado separadamente, o caso 37 (com aneuploidia) apresentou-se 3,3 vezes mais expresso em relação ao grupo controle. A relação entre amplificação e aumento na expressão gênica de *AURKA* é citada por LASSMANN et al. (2009) como primordial para diferenciar a superexpressão relacionada à progressão tumoral da superexpressão decorrente de

aumento na proliferação celular, uma vez que a função de AURKA está intimamente associada ao ciclo celular.

LASSMANN et al. (2009) demonstraram que a superexpressão de AURKA acompanhada da amplificação do gene está associada à instabilidade cromossômica em câncer colorectal esporádico, ao contrário da superexpressão observada nos tumores decorrentes de instabilidade microssatélite, que é simplesmente um reflexo do alto índice proliferativo tumoral.

CAMACHO et al. (2006), em estudo com linfoma do Manto, observaram que os níveis de expressão de AURKA encontravam-se principalmente relacionados ao grau de proliferação do tumor, sugerindo que elevados níveis de expressão de AURKA em linfomas altamente proliferativos pode não ser uma alteração oncogênica mas uma consequência do aumento proliferativo.

É concebível que a superexpressão protéica possa resultar não só do aumento do número de genes secundário à amplificação do gene, mas também como resultado do concomitante aumento do número de cromossomos, ou seja, da polissomia (VARSHNEY et al. 2004).

Analisando os casos com polissomia, foram identificados 2 pacientes (30 e 44) com polissomia do cromossomo 20 e 2 casos (35 e 55) com polissomia do cromossomo 17. Tanto o caso 44 quanto o caso 55 apresentaram múltiplos sinais (> 6 sinais por células) em aproximadamente 12% e 17% das células, respectivamente.

Apesar de alguns autores (SEN et al. 2002; VARSHNEY et al. 2004; HYUN et al. 2008; KRISHNAMURTI et al. 2009) relatarem aumento de expressão gênica decorrente de polissomia, o aumento no número de sinais encontrados nesses dois casos não se refletiu no aumento de expressão, quando os mesmos foram comparados à média de expressão do grupo controle; nem no grau (número de cópias a mais) da aneuploidia observada na banda G.

Alterações de expressão de proteínas envolvidas na segregação cromossômica (proteínas associadas ao cromossomo) e no fuso mitótico têm sido associadas com o desenvolvimento de aneuploidia em células tumorais (MICHEL et al. 2001; SAKAKURA et al. 2001; MONDAL et al. 2007; SOTILLO et al. 2007; PINTO et al. 2007; LI et al. 2009).

A família das aurora quinases está envolvida no complexo centrossomal (AURKA) e no complexo de proteínas associadas ao cromossomo (AURKB). Durante a proliferação celular normal, centrossomos asseguram a correta segregação dos cromossomos através da organização do fuso mitótico bipolar. AURKA está relacionada à regulação da separação e maturação do centrossomo (LI et al. 2003; TONG et al. 2004; LUKASIEWICZ e LINGLE 2009). AURKB, juntamente com survivina e proteínas internas do centrômero (complexo de proteínas associadas ao cromossomo) desempenha papel crucial no alinhamento e biorientação dos cromossomos, ativação do ponto de checagem mitótico; e na citocinese (DUCAT e ZHENG 2004; VAGNARELLI e EARNSHAW 2004; BOLANOS-GARCIA 2005).

Adicionalmente, o ponto de checagem do fuso mitótico detecta falhas na estrutura do fuso ou no alinhamento dos cromossomos, e inibe a segregação cromossômica e a progressão do ciclo até o erro ser corrigido. Os cinetócoros, os quais interagem tanto com os cromossomos quanto com os microtúbulos, desempenham um importante papel na sinalização do ponto de checagem (SUDAKIN et al. 2001; ACQUAVIVA e PINES 2006; MUSACCHIO e SALMON 2007). A maioria das proteínas associadas ao funcionamento do ponto de checagem está localizada nos cinetócoros. Várias evidências indicam MAD2 como componente chave do ponto de checagem. Ademais, MAD2 interage diretamente com CDC20 e inibe o Complexo Promotor de Anáfase (CPA).

Diversos são os trabalhos que relatam alterações na expressão gênica e protéica em *AURKA* e *AURKB* associadas à instabilidade cromossômica, agressividade dos tumores e pior prognóstico dos pacientes (LASSMANN et al. 2009; IKEZOE et al. 2009; LIN et al. 2010; LOH et al. 2010; LUCENA-ARAUJO et al. 2011). Desregulação de componentes do ponto de checagem mitótico MAD2 e CDC20 têm sido associadas à instabilidade cromossômica (WANG et al. 2000; JEONG et al. 2004; MONDAL et al. 2007; ZHANG et al. 2008; WANG et al. 2009; JIANG et al. 2011; ZARAVINOS et al. 2011).

Nosso estudo observou que os pacientes com SMD apresentaram maior expressão dos genes *CDC20* e *MAD2L1* quando comparados a indivíduos saudáveis para todas as variáveis analisadas (celularidade, número de citopenias, dependência transfusional, citogenética, classificação OMS,

índice prognóstico IPSS). Ademais, a celularidade apresentou diferença significativa entre os grupos de pacientes para todos os genes analisados (*AURKA*, *AURKB*, *CDC20* e *MAD2L1*), sendo os grupos hiper celular e normocelular significativamente mais expressos que o grupo hipocelular.

Alguns pesquisadores demonstraram que o aumento de expressão desses genes está muito mais relacionadas ao caráter proliferativo do que ao processo neoplásico do tumor (CAMACHO et al. 2006; ZHANG et al. 2008; LASSMANN et al. 2009; WANG et al. 2009).

Em estudo com linfoma do Manto, CAMACHO et al. (2006) relacionaram a superexpressão de *AURKA* ao elevado índice proliferativo do tumor. Da mesma forma, LASSMANN et al. (2009) demonstraram que a superexpressão de *AURKA* era uma consequência do alto índice proliferativo do câncer coloretal esporádico decorrente de instabilidade microssatélite.

ZHANG et al. (2008) correlacionaram a superexpressão de *MAD2* em carcinoma hepatocelular com os altos índices da proteína Ki-67, marcador de proliferação celular. Assim como WANG et al. (2009), em estudo com câncer gástrico, concluíram que o aumento de *MAD2* e sua localização, tanto no citoplasma quanto no núcleo, podem estar relacionadas com a elevada expressão dessa proteína em alguns tecidos altamente proliferativos.

Baixos níveis de expressão têm sido detectados na maioria dos tecidos normais com baixa proliferação, enquanto que tecidos com alto índice proliferativo, como timo e fígado fetal, apresentam elevados níveis de

expressão, indicando a intrínseca relação entre a expressão desses genes e a proliferação celular (CAMACHO et al. 2006).

No entanto, se a superexpressão destes genes fosse apenas relacionada à proliferação celular (e conseqüente medula hiper celular) como explicar que também encontramos diferenças significativas nos casos de medula normocelular? Há situações em que o aumento da expressão é até maior em casos de medula normocelular em relação à hiper celular (apesar de não haver diferença significativa entre os casos NORMO X HIPER).

AURKA, por exemplo, interage com várias proteínas chaves reguladoras do ciclo celular, incluindo p53. AURKA inativa p53 através da fosforilação da região Ser315, proporcionando sua degradação via mdm2. Além disso, AURKA ativa o fator nuclear κ B (NF- κ B) através da fosforilação do seu inibidor I κ B, e por sua vez, NF- κ B promove a expressão de Bcl-2. Desta forma, AURKA, quando anormalmente expresso, ativa indiretamente a expressão de Bcl-2 (proteína anti-apoptótica) via NF- κ B e mascara o caráter supressor de p53, propiciando uma pressão seletiva em favor dos clones alterados. Assim, a superexpressão de AURKA refletiria a característica neoplásica do tumor e não apenas seria uma conseqüência do aumento da proliferação celular.

Recentemente, em um estudo com 70 casos de LMA de novo LUCENA-ARAUJO et al. (2011) mostraram associação entre níveis elevados de leucócitos ($WBC >3 \times 10^4/mm^3$), superexpressão de *AURKA* e presença de alterações citogenéticas desfavoráveis. Os pesquisadores também avaliaram a presença de amplificação de *AURKA* e *AURKB* em nove casos,

sendo encontrada amplificação em 3/9. Apesar do reduzido número de casos com amplificação para uma análise mais precisa, os três pacientes com amplificação apresentavam cariótipo desfavorável.

LORAND-METZE et al. (2004) observaram que entre o grupo de pacientes portadores de SMD com cariótipo normal e pertencentes aos grupos de baixo risco e risco intermediário 1, a celularidade medular apresentou significado prognóstico. Pacientes com medula hipercelular apresentam pior sobrevida quando comparados à pacientes com medula normo ou hipocelular.

A SMD variante hipocelular é uma entidade que possui fisiopatologia diferente dos casos de SMD com medula normocelular e hipercelular. Estes pacientes costumam apresentar uma maior incidência de fenômenos autoimunes como fator anti-núcleo positivo, Coombs direto positivo e manifestações clínicas como vasculite e pioderma gangrenoso (PINHEIRO et al. 2009). Nos anos 90, MOLLDREM et al. (1998), demonstraram que estes pacientes apresentavam resposta significativa ao tratamento com globulina anti-timocítica e imunossupressores como ciclosporina. Mais tarde, o mesmo grupo demonstrou que, nos casos de SMD HIPO, há expansão clonal de linfócito T CD8+ após contato com um antígeno do clone da SMD. A ativação de CD8+ leva ao aumento da secreção de fator de necrose tumoral (TNF- α) e Interferon gama que são responsáveis pela indução de apoptose das células do próprio clone da SMD e bloqueio de células CD34+ não clonais respectivamente (MOLLDREM et al. 2005).

Segundo VASSALLO e MAGALHÃES (2009) a forma hipocelular da SMD está associada a algumas características: subtipo AR, menor probabilidade de evolução para leucemia aguda, citopenias mais severas, provável hiper-regulação de genes relacionados à inflamação nas células CD34+, o que torna essa variante mais responsiva a terapias imunossupressoras.

Como a SMD hipocelular parece ser uma entidade diferente do ponto de vista de patogênese, pode ser que a baixa expressão de *AURKA*, *AURKB*, *CDC20* e *MAD2L1* encontradas neste trabalho reflita esta diferença.

É importante mencionar que apesar da elevada sensibilidade e especificidade das técnicas utilizadas, nosso estudo apresentou algumas limitações. Dentre elas, podemos citar o baixo número de casos (8/43) com alterações citogenéticas de prognóstico desfavorável e o baixo número de pacientes de alto risco (6/40), tornando a população estudada prevalentemente (85%) de baixo risco e risco intermediário 1. Também foi observada ampla variação de expressão gênica entre os pacientes do mesmo grupo, o que pode ser reflexo da heterogeneidade intrínseca da doença e da diversidade de mecanismos patogênicos envolvidos.

Informações a respeito do perfil de expressão desses genes são escassos em neoplasias hematológicas e ausentes em SMD, o que dificulta uma análise mais profunda dos resultados encontrados.

6 CONCLUSÃO

Do presente estudo pode-se concluir que:

1. A frequência de medula hipocelular (28%) e de alterações citogenéticas com deleção 5q isolada (24%) observadas nesse estudo foram superiores ao descrito na literatura internacional. Esses resultados podem ser um reflexo da variação genética entre as populações estudadas.
2. Os resultados apresentados pelos pacientes com amplificação gênica, a partir da análise por FISH, nos permitem concluir que, em aproximadamente 10% (4/41) dos pacientes portadores de SMD, a superexpressão de *AURKA* pode estar relacionada ao processo de tumorigênese da doença.
3. Os resultados de expressão gênica de *AURKB* não demonstraram valor prognóstico em pacientes com SMD como demonstrado em outros tumores.
4. A baixa expressão dos genes *AURKA*, *AURKB*, *CDC20* e *MAD2L1* apresentados pelo grupo hipocelular quando comparados aos demais grupos (normocelular e hipercelular) sugere que a SMD variante hipocelular pode ser uma entidade com características e patogênese distintas dos demais subtipos de SMD.

5. A maior expressão dos genes *CDC20* e *MAD2L1* quando comparados a indivíduos saudáveis, para todas as variáveis analisadas (celularidade, número de citopenias, dependência transfusional, citogenética, classificação OMS, índice prognóstico IPSS) sugere que a desregulação desses genes pode estar envolvida nos mecanismos de patogenicidade da SMD.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Acquaviva C, Pines J. The anaphase-promoting complex/cyclosome: APC/C. **J Cell Sci** 2006; 119:2401-04.

Aggarwal S, van de Loosdrecht AA, Alhan C, Ossenkuppele GJ, Westers TM, Bontkes HJ. Role of immune responses in the pathogenesis of low-risk MDS and high-risk MDS: implications for immunotherapy. **Br J Haematol** 2011; 153:568-81.

Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Watson P. **Molecular biology of the cell**. 5th ed. New York: Garland Science; 2008. The cell cycle; p.1053-114.

Anand S, Penrhyn-Lowe S, Venkitaraman AR. AURORA-A amplification overrides the mitotic spindle assembly checkpoint, inducing resistance to Taxol. **Cancer Cell** 2003; 3:51-62.

Ayton PM, Cleary ML. Transformation of myeloid progenitors by MLL oncoproteins is dependent on Hoxa7 and Hoxa9. **Genes Dev** 2003; 17:2298-307.

Bejar R, Levine R, Ebert BL. Unraveling the molecular pathophysiology of myelodysplastic syndromes. **J Clin Oncol** 2011; 29:504-15.

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

Bernasconi P. Molecular pathways in myelodysplastic syndromes and acute myeloid leukemia: relationships and distinctions – a review. **Br J Haematol** 2008; 142:695-708.

Bolanos-Garcia VM. Aurora kinases. **Int J Biochem Cell Biol** 2005; 37:1572-7.

Braunstein I, Miniowitz S, Moshe Y, Hershko A. Inhibitory factors associated with anaphase-promoting complex/cylosome in mitotic checkpoint. **Proc Natl Acad Sci USA** 2007; 104:4870-75.

Briassouli P, Chan F, Savage K, Reis-Filho JS, Linardopoulos S. Aurora-A regulation of nuclear factor-kappa B signaling by phosphorylation of I κ B α . **Cancer Res** 2007; 67:1689-95.

Brito DA, Rieder CL. Mitotic checkpoint slippage in humans occurs via cyclin B destruction in the presence of an active checkpoint. **Curr Biol** 2006; 16:1194-200.

Burum-Auensen E, Skotheim RI, Schjølberg AR, Røislien J, Lothe RA, Clausen OP. Spindle proteins are differentially expressed in the various histological subtypes of testicular germ cell tumors. **J Carcinog** 2010; 9:1.

Camacho E, Beà S, Salaverría I, et al. Analysis of Aurora-A and hMPS1 mitotic kinases in mantle cell lymphoma. **Int J Cancer** 2006; 118:357-63.

Careta FP, Gobessi S, Panepucci RA, et al. The Aurora A and B kinases are upregulated in bone marrow-derived chronic lymphocytic leukemia cells and represent potential therapeutical targets. **Rev Bras Hematol Hemoter** 2011; 33:136-7.

Carmena M, Ruchaud S, Earnshaw WC. Making the Auroras glow: regulation of Aurora A and B kinase function by interacting proteins. **Curr Opin Cell Biol** 2009; 21:796-805.

Carneiro FF, Almeida VES. Brasil é o país que mais usa agrotóxico no mundo [periódico on line]. **J Agrosoft** 01 jul 2010. Disponível em: <URL:<http://www.agrosoft.org.br/agropag/214789.htm>> [2011 nov 07].

Catenacci DV, Schiller GJ. Myelodysplastic syndromes: a comprehensive review. **Blood Rev** 2005; 19:301-19.

Chamuleau ME, Westers TM, van Dreunen L, et al. Immune mediated autologous cytotoxicity against hematopoietic precursor cells in patients with myelodysplastic syndrome. **Haematologica** 2009; 94:496-506.

Chan AC, Neeson P, Leeansyah E, et al. Testing the NKT cell hypothesis in lenolidomide-treated myelodysplastic syndrome patients. **Leukemia** 2010; 24:592-600.

Chauffaille MLLF, Yamamoto M, Moncau JE, Braga GW, Souto EX, Kerbauy J. Cytogenetic abnormalities as prognostic factors in acute myeloid leukemia. **Rev Assoc Med Bras** 1996; 42:200-4.

Chen B, Zhao WL, Jin J, et al. Clinical and cytogenetic features of 508 Chinese patients with myelodysplastic syndrome and comparison with those in Western countries. **Leukemia** 2005; 19:767-75.

Chen RH, Waters JC, Salmon ED, Murray AW. Association of spindle assembly checkpoint component X MAD2 with unattached kinetochores. **Science** 1996; 274:242-46.

Clute P, Pines J. Temporal and spatial control of cyclin B1 destruction in metaphase. **Nat Cell Biol** 1999; 1:82-7.

Cordoba I, Gonzalez-Porras JR, Such E, et al. The degree of neutropenia has a prognostic impact in low risk myelodysplastic syndromes. **Leuk Res** 2012; 36:287-92.

Dakshinamurthy AG, Novitzky N, Bharadwaj R, Prakhya BM. Cytogenetic analysis of 52 Indian patients with de novo myelodysplastic syndromes-a comparative analysis of results with reports from Asia. **Ann Hematol** 2005; 84:298-303.

Davidson AJ, Ernst P, Wang Y, et al. Cdx4 mutants fail to specify blood progenitors and can be rescued by multiple hox genes. **Nature** 2003; 425:300-6.

Dayyani F, Conley AP, Strom SS, et al. Cause of death in patients with lower-risk myelodysplastic syndrome. **Cancer** 2012; 2174-79.

Della Porta MG, Malcovati L, Boveri E, et al. Clinical relevance of bone marrow fibrosis and CD34-positive cell clusters in primary myelodysplastic syndromes. **J Clin Oncol** 2009; 27:754-62.

Dewar H, Tanaka K, Nasmyth K, et al. Tension between two kinetochores suffices for their bi-orientation on the mitotic spindle. **Nature** 2004; 428:93-7.

Díaz-Rodríguez E, Álvarez-Fernández S, Chen X, et al. Deficient spindle assembly checkpoint in multiple myeloma. **PLoS One** 2011; 6:e27583.

Disperati P, Ichim CV, Tkachuk D, Chun K, Schuh AC, Wells RA. Progression of myelodysplasia to acute lymphoblastic leukaemia: implications for disease biology. **Leuk Res** 2006; 30:233-39.

Dobles M, Liberal V, Scott ML, et al. Chromosome missegregation and apoptosis in mice lacking the mitotic checkpoint protein Mad2. **Cell** 2000; 101:635-45.

Ducat D, Zheng Y. Aurora kinases in spindle assembly and chromosome segregation. **Exp Cell Res** 2004; 301:60-7.

Dutertre S, Prigent C. Aurora-A overexpression leads to override of the microtubule-kinetochore attachment checkpoint. **Mol Interv** 2003; 3:127-30.

Enjoji M, Iida S, Sugita H, et al. BubR1 and AURKB overexpression are associated with a favorable prognosis in gastric cancer. **Mol Med Report** 2009; 2:589-96.

Epling-Burnette PK, Bai F, Painter JS, et al. Reduced natural killer (NK) function associated with high-risk myelodysplastic syndrome (MDS) and reduced expression of activating NK receptors. **Blood** 2007; 109:4816-24.

Fang G, Yu H, Kirschner MW. The checkpoint protein MAD2 and the mitotic regulator CDC20 form a ternary complex with the anaphase-promoting complex to control anaphase initiation. **Genes Dev** 1998; 12:1871-83.

Fang G, Yu H, Kirschner MW. Control of mitotic transitions by the anaphase-promoting complex. **Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci** 1999; 354:1583-90.

Farruggio DC, Townsley FM, Ruderman JV. Cdc20 associates with the kinase aurora2/Aik. **Proc Natl Acad Sci USA** 1999; 96:7306-11.

Germing U, Strupp C, Kündgen A, et al. No increase in age-specific incidence of myelodysplastic syndromes. **Haematologica** 2004; 89:905-10.

Germing U, Aul C, Niemeyer CM, Haas R, Bennett JM. Epidemiology, classification and prognosis of adults and children with myelodysplastic syndromes. **Ann Haematol** 2008; 87:691-9.

Greenberg P, Cox C, LeBeau MM, et al. International scoring system for evaluating prognosis in myelodysplastic syndromes. **Blood** 1997; 89:2079-88.

Gritsko TM, Coppola D, Paciga JE, et al. Activation and overexpression of centrosome kinase BTAK/Aurora-A in human ovarian cancer. **Clin Cancer Res** 2003; 9:1420-6.

Haase D, Germing U, Schanz J, et al. New insights into the prognostic impact of the karyotype in MDS and correlation with subtypes: evidence from a core dataset of 2124 patients. **Blood** 2007; 110:4385-95.

Haase D. Cytogenetic features in myelodysplastic syndromes. **Ann Hematol** 2008; 87:515-26.

Hagting A, Den Elzen N, Vodermaier HC, et al. Human securin proteolysis is controlled by the spindle checkpoint and reveals when the APC/C switches from activation by Cdc20 to Cdh1. **J Cell Biol** 2002; 157:1125-37.

Hamada M, Yakushijin Y, Ohtsuka M, Kakimoto M, Yasukawa M, Fujita S. Aurora2/BTAK/STK15 is involved in cell cycle checkpoint and cell survival of aggressive non-Hodgkin's lymphoma. **Br J Haematol** 2003; 121:439-47.

Heckman CA, Mehew JW, Boxer LM. NF-kappaB activates Bcl-2 expression in t(14;18) lymphoma cells. **Oncogene** 2002; 21:3898-908.

Heredia F, Sousa J, Magalhães S, Pinheiro R. Therapy-related myelodysplastic syndrome with 17p deletion following long-term azathioprine treatment. **Leuk Res** 2010; 34:e311-2.

Hirai H. Molecular mechanisms of myelodysplastic syndrome. **Jpn J Clin Oncol** 2003; 33:153-60.

Huang XF, Luo SK, Xu J, et al. Aurora kinase inhibitory VX-680 increases Bax/Bcl-2 ratio and induces apoptosis in Aurora-A-high acute myeloid leukemia. **Blood** 2008; 111:2854-65.

Hyun CL, Lee HE, Kim KS, et al. The effect of chromosome 17 polysomy on HER-2/neu status in breast cancer. **J Clin Pathol** 2008; 61:317-21.

[IBGE] Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Censo agropecuário 2006: resultados preliminares**. 2007. Disponível em: <URL:http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/economia/agropecuaria/censoagro/2006/tabela1_3_10.pdf> [2011 dez 12].

[IBGE] Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Projeção da população**. Disponível em: <URL:http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/populacao/projecao_da_populacao/2008/piramide/piramide.shtm> [2011 nov 07].

Ikezoe T, Yang J, Nishioka C, et al. A novel treatment strategy targeting Aurora kinases in acute myelogenous leukemia. **Mol Cancer Ther** 2007; 6:1851-57.

Ikezoe T, Takeuchi T, Yang J, et al. Analysis of Aurora B kinase in non-Hodgkin lymphoma. **Lab Invest** 2009; 89:1364-73.

Intragumtornchai T, Prayoonwiwat W, Swasdikul D, et al. Myelodysplastic syndromes in Thailand: a retrospective pathologic and clinical analysis of 117 cases. **Leuk Res** 1998; 22:453-60.

Ishibashi M, Tamura H, Ogata K. Disease progression mechanism in myelodysplastic syndromes: insight into the role of the microenvironment. **Leuk Res** 2011; 35:1449-52.

Jaffe ES, Harris NL, Stein H, et al. **WHO classification of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues**. Lyon: IARC Press; 2001. (IARC WHO Classification of Tumours, n.2).

Jeng YM, Peng SY, Lin CY, Hsu HC. Overexpression and amplification of Aurora-A in hepatocellular carcinoma. **Clin Cancer Res** 2004; 10:2065-71.

Jeong SJ, Shin HJ, Kim SJ, et al. Transcriptional abnormality of the hsMAD2 mitotic checkpoint gene is a potential link to hepatocellular carcinogenesis. **Cancer Res** 2004; 64:8666-73.

Jiang J, Jedinak A, Sliva D. Ganodermanontriol (GDNT) exerts its effect on growth and invasiveness of breast cancer cells through the down-regulation of CDC20 and uPA. **Biochem Biophys Res Commun** 2011; 415:325-9.

Ke YW, Dou Z, Zhang J, Yao XB. Function and regulation of Aurora/Ipl1p kinase family in cell division. **Cell Res** 2003; 13:69-81.

Kim JM, Sohn HY, Yoon SY, et al. Identification of gastric cancer-related genes using a cDNA microarray containing novel expressed sequence tags expressed gastric cancer cells. **Clin Cancer Res** 2005; 11:473-82.

Kitagawa M, Kamiyama R, Kasuga T. Increase in number of bone marrow macrophages in patients with myelodysplastic syndromes. **Eur J Haematol** 1993; 51:56-8.

Kita-Sasai Y, Horiike S, Misawa S, et al. International prognostic scoring system and TP53 mutations are independent prognostic indicators for patients with myelodysplastic syndrome. **Br J Haematol** 2001; 115:309-12.

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

Kordasti SY, Afzali B, Lim Z, et al. IL-17 producing CD4(+) T cells, pro-inflammatory cytokines and apoptosis are increased in low risk myelodysplastic syndrome. **Br J Haematol** 2009; 145:64-72.

Kotsianidis I, Bouchliou I, Nakou E, et al. Kinetics, function and bone marrow trafficking of CD4+CD25+FOXP3+ regulatory T cells in myelodysplastic syndromes (MDS). **Leukemia** 2009; 23:510-8.

Krishnamurti U, Hammers JL, Atem FD, et al. Poor prognostic significance of unamplified chromosome 17 polysomy in invasive breast carcinoma. **Mod Pathol** 2009; 22:1044-48.

Lad L, Lichtsteiner S, Hartman JJ, Wood KW, Sakowicz R. Kinetic analysis of Mad2-Cdc20 formation: conformational changes in Mad2 are catalyzed by a C-Mad2-ligand complex. **Biochemistry** 2009; 48:9503-15.

Lassmann S, Danciu M, Müller M, et al. Aurora A is differentially expressed and regulated in chromosomal and microsatellite instable sporadic colorectal cancers. **Mod Pathol** 2009; 22:1385-97.

Lee JJ, Kim HJ, Chung IJ, et al. Comparisons of prognostic scoring systems for myelodysplastic syndromes: a Korean multicenter study. **Leuk Res** 1999; 23:425-32.

Leone G, Pagano L, Ben-Yehuda D, Voso MT. Therapy-related leukemia and myelodysplasia: susceptibility and incidence. **Haematologica** 2007; 92:1389-98.

Li D, Zhu J, Firozi PF, et al. Overexpression of oncogenic STK15/BTAK/Aurora A kinase in human pancreatic cancer. **Clin Cancer Res** 2003; 9:991-7.

Li GQ, Zhang HF. Mad2 and p27 expression profiles in colorectal cancer and its clinical significance. **World J Gastroenterol** 2004; 10:3218-20.

Li M, Fang X, Wei Z, et al. Loss of spindle assembly checkpoint-mediated inhibition of Cdc20 promotes tumorigenesis in mice. **J Cell Biol** 2009; 185:983-94.

Li Y, Benezra R. Identification of a human mitotic checkpoint gene: hsMAD2. **Science** 1996; 274:246-8.

Li Y, Gorbea C, Mahaffey D, Rechsteiner M, Benezra R. MAD2 associates with the cyclosome/anaphase-promoting complex and inhibits its activity. **Proc Natl Acad Sci USA** 1997; 94:12431-6.

Lima DS, Cordeiro J, Magalhães SM, Pinheiro RF. Interphase-FISH provides additional relevant information in myelodysplastic syndromes. **Leuk Res** 2012; 36:12-4.

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

Littlepage LE, Ruderman JV. Identification of a new APC/C recognition domain, the A box, which is required for the Cdh1-dependent destruction of the kinase Aurora-A during mitotic exit. **Genes Dev** 2002; 16:2274-85.

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

Loh JK, Lieu AS, Chou CH, et al. Differential expression of centrosomal proteins at different stages of human glioma. **BMC Cancer** 2010; 10:268.

Look AT. Molecular pathogenesis of MDS. **Hematology Am Soc Hematol Educ Program** 2005:156-60.

Lorand-Metze I, Pinheiro MP, Ribeiro E, de Paula EV, Metze K. Factors influencing survival in myelodysplastic syndromes in a Brazilian population: comparison of FAB and WHO classifications. **Leuk Res** 2004; 28:587-94.

Lucena-Araujo AR, de Oliveira FM, Leite-Cueva SD, dos Santos GA, Falcao RP, Rego EM. High expression of AURKA and AURKB is associated with unfavorable cytogenetic abnormalities and high white blood cell count in patients with acute myeloid leukemia. **Leuk Res** 2011; 35:260-4.

Lukasiewicz KB, Lingle WL. Aurora A, centrosome structure, and the centrosome cycle. **Environ Mol Mutagen** 2009; 50:602-19.

Ma L, Ceuppens J, Kasran A, Delforge M, Boogaerts M, Vandenberghe P. Immature and mature monocyte-derived dendritic cells in myelodysplastic syndromes of subtypes refractory anemia or refractory anemia with ringed sideroblasts display an altered cytokine profile. **Leuk Res** 2007; 31:1373-82.

Ma X, Does M, Raza A, Mayne ST. Myelodysplastic syndromes: incidence and survival in the United States. **Cancer** 2007; 109:1536-42.

Magalhães SMM, Lorand-Metze I. Síndromes mielodisplásicas – protocolo de exclusão. **Rev Bras Hematol Hemoter** 2004; 26:263-7.

Magalhães SMM, Madeira TS, Bittencourt R, et al. Epidemiological and clinicopathological data from the Brazilian registry of patients with myelodysplastic syndromes and comparative analysis between different geographic areas. **Blood** 2010; 116: abstract 1884.

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

Malcovati L, Della Porta MG, Strupp C, et al. Impact of the degree of anemia on the outcome of patients with myelodysplastic syndrome and its integration into the WHO classification-based Prognostic Scoring System (WPSS). **Haematologica** 2011; 96:1433-40.

Marucci G, Morandi L, Magrini E, et al. Gene expression profiling in glioblastoma and immunohistochemical evaluation of IGFBP-2 and CDC20. **Virchows Arch** 2008; 453:599-609.

Meraldi P, Honda R, Nigg EA. Aurora-A overexpression reveals tetraploidization as a major route to centrosome amplification in p53^{-/-} cells. **EMBO J** 2002; 21:483-92.

Michel L, Bezerra R, Diaz-Rodriguez E. MAD2 dependent mitotic checkpoint defects in tumorigenesis and tumor cell death: a double edged sword. **Cell Cycle** 2004a; 3:990-2.

Michel L, Diaz-Rodriguez E, Narayan G, Hernando E, Murty VV, Benezra R. Complete loss of the tumor suppressor MAD2 causes premature cyclin B degradation and mitotic failure in human somatic cells. **Proc Natl Acad Sci USA** 2004b; 101:4459-64.

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

Micheva I, Thanopoulou E, Michalopoulou S, et al. Defective tumor necrosis factor alpha-induced maturation of monocyte-derived dendritic cells in patients with myelodysplastic syndromes. **Clin Immunol** 2004; 113:310-7.

Molldrem JJ, Jiang YZ, Stetler-Stevenson M, Mavroudis D, Hensel N, Barrett AJ. Haematological response of patients with myelodysplastic syndrome to antithymocyte globulin is associated with a loss of lymphocyte-mediated inhibition of CFU-GM and alterations in T-cell receptor Vbeta profiles. **Br J Haematol** 1998; 102:1314-22.

Molldrem JJ, Akande O, Estey E, et al. Immunossuppressive therapy with ATG in low risk patients with myelodysplastic syndrome [abstract]. **Leuk Res** 2005; 29(Suppl 1):S12-3. Presented at the 8th International Symposium on Myelodysplastic Syndromes, May, 12-15, 2005, Nagasaki, Japan.

Mondal G, Sengupta S, Panda CK, Gollin SM, Saunders WS, Roychoudhury S. Overexpression of Cdc20 leads to impairment of the spindle assembly checkpoint and aneuploidization in oral câncer. **Carcinogenesis** 2007; 28:81-92.

Murata-Hori M, Tatsuka M, Wang YL. Probing the dynamics and functions of Aurora B kinase in living cells during mitosis and cytokinesis. **Mol Biol Cell** 2002; 13:1099-108.

Musacchio A, Salmon ED. The spindle-assembly checkpoint in space and time. **Nat Rev Mol Cell Biol** 2007; 8:379-93.

Mutfi GJ. Pathobiology, classification, and diagnosis of myelodysplastic syndrome. **Best Pract Res Clin Haematol** 2004; 17:543-57.

Nigg EA. Cell biology: a licence for duplication. **Nature** 2006; 442:874-5.

Nigg EA. Centrosome duplication: of rules and licenses. **Trends Cell Biol** 2007; 17:215-21.

Nimer SD. An update on the molecular pathogenesis of myelodysplastic syndromes. **Biol Blood Marrow Transplant** 2011; 17:S11-4.

Nisse C, Haguenoer JM, Grandbastien B, et al. Occupational and environmental risk factors of the myelodysplastic syndromes in the North of France. **Br J Haematol** 2001; 112:927-35.

Offman J, Opelz G, Doehler B, et al. Defective DNA mismatch repair in acute myeloid leukemia/myelodysplastic syndrome after organ transplantation. **Blood** 2004; 104:822-8.

Oguma S, Yoshida Y, Uchino H, Maekawa T, Nomura T, Mizoguchi H. Clinical characteristics of Japanese patients with primary myelodysplastic syndromes: a cooperative study based on 838 cases. Anemia Study Group of the Ministry of Health and Welfare. **Leuk Res** 1995; 19:219-25.

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

Ouellet V, Guyot MC, Le Page C, et al. Tissue array analysis of expression microarray candidates identifies markers associated with tumor grade and outcome in serous epithelial ovarian cancer. **Int J Cancer** 2006; 119:599-607.

Park HS, Park WS, Bondaruk J, et al. Quantitation of Aurora kinase A gene copy number in urine sediments and bladder cancer detection. **J Natl Cancer Inst** 2008; 100:1401-11.

Patra D, Dunphy WG. Xe-p9, a *Xenopus* Suc1/Cks protein, is essential for the Cdc2-dependent phosphorylation of the anaphase-promoting complex at mitosis. **Genes Dev** 1998; 12:2549-59.

Pedersen-Bjergaard J, Andersen MT, Andersen MK. Genetic pathways in the pathogenesis of therapy-related myelodysplasia and acute myeloid leukemia. **Hematology Am Soc Hematol Educ Program** 2007:3927.

Peters JM. The anaphase promoting complex/cyclosome: a machine designed to destroy. **Nat Rev Mol Cell Biol** 2006; 7:644-56.

Pinheiro RF, Chauffaille MLLF. Síndrome mielodisplásica secundária à quimio ou radioterapia – SMD relacionada a tratamento. **Rev Bras Hematol Hemoter** 2006; 28:201-3.

Pinheiro RF, Silva MR, Chauffaille Mde L. The 5q- syndrome and autoimmune phenomena: report of three cases. **Leuk Res** 2006; 30:507-10.

Pinheiro RF, Moreira Ede S, Silva MR, Greggio B, Alberto FL, Chauffaille Mde L. FLT3 mutation and AML/ETO in a case of myelodysplastic syndrome in transformation corroborates the two hit model of leukemogenesis. **Leuk Res** 2007; 31:1015-8.

Pinheiro RF, de Sá Moreira E, Silva MR, Alberto FL, Chauffaille M de L. FLT3 internal tandem duplication during myelodysplastic syndrome follow-up: a marker of transformation to acute myeloid leukemia. **Cancer Genet Cytogenet** 2008; 183:89-93.

Pinheiro RF, Chauffaille ML. Comparison of I-FISH and G-banding for the detection of chromosomal abnormalities during the evolution of myelodysplastic syndrome. **Braz J Med Biol Res** 2009; 42:1110-2.

Pinheiro RF, Metze K, Silva MR, Chauffaille Mde L. The ambiguous role of interferon regulatory factor-1 (IRF-1) immunoexpression in myelodysplastic syndrome. **Leuk Res** 2009; 33:1308-12.

Pinto M, Soares MJ, Cerveira N, et al. Expression changes of the MAD mitotic checkpoint gene family in renal cell carcinomas characterized by numerical chromosome changes. **Virchows Arch** 2007; 450:379-85.

Poppe B, Vandesompele J, Schoch C, et al. Expression analyses identify MLL as a prominent target of 11q23 amplification and support an etiologic role for MLL gain of function in myeloid malignancies. **Blood** 2004; 103:229-35.

Raaijmakers MH, Mukherjee S, Guo S, et al. Bone progenitor dysfunction induces myelodysplasia and secondary leukaemia. **Nature** 2010; 464:852-7.

Rajkumar T, Sabitha K, Vijayalakshmi N, et al. Identification and validation of genes involved in cervical tumourigenesis. **BMC Cancer** 2011; 11:80.

Rhodes DR, Yu J, Shanker K, et al. Large-scale meta-analysis of cancer microarray data identifies common transcriptional profiles of neoplastic transformation and progression. **Proc Natl Acad Sci USA** 2004; 101:9309-14.

Rigolin GM, Cuneo A, Roberti MG, et al. Exposure to myelotoxic agents and myelodysplasia: case-control study and correlation with clinicobiological findings. **Br J Haematol** 1998; 103:189-97.

Rojanala S, Han H, Muñoz RM, et al. The mitotic serine threonine kinase, Aurora-2, is a potential target for drug development in human pancreatic cancer. **Mol Cancer Ther** 2004; 3:451-7.

Romeo M, Chauffaille Mde L, Silva MR, Bahia DM, Kerbauy J. Comparison of cytogenetics with FISH in 40 myelodysplastic syndrome patients. **Leuk Res** 2002; 26:993-6.

Sabbattini P, Canzonetta C, Sjoberg M, et al. A novel role for the Aurora B kinase in epigenetic marking of silent chromatin in differentiated postmitotic cells. **EMBO J** 2007; 26:4657-69.

Sadahira Y, Kanzaki A, Wada H, Yawata Y. Immunohistochemical identification of erythroid precursors in paraffin embedded bone marrow sections: spectrin is a superior marker to glycophorin. **J Clin Pathol** 1999; 52:919-21.

Sakakura C, Hagiwara A, Yasuoka R, et al. Tumour-amplified kinase BTAKis amplified and overexpressed in gastric cancers with possible involvement in aneuploid formation. **Br J Cancer** 2001; 84:824-31.

[SEER] Surveillance, Epidemiology, and End Results. **Cancer statistics**. Available from: <URL:<http://seer.cancer.gov/statistics/>> [2011 nov 07].

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

Sen S, Zhou H, Zhang RD, et al. Amplification/overexpression of a mitotic kinase gene in human bladder cancer. **J Natl Cancer Inst** 2002; 94:1320-9.

Shaffer LG, Tommerup N. **ISCN 2005: An International System for Human Cytogenetic Nomenclature**. Switzerland: ISCN; 2005.

Siegel S, Castellan NJ. **Nonparametric statistics for the behavioral sciences** 2nd. New York: McGraw-Hill; 1988.

Solé F, Luño E, Sanzo C, et al. Identification of novel cytogenetic markers with prognostic significance in a series of 968 patients with primary myelodysplastic syndromes. **Haematologica** 2005; 90:1168-78.

Sorrentino R, Libertini S, Pallante PL, et al. Aurora B overexpression associates with the thyroid carcinoma undifferentiated phenotype and is required for thyroid carcinoma cell proliferation. **J Clin Endocrinol Metab** 2005; 90:928-35.

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

Steensma DP. The changing classification of myelodysplastic syndromes: what's in a name? **Hematology Am Soc Hematol Educ Program** 2009:645-55.

Sternberg A, Killick S, Littlewood T, et al. Evidence for reduced B-cell progenitors in early (low-risk) myelodysplastic syndrome. **Blood** 2005; 106:2982-91.

Sudakin V, Chan GK, Yen TJ. Checkpoint inhibition of the APC/C in HeLa cells is mediated by a complex of BUBR1, BUB3, CDC20, and MAD2. **J Cell Biol** 2001; 154:925-36.

Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, et al. **WHO classification of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues**. Lyon: IARC Press; 2008. (IARC WHO Classification of Tumours, n° 2).

Tefferi A, Vardiman JW. Mechanisms of disease: myelodysplastic syndromes. **N Engl J Med** 2009; 361:1872-85.

Tien HF, Wang CH, Chuang SM, et al. Cytogenetic studies, ras mutation, and clinical characteristics in primary myelodysplastic syndromes: a study on 68 Chinese patients in Taiwan. **Cancer Genet Cytogenet** 1994; 74:40-9.

Thiele J, Kvasnicka HM, Facchetti F, et al. European consensus on grading bone marrow fibrosis and assessment of cellularity. **Haematologica** 2005, 90:1128-32.

Tong T, Zhong Y, Kong J, et al. Overexpression of Aurora-A contributes to malignant development of human esophageal squamous cell carcinoma. **Clin Cancer Res** 2004; 10:7304-10.

Tsou MF, Stearns T. Mechanism limiting centrosome duplication to once per cell cycle. **Nature** 2006; 442:947-51.

Tsou MF, Wang WJ, George KA, Uryu K, Stearns T, Jallepalli PV. Polo kinase and separase regulate the mitotic licensing of centriole duplication in human cells. **Dev Cell** 2009; 17:344-54.

Twu NF, Yuan CC, Yen MS, et al. Expression of Aurora kinase A and B in normal and malignant cervical tissue: High Aurora A kinase expression in squamous cervical cancer. **Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol** 2009; 142:57-63.

Vagnarelli P, Earnshaw WC. Chromosomal passengers: the four-dimensional regulation of mitotic events. **Chromosoma** 2004; 113:211-22.

Valent P, Bain BJ, Bennett JM, et al. Idiopathic cytopenia of undetermined significance (ICUS) and idiopathic dysplasia of uncertain significance (IDUS), and their distinction from low risk MDS. **Leuk Res** 2012; 36:1-5.

Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, et al. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. **Genome Biol** 2002; 3:RESEARCH0034

Varshney D, Zhou YY, Geller SA, et al. Determination of HER-2 Status and Chromosome 17 Polysomy in Breast Carcinomas Comparing HercepTest and PathVysion FISH Assay. **Am J Clin Pathol** 2004; 121:70-77.

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

Veerakumarasivam A, Goldstein LD, Saeb-Parsy K, et al. AURKA overexpression accompanies dysregulation of DNA-damage response genes in invasive urothelial cell carcinoma. **Cell Cycle** 2008; 7:3525-33.

Verdaasdonk JS, Bloom K. Centromeres: unique chromatin structures that drive chromosome segregation. **Nat Rev Mol Cell Biol** 2011; 12:320-32.

Vischioni B, Oudejans JJ, Vos W, Rodriguez JA, Giaccone G. Frequent overexpression of aurora B kinase, a novel drug target, in non-small cell lung carcinoma patients. **Mol Cancer Ther** 2006; 5:2905-13.

Wang L, Yin F, Du Y, et al. MAD2 as a key component of mitotic checkpoint: a probable prognostic factor for gastric cancer. **Am J Clin Pathol** 2009; 131:793-801.

Wang X, Jin DY, Wong YC, et al. Correlation of defective mitotic checkpoint with aberrantly reduced expression of MAD2 protein in nasopharyngeal carcinoma cells. **Carcinogenesis** 2000; 21:2293-7.

Wang X, Jin DY, Ng RW, et al. Significance of MAD2 expression to mitotic checkpoint control in ovarian cancer cells. **Cancer Res** 2002; 62:1662-8.

Warner SL, Bearss DJ, Han H, Von Hoff DD. Targeting aurora-2 kinase in cancer. **Mol Cancer Ther** 2003; 2:589-95.

Wei Y, Yu L, Bowen J, Gorovsky MA, Allis CD. Phosphorylation of histone H3 is required for proper chromosome condensation and segregation. **Cell** 1999; 97:99-109.

Ye D, Garcia-Manero G, Kantarjian HM, et al. Analysis of Aurora kinase A expression in CD34+ blast cells isolated from patients with myelodysplastic syndromes and acute myeloid leukemia. **J Hematop** 2009; 2:2-8.

Yuan B, Xu Y, Woo JH, et al. Increased expression of mitotic checkpoint genes in breast cancer cells with chromosomal instability. **Clin Cancer Res** 2006; 12:405-10.

Zaravinos A, Lambrou GI, Boulalas I, Delakas D, Spandidos DA. Identification of common differentially expressed genes in urinary bladder cancer. **PLoS One** 2011; 6:e18135.

Zhang SH, Xu AM, Chen XF, Li DH, Sun MP, Wang YJ. Clinicopathologic significance of mitotic arrest defective protein 2 overexpression in hepatocellular carcinoma. **Hum Pathol** 2008; 39:1827-34.

Zheng Z, Qianqiao Z, Qi H, Feng X, Chunkang C, Xiao L. In vitro deprivation of CD8(+)CD57(+)T cells promotes the malignant growth of bone marrow colony cells in patients with lower-risk myelodysplastic syndrome. **Exp Hematol** 2010; 38:677-84.

Zou JX, Rollison DE, Boulware D, et al. Altered naive and memory CD4+ T cell homeostasis and immunosenescence characterize younger patients with myelodysplastic syndrome. **Leukemia** 2009; 23:1288-96.

Zhao WL, Xu L, Wu W, et al. The myelodysplastic syndromes: analysis of prognostic factor and comparison of prognostic systems in 128 Chinese patients from a single institution. **Hematol J** 2002; 3:137-44.

Anexo 1 - Termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE)

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Caro Paciente do Hospital Universitário Walter Cantídio, você tem o diagnóstico de uma doença chamada Síndrome Mielodisplásica. Esta doença afeta a fábrica do seu sangue, isto é, a sua medula óssea e muitas dúvidas ainda existem sobre o que acontece com esta doença. Por isso, são necessários estudos para que possamos entender o que realmente acontece na sua medula óssea.

Estamos realizando um estudo para saber o que vai acontecer como a sua doença. Este trabalho tem como objetivo estudar o funcionamento da sua medula óssea e obter uma melhor classificação da gravidade de sua doença para que você possa receber a indicação do melhor tipo de tratamento no futuro. Para realização deste trabalho, será colhida 1 amostra da sua medula óssea. A amostra de medula óssea (a medula líquida) será coletada através do uso de uma agulha de aproximadamente 5 cm na região abaixo do pescoço chamada de esterno. Para isso, o paciente receberá anestesia no osso do esterno (3 cm abaixo do pescoço). A anestesia é local e causa um leve desconforto. Não há outro tipo de anestesia a ser feita para a realização deste exame e esta anestesia é segura e sem complicação. Após anestesiado, a agulha será colocada no local anestesiado e será feita uma pressão sobre o peito. Neste momento, o paciente não sentirá mais dor. Sentirá uma sensação de peso. Serão então aspirados aproximadamente 3,0ml de líquido do osso, que é a medula óssea líquida. O paciente ficará deitado em uma maca por aproximadamente 5 minutos. Este exame já é normalmente realizado em pacientes com Síndrome Mielodisplásica durante o diagnóstico e no acompanhamento desta doença. A única diferença é que será coletado cerca de 1ml de medula óssea a mais para as pesquisas. Isto não traz malefícios para a sua medula óssea. Não há outra maneira de estudar a medula óssea líquida sem realizar este exame.

Em qualquer etapa do estudo, o paciente terá acesso aos profissionais responsáveis pela pesquisa para esclarecimento de possíveis dúvidas, estando o investigador principal, Sílvia M M Magalhães, à disposição no Serviço de Hematologia do HUWC-HC (telefone: 85 3101-2272). Se houver alguma dúvida ou consideração sobre a ética da pesquisa, entrar em contá-lo com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP), situado na rua Capitão Francisco Pedro, 1290 – Bairro: Rodolfo Teófilo, telefone: 85 3366-8589. É garantida a liberdade de retirada de consentimento a qualquer momento e deixar de participar do estudo, sem qualquer prejuízo à continuidade de seu tratamento na Instituição. Os dados e materiais serão destinados somente à pesquisa e as informações obtidas são confidenciais, sendo os resultados parciais fornecidos ao paciente.

Não há despesas pessoais ao participante em qualquer fase do estudo, incluindo exames e consultas. Também não há compensação financeira relacionada à sua participação.

Eu, _____, portador do RG _____ acredito ter sido suficientemente informado a respeito das informações que li ou que foram lidas para mim descrevendo o estudo " Estudo de proteínas relacionadas ao fuso mitótico (AURORA A e AURORA B) e ponto de checagem mitótico (CDC20 e MAD2L1) em pacientes portadores de Síndrome mielodisplásica".

Eu discuti com o pesquisador _____ sobre a minha decisão de participar neste estudo. Ficaram claros para mim quais são os propósitos do estudo, os procedimentos a serem realizados, seus desconfortos, seus riscos, as garantias de confiabilidade e de esclarecimentos permanentes. Ficou claro também que a minha participação é isenta de despesas e que tenho a garantia do acesso ao tratamento hospitalar quando necessário. Concordo voluntariamente em participar deste estudo e poderei a qualquer momento retirar o meu consentimento, antes ou durante o mesmo, sem penalidades ou qualquer prejuízo para o meu tratamento.

Assinatura do Paciente

Data ____/____/____

Assinatura da Testemunha

Data ____/____/____

Declaro que obtive de forma apropriada e voluntária o Consentimento Livre e Esclarecido deste paciente ou responsável legal para a participação neste estudo.

Assinatura do responsável pelo estudo

Data ____/____/____

Anexo 2 – Protocolos

PROTOCOLO I – CITOGENÉTICA CLÁSSICA

1. Coleta de medula óssea

- Aproximadamente 2 a 3 mL de medula óssea em seringa 20cc contendo 1 a 2 mL de heparina

Obs.: Manter a agulha na seringa durante o transporte do material.

2 Procedimento

2.1 Cultura (dia 1)

- Em ambiente estéril (capela de fluxo laminar) transferir amostra para tubo Falcon de 15 mL
- Acrescentar 1 mL de RPMI
- Homogeneizar lentamente por inversão
- Centrifugar 1200 rpm
- Remover o máximo possível do sobrenadante com auxílio de pipeta
- Após centrifugação, aspirar camada de leucócitos com pipeta Pasteur e adicionar 6 gotas do material em cada tubo T (contendo 3 mL de soro fetal e 7 mL de RPMI)
- Incubar cultura em estufa de CO₂ a 37 °C por 23h30min

2.2 Bloqueio do fuso mitótico/ choque hipotônico/ fixação (dia 2)

- Adicionar 70 uL de Colcemid em cada tubo T
- Homogeneizar (desprendendo todo o material das paredes do tubo T) e incubar na geladeira por 30 minutos
- Transferir amostra de cada tubo T para um tubo Falcon 15 mL e centrifugar por 10 minutos (1200 rpm)
- Remover o máximo possível do sobrenadante com auxílio de pipeta
- Ressuspender precipitado com 10 mL de solução hipotônica de KCl

0,075 M lentamente (gota a gota) com o auxílio do agitador de tubos

- Deixar a amostra descansar por 20 minutos
- Centrifugar por 10 minutos (1200 rpm)
- Remover o máximo possível do sobrenadante com auxílio de pipeta
- Ressuspender precipitado com 10 mL de solução de Carnoy (ácido acético:metanol, proporção 3:1) lentamente (gota a gota) com o auxílio do agitador de tubos
- Deixar a amostra descansar por 20 minutos
- Centrifugar por 10 minutos (1200rpm)
- Desprezar sobrenadante por inversão
- Repetir lavagem com solução Carnoy mais 3 vezes (com descanso de 20 minutos entre cada uma)
- Guardar o material em solução de Carnoy na geladeira

2.3 Preparo das lâminas e bandamento (dia 3)

- Deixar as lâminas embebidas em um recipiente com álcool comum. Antes de utilizar, limpar as lâminas com gazes
- Verificar concentração da amostra (a amostra deverá apresentar um aspecto levemente leitoso). Se necessário, adicionar mais solução Carnoy
- Pingar 1 gota na lâmina (angulação 45°), deixar a gota percorrer a lâmina e em seguida soprar, para espalhar o material em toda sua extensão
- Aquecer as lâminas no microondas por 3 minutos, na potência máxima
- Imergir a primeira lâmina em tripsina. Contar rigorosamente o tempo de tripsina no cronômetro
- Imediatamente após imersão em tripsina, mergulhar a lâmina na solução tampão Sorensen por 3x consecutivas (para bloquear a ação da tripsina)
- Retirar o excesso de tampão em papel filtro
- Em seguida, mergulhar a lâmina nas soluções 1, 2 e 3 do kit Panótico (3x consecutivas em cada solução)

- Realizar contagem no cronômetro na última solução (Giemsa)
- Após Giemsa, lavar as lâminas em água corrente e enxugar cuidadosamente em papel filtro.
- Observar o resultado de cada tempo em pelo menos 3-4 mitoses por lâmina
- Após encontrar o “tempo de banda”, repetir procedimento de bandamento com todas as demais lâminas no mesmo dia.

PROTOCOLO II – CITOGENÉTICA MOLECULAR (FISH)

1. PRIMEIRO DIA

- Delimitar espaço na lâmina
- Limpar lâminas e lamínulas com álcool e algodão
- Centrifugar 1200 rpm – 10 min
- Lavar material 1 vez com solução Carnoy (seguir mesmo procedimento descrito na citogenética clássica)
- Adicionar solução Carnoy até atingir coloração leitosa
- Gotejar material sobre lâmina inclinada
- Observar no microscópio a concentração de células e dispersão sobre a lâmina
- Imergir cada lâmina por 2 minutos na solução SSC 2X TA
- Imergir cada lâmina por 2 minutos na série etílica (70% - 80% - 100%) TA
- Aquecer solução de Formamida+SSC 2x a 73 °C em banho-maria
- Imergir cada lâmina por 2 minutos na solução aquecida (desnaturar DNA)
- Aquecer as sondas a 90 °C em banho-maria – 10 minutos (desnaturar sondas)
- Adicionar 3 uL de sonda (ready to use) sobre demarcação na lâmina
- Cobrir com lamínula
- Selar com cola as laterais da lamínula (para não deslocar)
- Colocar sobre placa aquecedora (75 °C) por 2 min no escuro
- Incubar em câmara úmida escura por 24 horas

1. SEGUNDO DIA

- Preparar solução NP40 0,1%+SSC 2x e NP40 0,3%+SSC 0,4x
- Aquecer NP40 0,3%+SSC 0,4x a 73 °C em banho-maria
- Retirar lamínulas
- Imergir cada lâmina por 2 minutos na solução aquecida
- Imergir cada lâmina por 1 minuto na solução NP40 0,1%+SSC 2x em TA
- Adicionar 15 uL de DAPI sobre demarcação na lâmina
- Cobrir com lamínula
- Selar com esmalte as laterais da lamínula (para não deslocar)
- Incubar por 10min, no escuro, a TA
- Observar no microscópio.

PROTOCOLO III – EXTRAÇÃO E PURIFICAÇÃO DE RNA (TRIZOL LS)

1. Coleta e armazenamento das amostras

- Coletar 2 tubos contendo aprox. 2 mL de medula óssea em cada tubo de ETDA
- Centrifugar 1811 x g, por 15 minutos, a 4 °C
- Transferir plasma para eppendorfs (armazenar -20 °C)
- Aspirar camada leucocitária (*buffy coat*)
Obs.: Tentar aspirar o menos possível de hemácias.
- Transferir camada leucocitária (aprox. 250 uL) para tubo de criopreservação de 5 mL
- Adicionar 3 mL de TRIZOL LS
- Homogenizar (vortex) por 15 segundos (lise celular)
Obs.: Se necessário, adicionar mais TRIZOL LS (até o material ficar menos viscoso)
- Deixar a amostra descansar por 10 minutos, a temperatura ambiente
- Conservar -80 °C

2. Extração de RNA total

- Descongelar as amostras em temperatura ambiente

- Aliquotar as amostras em tubos eppendorfs 2 mL (máximo de 1 mL de amostra/tubo)
- Adicionar clorofórmio (proporção 200 uL clorofórmio: 1 mL amostra)
- Homogeneizar em vortex por 20 segundos
- Incubar 10-15 minutos em temperatura ambiente
- Centrifugar 12000 x g por 15 minutos, a 4 °C
- Transferir sobrenadante para novo tubo eppendorf 2 mL com auxílio de pipeta
- Obs.: Reservar fase orgânica (precipitado) para extração de DNA e proteína.
- Adicionar o mesmo volume de sobrenadante resgatado de TRizol LS
- Homogeneizar
- Incubar 10 minutos em temperatura ambiente
- Adicionar clorofórmio (proporção 200 uL clorofórmio: 1 mL de TRizol LS adicionado)
- Homogeneizar em vortex por 20 segundos
- Incubar 10-15 minutos em temperatura ambiente
- Centrifugar 12000 x g por 15 minutos, a 4 °C
- Transferir sobrenadante para novo tubo eppendorf 2 mL com auxílio de pipeta
- Acrescentar 2 uL de microcarreador (glicogênio [20mg/mL]) em cada tubo
- Mix por inversão
- Adicionar isopropanol (proporção 0,5 mL isopropanol: 1 mL de TRizol LS adicionado)
- Mix por inversão
- Incubar 10 minutos em temperatura ambiente
- Centrifugar 12000 x g por 10 minutos, a 18 °C
- Descartar sobrenadante por inversão
- Lavar precipitado com etanol 75% em temperatura ambiente (3x) → aprox. 2 mL de etanol por lavagem
- Centrifugar 7500 x g por 5 minutos, a 4 °C
- Descartar sobrenadante por inversão

- Retirar restante do etanol com pipeta e deixar precipitado secar na bancada
- Adicionar H₂O tratada com DEPC
- Incubar em termomix por 10 min, a 55 °C, sob agitação
- Conservar -80 °C.

Anexo 3 - Resultados da citogenética clássica (bandamento G) dos pacientes portadores de SMD.

No	RESULTADO	SEXO	CLASSIFICAÇÃO
		/IDADE	OMS (2008)
1	46,XX[20]	F/28	ARSA
2	46,XY[9]	M/24	CRDM
3	Ausência de metáfase	F/41	CRDM
4	Ausência de metáfase	F/84	CRDU
5	46,XY,del(5)(q15q33),del(17)(p11.2)[7]/46,XY[13]	M/32	CRDM
6	46,XY	M/29	CRDU
7	46,X-Y[4]/46,XY[16]	M/91	ARSA
8	46,XY,del(5)(?q15q33)[7]/46,XY[8]	M/33	CRDM
9	47,XY,+8[6]/47,XY,del(7)(q32),+8[7]/46,XY[2]	M/63	AREB II
10	46,XY[9]	F/65	SMD2 ^a
11	46,XX[6]	F/72	CRDU
12	46,XY[5]	M/74	CRDM
13	47,XY,+mar[3]/46,XY,[17]	M/45	CRDM
14	46,XY[20]	M/67	AREB I
15	46,XY,del(5)(?q22q33)[3]/45,XY,del(5)(?q22q33),-18[3]/46,XY[14]	M/83	ARSA
16	Ausência de metáfase	F/74	SMD2 ^a
17	46,XY,del(5)(q31q35)[6]/46,XY[17]	M/89	AREB I
18	Sem metáfase	F/42	ARSA
19	46,XX[7]	F/67	CRDM
20	46,XY,del(5)(q22q33)[5]/46,XY[7]	M/15	CRDU
21	46,XY,del(5)(q15q33)[7]/46,XY[11]	M/69	5q isolado
22	Ausência de metáfase	M/85	CRDM
23	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]	F/30	AREB II
24	47,XY,+8[4]/46,XY[5]	M/40	CRDM
25	47,XY,+mar[5],46,XY[11]	M/66	CRDM
26	46,XY,-?10,+mar[5]/46,XY[1]	M/45	CRDM
27	46,XY,del(7)(q32)[2]/46,XY[18]	M/73	CRDM
28	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]	M/77	CRDM
29	Sem metáfase	M/86	CRDM
30	89,XXY,-20,-22,-Y[4]/46,XY,del(16)(?q22)[5]/46,XY[11]	M/79	CRDM
31	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]	M/49	AREB II
32	46,XX[22]	F/18	SMD2 ^a
33	Ausência de metáfase	F/59	CRDM

Cont/ Anexo 3

No	RESULTADO	SEXO /IDADE	CLASSIFICAÇÃO OMS (2008)
34	Ausência de metáfase	M/54	CRDM
35	46, XY[8]	M/46	CRDM
36	Ausência de metáfase	M/82	CRDU
	37,X,-2,-3,-9,-11,-12,-15,-16,-18,-Y[8]/46,XY,	M/64	AREB II
37	del(5)(q15q33)[5]/46,XY[6]		
38	46,XX[20]	F/57	CRDM
39	46,XX[25]	F/72	CRDM
40	46,XX[20]	F/81	CRDM
41	Ausência de metáfase	F/66	ARSA
	46,XX,del(5)(q15q33)[9]/46,XX,del(5)(q15q33),del(11)	F/41	CRDM
42	(?q25)[7]/46,XX[4]		
43	46,XX[8]	F/57	CRDM
44	44,XX-13,-17[4]/46,XX[5]	F/41	CRDM
45	Ausência de metáfase	F/55	CRDM
46	Sem metáfase	F/84	ARSA
47	46,XX[5]	F/81	ARSA
48	46,XX[8]	F/47	CRDU
49	46,XY,del(5)(?q15q33)[8]/46,XY[12]	M/58	5q isolado
50	Sem metáfase	F/64	CRDU
51	46,XY[11]	M/74	CRDM
52	46,XX,del(5)(q15q33)[4]/46,XX[18]	F/23	CRDU
53	Sem metáfase	F/77	CRDM
54	47,XX,t(4;11)(q27;q32),+mar[4]/46,XX[16]	F/81	CRDM
55	46,XX,del(17)(p11.2)[3]/46,XX[4]	F/27	SMD2 ^a
56	46,XX[12]	F/73	ARSA
57	46,XY[6]	M/74	ARSA
58	Ausência de metáfase	M/72	AREB II
59	Ausência de metáfase	M/66	AREB I
60	46,XX[11]	F/82	SMD2 ^a
	175,XXXXXXXX,-5,-6,-7,-8,-9,-11,-13,-	F/71	SMD2 ^a
61	14[4]/46,XX,del(5)(q15q33)[8]/46,XX[19]		

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

Anexo 4 - Resultados da citogenética molecular (FISH) dos pacientes portadores de SMD.

No	CITOGENÉTICA CLÁSSICA	FISH – AURK A		FISH – AURK B	
		AMP.	POLI	AMP.	POLI
1	46,XX[20]	0%	0%	0%	1%
2	46,XY[9]	NR	NR	NR	NR
3	Ausência de metáfase	NR	NR	NR	NR
4	Ausência de metáfase	1,5%	0%	NR	NR
5	46,XY,del(5)(q15q33),del(17)(p11.2)[7]/46,XY[13]	1,5%	0%	0%	1%
6	46,XY	4%	0%	0%	1%
7	46,X-Y[4]/46,XY[16]	0%	0%	0%	1%
8	46,XY,del(5)(?q15q33)[7]/46,XY[8]	NR	NR	NR	NR
9	47,XY,+8[6]/47,XY,del(7)(q32),+8[7]/46,XY[2]	0%	0%	0%	0%
10	46,XY[9]	1%	0%	0%	0%
11	46,XX[6]	1%	0%	4%	1%
12	46,XY[5]	1,5%	0%	0%	1,5%
13	47,XY,+mar[3]/46,XY,[17]	1%	0%	0%	0%
14	46,XY[20]	0%	0%	0%	1,5%
15	46,XY,del(5)(?q22q33)[3]/45,XY,del(5)(?q22q33),-18[3]/46,XY[14]	0%	0%	2%	0%
16	Ausência de metáfase	2,5%	0%	0%	0%
17	46,XY,del(5)(q31q35)[6]/46,XY[17]	0%	0%	0%	0%
18	Sem metáfase	NR	NR	NR	NR
19	46,XX[7]	0%	0%	0%	0%
20	46,XY,del(5)(q22q33)[5]/46,XY[7]	NR	NR	NR	NR
21	46,XY,del(5)(q15q33)[7]/46,XY[11]	1,5%	0%	0%	0%
22	Ausência de metáfase	NR	NR	NR	NR
23	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]	0%	0%	0%	1%
24	47,XY,+8[4]/46,XY[5]	NR	NR	NR	NR
25	47,XY,+mar[5],46,XY[11]	NR	NR	NR	NR
26	46,XY,-?10,+mar[5]/46,XY[1]	NR	NR	NR	NR
27	46,XY,del(7)(q32)[2]/46,XY[18]	1%	0%	0%	0%
28	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]	NR	NR	NR	NR
29	Sem metáfase	NR	NR	NR	NR
30	89,XXY,-20,-22,-Y[4]/46,XY,del(16)(?q22)[5]/46,XY[11]	3,5%	7%	0%	2,5%
31	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]	NR	NR	NR	NR
32	46,XX[22]	4,5%	0%	2,5%	0%
33	Ausência de metáfase	NR	NR	NR	NR

Cont/ Anexo 4

No	CITOGENÉTICA CLÁSSICA	FISH – AURK A		FISH – AURK B	
		AMP.	POLI	AMP.	POLI
34	Ausência de metáfase	NR	NR	NR	NR
35	46, XY[8]	4,5%	0%	2%	5%
36	Ausência de metáfase	1%	0%	3,5%	1%
37	37,X,-2,-3,-9,-11,-12,-15,-16,-18,-Y[8]/46,XY,del(5)(q15q33)[5] /46,XY[6]	4%	0%	0%	0%
38	46,XX[20]	NR	NR	NR	NR
39	46,XX[25]	1,5%	0%	0%	0%
40	46,XX[20]	2%	0%	0%	0%
41	Ausência de metáfase	0%	0%	3,5%	0%
42	46,XX,del(5)(q15q33)[9]/46,XX,del(5)(q15q33),del(11)(q23)[7]/ 46,XX[4]	0%	0%	0%	1%
43	46,XX[8]	0%	0%	0%	3%
44	44,XX-13,-17[4]/46,XX[5]	0%	12%	2%	1%
45	Ausência de metáfase	NR	NR	NR	NR
46	Sem metáfase	2%	0%	0%	2%
47	46,XX[5]	0%	0%	0%	0%
48	46,XX[8]	0%	0%	0%	1,5%
49	46,XY,del(5)(?q15q33)[8]/46,XY[12]	0%	4%	2%	0%
50	Sem metáfase	0%	0%	0%	0%
51	46,XY[11]	2%	0%	0%	0%
52	46,XX,del(5)(q15q33)[4]/46,XX[18]	NR	NR	0%	0%
53	Sem metáfase	NR	NR	NR	NR
54	47,XX,t(4;11)(q27;q32),+mar[4]/46,XX[16]	0%	0%	0%	0%
55	46,XX,del(17)(p11.2)[3]/46,XX[4]	2%	0%	0%	17%
56	46,XX[12]	1%	0%	4%	0%
57	46,XY[6]	0%	0%	NR	NR
58	Ausência de metáfase	NR	NR	NR	NR
59	Ausência de metáfase	0%	0%	2%	0%
60	46,XX[11]	0%	0%	0%	1%
61	175,XXXXXXXX,-5,-6,-7,-8,-9,-11,-13,-14[4]/46,XX, del(5)(q15q33)[8]/46,XX[19]	NR	NR	NR	NR

Legenda: AMP. (amplificação), POLI (polissomia), NR (não realizado).

Anexo 5 – Resultados da expressão gênica (PCR em Tempo Real) dos pacientes portadores de SMD.

Nº	SEX	IDADE	CEL	CARIOTIPO	OMS 2008	IPSS 1997	AURKA		AURKB		CDC20		MAD2L1	
							exp.rel.	log2.	exp.rel.	log2.	exp.rel.	log2.	exp.rel.	log2.
1	F	28	HIPER	46,XX[20]	ARSA	LOW	0,06732	-3,89290	0,16031	-2,64110	0,14504	-2,78552	0,11859	-3,07594
2	M	24		46,XY[9]	CRDM	INT-1	0,00924	-6,75740	0,00481	-7,70028	0,00542	-7,52789	0,01561	-6,00157
3	F	41	HIPO	Sem metáfase	CRDM		0,01315	-6,24874	0,00672	-7,21754	0,00352	-8,14853	0,01449	-6,10887
4	F	84	NORMO	Sem metáfase	AR		0,05292	-4,24013	0,06832	-3,87164	0,07413	-3,75378	0,08253	-3,59899
5	M	32	NORMO	46,XY,del(5)(q15q33),del(17)(p11.2)[7]/46,XY[13]	CRDM	INT-1	0,05764	-4,11685	0,05981	-4,06335	0,04380	-4,51306	0,09019	-3,47089
6	M	29	NORMO	46,XY	AR	LOW	0,02659	-5,23323	0,04126	-4,59899	0,03673	-4,76681	0,05934	-4,07481
7	M	91		46,X-Y[4]/46,XY[16]	ARSA	LOW	0,03619	-4,78842	0,04803	-4,37999	0,05399	-4,21109	0,04753	-4,39514
8	M	33	HIPO	46,XY,del(5)(?q15q33)[7]/46,XY[8]	CRDM	INT-1			0,03880	-4,68770	0,01918	-5,70435	0,04024	-4,63523
9	M	63	HIPER	47,XY,+8[6]/47,XY,del(7)(q32),+8[7]/46,XY[2]	AREB-II	HIGH	0,14447	-2,79114	0,12942	-2,94992	0,15195	-2,71831	0,11796	-3,08359
10	F	65	NORMO	46,XY[9]	SMD 2ª		0,02074	-5,59121	0,02837	-5,13940	0,02623	-5,25249	0,03695	-4,75818
11	F	72	HIPER	46,XX[6]	AR	LOW	0,06416	-3,96222	0,06501	-3,94317	0,07836	-3,67370	0,09207	-3,44106
12	M	74	NORMO	46,XY[5]	CRDM	INT-1	0,02756	-5,18114	0,03774	-4,72774	0,04821	-4,37458	0,05379	-4,21645
13	M	45	NORMO	47,XY,+mar[3]/46,XY,[17]	CRDM	INT-1	0,16567	-2,59364	0,10740	-3,21898	0,08155	-3,61613	0,08992	-3,47517
14	M	67	HIPER	46,XY[20]	AREB-I	INT-1			0,09912	-3,33462	0,06275	-3,99434	0,08942	-3,48319
15	M	83	HIPER	46,XY,del(5)(?q22q33)[3]/45,XY,del(5)(?q22q33),-18[3]/46,XY[14]	ARSA	INT-1	0,00682	-7,19643	0,00740	-7,07867	0,01322	-6,24135	0,03853	-4,69806
16	F	74	HIPO	Sem metáfase	SMD 2ª		0,02003	-5,64136	0,01317	-6,24653	0,01973	-5,66311	0,02825	-5,14569
17	M	89	HIPER	46,XY,del(5)(q31q35)[6]/46,XY[17]	AREB-I	INT-1	0,02697	-5,21268	0,06070	-4,04228	0,03937	-4,66662	0,06990	-3,83861
18	F	42	NORMO	Sem metáfase	ARSA		0,04953	-4,33552	0,03923	-4,67183	0,03830	-4,70633	0,05738	-4,12329
19	F	67	HIPER	46,XX[7]	CRDM	INT-1	0,03086	-5,01797	0,04387	-4,51071	0,03947	-4,66322	0,05251	-4,25123
20	M	15	HIPO	46,XY,del(5)(q22q33)[5]/46,XY[7]	NR	LOW	0,01575	-5,98888	0,01626	-5,94215	0,01173	-6,41316	0,05640	-4,14808
21	M	69	HIPER	46,XY,del(5)(q15q33)[7]/46,XY[11]	Isol. 5q	INT-1	0,03151	-4,98822	0,07029	-3,83052	0,07142	-3,80753	0,06047	-4,04757
22	M	85	HIPER	Sem metáfase	CRDM		0,04821	-4,37458	0,05046	-4,30881	0,06333	-3,98086	0,04543	-4,46031

Cont./ Anexo 5

N°	SEX	IDADE	CEL	CARIOTIPO	OMS 2008	IPSS1 997	AURKA		AURKB		CDC20		MAD2L1	
							exp.rel.	log2.	exp.rel.	log2.	exp.rel.	log2.	exp.rel.	log2.
23	F	30	HIPO	90,XXXX,-6,-7,-8,-11,+21,+22[5]/ 46,XX, del(7)(q23),del(20)(q13.1)[3]/45,XX,-7[5]/ 45~46,XX,-7,del(7)(q32),del(11)(q32),-17, del(17)(p11.2),del(20)(q13.1)[cp11]	AREB-II	HIGH	0,00379	-8,04298	0,00416	-7,90789	0,00265	-8,56028	0,01527	-6,03319
24	M	40		47,XY,+8[4]/46,XY[5]	CRDM	INT-1	0,02477	-5,33524	0,01236	-6,33779	0,01385	-6,17378	0,02642	-5,24221
25	M	66		47,XY,+mar[5],46,XY[11]	CRDM	INT-1	0,02797	-5,15976	0,02891	-5,11250	0,03486	-4,84211	0,03897	-4,68149
26	M	45	NORMO	46,XY,-?10,+mar[5]/46,XY[1]	CRDM	INT-1	0,34952	-1,51655	0,11750	-3,08930	0,21220	-2,23653	0,13615	-2,87674
27	M	73	HIPER	46,XY,del(7)(q32)[2]/46,XY[18]	CRDM	INT-2	0,03029	-5,04487	0,02722	-5,19908	0,02386	-5,38947	0,05381	-4,21596
28	M	77		46,XY,add(13)(p11)[12]/46,XY,del(7)(q32), add(13)(p11)[4]/48,XY,add(13)(p11),+22, +mar[9]/48,XY,del(7)(q32),add(13)(p11), +mar[3]/46,XY[2]	CRDM	INT-2	0,05956	-4,06951	0,10687	-3,22604	0,08710	-3,52113	0,11282	-3,14790
29	M	86	HIPER	Sem metáfase	CRDM		0,02842	-5,13679	0,02770	-5,17410	0,02232	-5,48521	0,06026	-4,05267
30	M	79	HIPER	89,XXY,-20,-22,- Y[4]/46,XY,del(16)(?q22)[5]/46,XY[11]	CRDM	INT-1	0,02157	-5,53452	0,04396	-4,50761	0,02559	-5,28806	0,04593	-4,44443
31	M	49		47,XY,+mar[6]/48,XY,+8,del(16)(?q22), +mar[4]/47~50,XY,del(4)(?q35),+8,+10,+11, del(16)(?q22),+21,+mar[cp8]	AREB-II	INT-2	0,05414	-4,20725	0,05448	-4,19817	0,04968	-4,33112	0,06706	-3,89842
32	F	18	HIPO	46,XX[22]	SMD 2ª		0,08106	-3,62492	0,10104	-3,30700	0,04023	-4,63547	0,05507	-4,18267
33	F	59	HIPO	Sem metáfase	CRDM		0,00183	-9,09123	0,00063	-10,63612	0,00108	-9,85761	0,00389	-8,00609
34	M	54	HIPO	Sem metáfase	CRDM		0,00078	-10,32586	0,00050	-10,95965	0,00083	-10,23997	0,00457	-7,77371
35	M	46	HIPER	46,XY[8]	CRDM	INT-1	0,09016	-3,47133	0,10810	-3,20952	0,11395	-3,13350	0,14585	-2,77748
36	M	82	NORMO	Sem metáfase	AR		0,12341	-3,01847	0,16405	-2,60783	0,19012	-2,39504	0,14304	-2,80554
37	M	64	HIPER	37,X,-2,-3,-9,-11,-12,-15,-16,-18,-Y[8]/ 46,XY,del(5)(q15q33)[5]/46,XY[6]	AREB-II	INT-2	0,08179	-3,61200	0,09465	-3,40131	0,09237	-3,43638	0,12538	-2,99562
38	F	57	HIPER	46,XX[20]	CRDM	LOW			0,00307	-8,34690	0,00167	-9,22386	0,00559	-7,48377
39	F	72	HIPER	46,XX[25]	CRDM	INT-1	0,02746	-5,18647	0,06693	-3,90118	0,04208	-4,57068	0,11392	-3,13388
40	F	81		46,XX[20]	CRDM	INT-1	0,16853	-2,56890	0,20710	-2,27157	0,11527	-3,11695	0,20034	-2,31947
41	F	66	HIPER	Sem metáfase	ARSA		0,06127	-4,02869	0,04695	-4,41277	0,07840	-3,67294	0,17503	-2,51433
42	F	41		46,XX,del(5)(q15q33)[9]/46,XX,del(5)(q15q33),del(11)(q23)[7]/46,XX[4]	CRDM	INT-1	0,04916	-4,34637	0,04557	-4,45581	0,04313	-4,53501	0,04782	-4,38626
43	F	57	HIPER	46,XX[8]	CRDM	INT-1	0,08919	-3,48697	0,05943	-4,07277	0,13720	-2,86561	0,08340	-3,58375

Cont./ Anexo 5

Nº	SEX	IDADE	CEL	CARIOTIPO	OMS 2008	IPSS 1997	AURKA		AURKB		CDC20		MAD2L1	
							exp.rel.	log2.	exp.rel.	log2.	exp.rel.	log2.	exp.rel.	log2.
44	F	41	HIPO	44,XX-13,-17[4]/46,XX[5]	CRDM	INT-1	0,00765	-7,02951	0,00947	-6,72287	0,00823	-6,92410	0,02419	-5,36960
45	F	55	HIPO	Sem Metafase	CRDM		0,00642	-7,28412					0,00174	-9,16580
46	F	84	HIPER	Sem metafase	ARSA		0,01393	-6,16544	0,02615	-5,25687	0,02317	-5,43185	0,03054	-5,03334
47	F	81	HIPER	46,XX[5]	ARSA	LOW	0,05356	-4,22274	0,04556	-4,45618	0,04549	-4,45836	0,06284	-3,99215
48	F	47	HIPER	46,XX[8]	AR	LOW	0,02173	-5,52400	0,01533	-6,02749	0,01788	-5,80560	0,03417	-4,87120
49	M	58	HIPO	46,XY,del(5)(?q15q33)[8]/46,XY[12]	Isol. 5q	INT-1	0,01459	-6,09857	0,01722	-5,85960	0,01397	-6,16164	0,02046	-5,61126
50	F	64	HIPER	Sem metafase	AR		0,00536	-7,54358	0,01268	-6,30137	0,00974	-6,68121	0,02073	-5,59231
51	M	74	NORMO	46,XY[11]	CRDM	INT-1	0,07445	-3,74765	0,03196	-4,96766	0,04850	-4,36590	0,05795	-4,10902
52	F	23		46,XX,del(5)(q15q33)[4]/46,XX[18]	NR	LOW	0,21428	-2,22241	0,21872	-2,19285	0,17016	-2,55506	0,21747	-2,20114
53	F	77	HIPO	Sem metafase	CRDM		0,04174	-4,58234	0,03994	-4,64610	0,05472	-4,19186	0,04234	-4,56180
54	F	81	HIPER	47,XX,t(4;11)(q27;q32),+mar[4]/46,XX [16]	CRDM	INT-1	0,03511	-4,83195	0,05229	-4,25724	0,03865	-4,69356	0,08518	-3,55337
55	F	27	HIPO	46,XX,del(17)(p11.2)[3]/46,XX[4]	SMD 2 ^a		0,01318	-6,24519	0,01184	-6,40059	0,00505	-7,62832	0,02137	-5,54810
56	F	73		46,XX[12]	ARSA	LOW	0,02148	-5,54104	0,02973	-5,07172	0,02876	-5,12000	0,03325	-4,91037
57	M	74	HIPER	46,XY[6]	ARSA	LOW	0,13400	-2,89971	0,14854	-2,75111	0,18090	-2,46674	0,15670	-2,67392
58	M	72		Sem metafase	AREB-II		0,05196	-4,26646	0,04295	-4,54136	0,03918	-4,67357	0,04271	-4,54942
59	M	66	HIPER	Sem metafase	AREB-I		0,06464	-3,95143	0,05335	-4,22848	0,05919	-4,07849	0,08524	-3,55238
60	F	82	HIPER	46,XX[11]	SMD 2 ^a		0,01649	-5,92233	0,02942	-5,08713	0,02144	-5,54346	0,03423	-4,86873
61	F	71	HIPO	175,XXXXXXXX,-5,-6,-7,-8,-9,-11,-13,-14[4]/46,XX,del(5)(q15q33)[8]/46,XX [19]	SMD 2 ^a		0,03598	-4,79651	0,03653	-4,77474	0,02388	-5,38816	0,04527	-4,46535

Legenda: CEL (Celularidade); HIPER (Hiper celular); NORMO (Normocelular); HIPO (Hipocelular); CRDU (Citopenia Refratária com Displasia Unilinhagem); ARSA (Anemia Refratária com Sideroblastos em Anel); CRDM (Citopenia Refratária com Displasia Multilinhagem); AREB I e II (Anemia Refratária com Excesso de Blasto); SMD2^a (SMD secundária); INT-1 (Intermediário I); INT-2 (Intermediário II); exp.rel. (expressão relativa); log (logaritmo na base 2).

Anexo 6 - Artigo: Heredia F, Sousa J, Magalhães S, Pinheiro R. Therapy-related myelodysplastic syndrome with 17p deletion following long-term azathioprine treatment. *Leuk Res* 10; 34:e311-2.

Leukemia Research 34 (2010) e311–e312



Contents lists available at ScienceDirect

Leukemia Research

journal homepage: www.elsevier.com/locate/leukres



Letter to the Editor

Therapy-related myelodysplastic syndrome with 17p deletion following long-term azathioprine treatment

Therapy-related myelodysplastic syndrome (t-MDS) is a well-recognized clinical syndrome occurring as a late complication after cytotoxic therapy. The period between primary diagnosis and therapy-related disease ranges between few months to several years, and it may be dependent on the ability of leukemogenic drugs to inflict DNA damage, cumulative dose or dose intensity of the preceding cytotoxic therapy [1,2].

Azathioprine (AZA) is an antimetabolite drug widely used in patients with non-life threatening inflammatory and various autoimmune disorders [3–5] and after organ allografting. Incorporation of deoxy-6-thioguanosine 5'triphosphate (dGS) into DNA underlies the cytotoxicity and therapeutic effect of azathioprine, triggering cell-cycle arrest and apoptosis by a process that involves the mismatch repair (MMR) pathway [5]. AZA has been shown to induce defective DNA-mismatch repair [1] and the expansion of an MMR-deficient clone may represent an early step in the development of t-MDS.

Knipp et al. reported 14 cases of t-MDS following treatment with AZA [6]. The great majority of cases presented abnormality of chromosome 7 (del(7q) or -7) and, of utmost importance, seven patients evolved into acute myeloid leukemia, demonstrating the poor prognosis of this disease. Loss of all or part of chromosome 7 and 5 are frequently noted in MDS secondary to alkylating agents [4]. Thiopurines and alkylating agents differ in their structures and mechanisms of action, but they share the ability to produce DNA damage that interacts with MMR [4].

The aim of this report is to present a case of t-MDS with 17p deletion following prolonged azathioprine treatment.

A 26-year-old female patient was diagnosed with myasthenia gravis in 2003. Azathioprine 50 mg/day was started in 2005 and was used for 48 months. During follow-up, the drug was shown to reduce the frequency and intensity of crisis. Anemia was detected in 2009. At this time blood cell count showed hemoglobin of 5.4 g/dL, MCV 82 fL, WBC of $9.6 \times 10^9/L$ with neutrophils of $6.5 \times 10^9/L$, lymphocytes $1.0 \times 10^9/L$, monocytes $0.48 \times 10^9/L$, and platelets $321 \times 10^9/L$. Reticulocytes were at $42.5 \times 10^9/L$. Bone marrow aspirate and biopsy revealed a hypocellular bone marrow, with an estimated 25% hematopoietic cellularity. It showed dysplastic abnormalities as binucleated erythroblasts and granulocytic segmentation deficit. Karyotypic analysis showed: 46,XX,del(17)(p11.2) [3]/46,XX [4] (Fig. 1) and the diagnosis of t-MDS was established according to WHO [7]. Anemia rapidly worsened with no response to erythropoietin therapy and the patient became transfusion dependent. AZA was then discontinued.

Azathioprine, a recognized carcinogen, might contribute to development of t-MDS by facilitating the selective clonal expansion of altered cells by providing a considerable selective pressure for the emergence of MMR-defective myeloid cell clones [4].

To the best of our knowledge, there is only one case of t-MDS with abnormality of chromosome 17 following AZA treatment [3]. A 63-year-old male patient used azathioprine for 11 years after heart transplantation and developed pancytopenia. The bone marrow aspirate revealed intense dyserythropoiesis and mild signs of dysgranulopoiesis and dysmegacaryopoiesis. The karyotype was

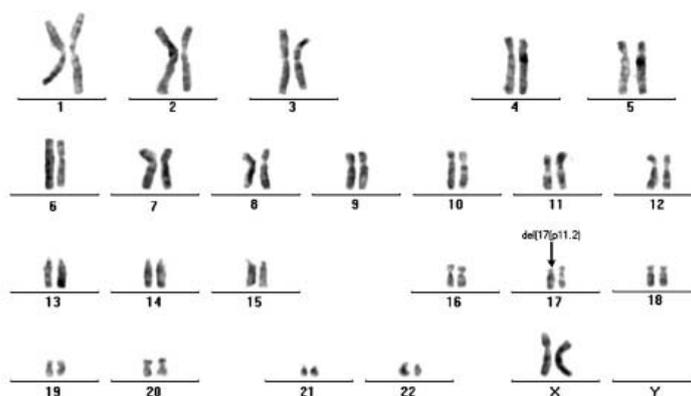


Fig. 1. G-banding metaphases from bone marrow showing 46,XX,del(17)(p11.2). The arrow shows the chromosomal abnormality.

complex, with abnormalities of chromosome 7, 12 and 17. The patient evolved into AML 1 year later.

The case presented here is the first report of isolated del(17p) following long-term AZA treatment. Our patient did not present morphologic alterations related to 17p-syndrome and six months after AZA withdrawal the clinical presentation is red blood cell transfusion dependency with no additional cytopenia. The real prognosis of this abnormality in the case presented here cannot be established. The majority of cases with t-MDS following AZA exposure involved chromosome 7, a marker of very poor prognosis. Our patient presents no signs of evolution after 6-month follow-up. The ability of AZA to promote damage and clonal expansion through selective pressure of mutant myeloid cells is consistent with a role in the development of MDS and implicate AZA as a leukemogenic agent as suggested here.

We would like to emphasize that long-term treatment with AZA should be used with caution because it seems to be associated with an increased risk of developing MDS. It will be prudent to review the need and the dosage of azathioprine therapy to minimize patients' risk of developing malignancy, whilst optimizing the benefits that the drug can provide.

Conflict of interest statement

There is no conflict of interest to disclose.

Acknowledgements

This article was supported by FUNCAP and CNPq.

Contributions. F.H. wrote part of the manuscript. R.P. and S.M. wrote and review the manuscript. J.C. gave substantial contribution to the final version.

References

- [1] Leone G, Pagano L, Ben-Yehuda D, Voso MT. Therapy-related leukemia and myelodysplasia: susceptibility and incidence. *Haematologica* 2007;92:1389–98.
- [2] Smith SM, Le Beau MM, Huo D, Karrison T, Sobels RM, Anastasi J, et al. Clinical-cytogenetic associations in 306 patients with therapy-related myelodysplasia and myeloid leukemia: the University of Chicago series. *Blood* 2003;102:43–52.
- [3] Depil S, Lepelley P, Soenen V, Preudhomme C, Lail JL, Broly F, et al. A case of refractory anemia with 17p- syndrome following azathioprine treatment for heart transplantation. *Leukemia* 2004;18:878.
- [4] Offman J, Opelz G, Doehler B, Cummins D, Halil O, Banner NR, et al. Defective DNA mismatch repair in acute myeloid leukemia/myelodysplastic syndrome after organ transplantation. *Blood* 2004;104:822–8.
- [5] Sahasranaman S, Howard D, Roy S. Clinical pharmacology and pharmacogenetics of thiopurines. *Eur J Clin Pharmacol* 2008;64:753–67.
- [6] Knipp S, Hildebrandt B, Richter J, Haas R, Germing U, Gatte mann N. Secondary myelodysplastic syndromes following treatment with azathioprine are associated with aberrations of chromosome 7. *Haematologica* 2005;90:691–3.
- [7] Brunning R, Orazi A, Germing U, LeBeau MM, Porwit A, Baumann I, et al. Myelodysplastic syndromes/ neoplasms, overview. In: Swerdlow SH, Campo E, Harris ML, Jaffe ES, Pileri SA, Stein H, Thiele J, Vardiman JW, editors. WHO classification of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues. 4th ed. Lyon: IARC Press; 2008. p. 88–93.

Fabiola Heredia^{a,b,c}

^a Department of Clinical Medicine Division of

Hematology, Walter Cantidio Hospital,

Federal University of Ceará, Fortaleza, Ceará, Brazil

^c Cancer Hospital, Fortaleza, Ceará, Brazil

^c Cancer Institute of Ceará, A.C. Camargo Hospital

(Dinter-Minter), Fortaleza, Ceará, Brazil

Juliana Sousa

Silvia Magalhães

Department of Clinical Medicine Division of

Hematology, Walter Cantidio Hospital,

Federal University of Ceará, Fortaleza, Ceará, Brazil

Ronald Pinheiro^{a,b,c,*}

^a Department of Clinical Medicine Division of

Hematology, Walter Cantidio Hospital,

Federal University of Ceará, Fortaleza, Ceará, Brazil

^b Department of Pathology, Walter Cantidio Hospital,

Federal University of Ceará, Fortaleza, Ceará, Brazil

^c Cancer Hospital, Fortaleza, Ceará, Brazil

* Corresponding author at: Department of

Medicine, Division of Hematology, Walter Cantidio

Hospital, Federal University of Ceará, Pereira

Valente, 738 Meireles, 60160250 Fortaleza, Ceará,

Brazil. Tel.: +55 85 32640898;

fax: +55 85 32640898.

E-mail addresses: ronaldpinheiro@pq.cnpq.br,

ronaldpinheiro@uol.com.br (R. Pinheiro)

18 June 2010

Available online 2 August 2010